

**VALIDACION DE LA TECNICA ANALITICA DEMANDA
BIOQUIMICA DE OXIGENO (DBO₅) EN EL LABORATORIO DE
PSL PROANALISIS LTDA DETERMINANDO EL OXIGENO
DISUELTO POR EL METODO YODOMETRICO Y POR EL
METODO ELECTROMETRICO.**

FREDDY ALEXANDER PULIDO SOLANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA
BUCARAMANGA
2007**

**VALIDACION DE LA TECNICA ANALITICA DEMANDA
BIOQUIMICA DE OXIGENO (DBO₅) EN EL LABORATORIO DE
PSL PROANALISIS LTDA DETERMINANDO EL OXIGENO
DISUELTO POR EL METODO YODOMETRICO Y POR EL
METODO ELECTROMETRICO.**

FREDDY ALEXANDER PULIDO SOLANO

Trabajo de grado para optar por el titulo de: Químico.

Director:

JAIME CAMARGO

QUIMICO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA
BUCARAMANGA
2007**

Quiero agradecer a Dios por todas las bendiciones durante mi proceso educativo en esta universidad, agradecerles a mis padres por el apoyo incondicional, a mi esposa y mis dos maravillosos hijos que son una fuente inagotable de inspiración para salir adelante en este proceso de mejoramiento personal, el doctor Amleto León Téllez por los grandes esfuerzos para que este proyecto saliera adelante y a todos aquellos que participaron directa e indirectamente para el buen desarrollo de este trabajo.

Muchas gracias por todo.

FREDDY ALEXANDER PULIDO SOLANO

CONTENIDO

	Pag
INTRODUCCION	1
1. ESTADO DEL ARTE	3
1.1 AGUAS NATURALES	3
1.1.1 TOMA DE MUESTRAS	4
1.2 AGUAS RESIDUALES	4
1.2.1 TOMA DE MUESTRAS	5
1.3 DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO DBO ₅	5
1.3.1 LIMITACIONES E INTERFERENCIAS	5
1.3.2 TOMA Y PRESRVACION DE MUESTRAS	6
1.4 DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO	6
1.4.1 EL METODO DE WINKLER O YODOMETRICO	6
1.4.2 METODO ELECTROMETRICO	7
1.5 NORMA ISO/IEC 17025	7
1.6 VALIDACION	8
1.7 ANOVA	9
2. METODOLOGIA	10
2.1 ETAPA PRELIMINAR DE LA VALIDACION	10
2.2 INTERVALO DE VALIDACION	11
2.3 VALIDACION	11
2.4 RECHAZO DE DATOS ATIPICOS	12
2.5 LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION	12
2.6 COEFICIENTE DE VARIACION	12
2.7 PRESICION	12
2.8 EXACTITUD	12
2.9 LIMITES INICIALES PARA LA CARTA DE CONTROL	13
2.10 INCERTIDUMBRE	13
2.10.1 PRINCIPALES FUENTES DE INCERTIDUMBRE	14
3. RESULTADOS	15
3.1 RECHAZO DE DATOS ATIPICOS	15
3.1.1 METODO YODOMETRICO SIN SEMILLA	15
3.1.2 METODO YODOMETRICO CON SEMILLA	15
3.1.3 METODO ELECTROMETRICO SIN SEMILLA	16
3.1.4 METODO ELECTROMETRICO CON SEMILLA	16
3.2 LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION DEL METODO	17
3.3 COEFICIENTE DE VARIACION	19
3.3.1 METODO YODOMETRICO	19
3.3.2 METODO ELECTROMETRICO	19
3.4 LIMITES INICIALES PARA LA CARTA DE CONTROL	20

3.4.1 METODO YODOMETRICO	20
3.4.2 METODO ELECTROMETRICO	22
3.5 EXACTITUD	23
3.6 ATRIBUTOS DEL METODO YODOMETRICO	24
3.7 ATRIBUTOS DEL METODO ELECTROMETRICO	25
3.8 ANALISIS DE LA VARIANZA	25
3.8.1 METODO YODOMETRICO	26
3.8.2 METODO ELECTROMETRICO	30
3.9 INCERTIDUMBRE DEL METODO	38
3.9.1 MEDICION DEL OXIGENO DISUELTO	38
3.9.2 INCERTIDUMBRE PARA LA DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO	40
4. CONCLUSIONES	41
5. RECOMENDACIONES	43
6. BIBLIOGRAFIA	45
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS.

	Pág.
FIGURA 1. MEDIDOR DE OXIGENO DISUELTO MARCA LUTRON.	10
FIGURA 2. NEVERAS DE INCUBACION, 20 ± 1 $^{\circ}\text{C}$.	10
FIGURA 3. RECIPIENTES DE INCUBACION (WINKLER) DE 300ML DE CAPACIDAD.	11
FIGURA 4. CARTA INICIAL DE CONTROL PARA EL METODO YODOMETRICO.	19
FIGURA 5. CARTA INICIAL DE CONTROL PARA EL METODO ELECTROMETRICO.	20

LISTA DE TABLAS.

	Pág.
TABLA 1. DATOS OBTENIDOS PARA EL METODO YODOMETRICO SIN SEMILLA.	15
TABLA 2. DATOS OBTENIDOS PARA EL METODO YODOMETRICO CON SEMILA.	15
TABLA 3. DATOS OBTENIDOS PARA EL ELECTROMETRICO SIN SEMILLA.	15
TABLA 4. DATOS OBTENIDOS PARA EL METODO ELECTROMETRICO CON SEMILLA.	16
TABLA 5. DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION DEL METODO YODOMETRICO.	16
TABLA 6. DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION DEL METODO ELECTROMETRICO.	17
TABLA 7 DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE VARIACION PARA EL METODO YODOMETRICO.	17
TABLA 8. DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE VARAIACION PARA EL METODO ELECTROMETRICO.	18
TABLA 9. DETERMINACION DE LA CARTA DE CONTROL DEL METODO YODOMETRICO.	18
TABLA 10. DETERMINACION DE LA CARTA DE CONTROL DEL METODO ELECTROMETRICO.	19
TABLA 11. ATRIBUTOS DEL METODO YODOMETRICO.	21
TABLA 12. ATRIBUTOS DEL METODO ELECTROMETRICO.	22
TABLA 13. DATOS DEL METODO YODOMETRICO PARA EL ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LA MUESTRA 1.	22
TABLA 14. RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DE LA MUESTRA 1 PARA EL METODO YODOMETRICO.	23
TABLA 15. DATOS DEL METODO YODOMETRICOPARA EL ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LA MUESTRA 2.	24

TABLA 16. . RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DE LA MUESTRA 2 PARA EL METODO YODOMETRICO.	25
TABLA 17. DATOS DEL METODO ELECTROMETRICO PARA EL ANALISIS DE LA VARIANZA DE LA MUESTRA 1.	25
TABLA 18. RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DE LA MUESTRA 1 PARA EL METODO ELECTROMETRICO.	26
TABLA 19. DATOS DEL METODO ELECTROMETRICO PARA EL ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LA MUESTRA 2.	27
TABLA 20. RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DE LA MUESTRA 2 PARA EL METODO ELECTROMETRICO.	28
TABLA 21. RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LA COMPARACION DE LOS DOS METODOS PARA LA MUESTRA 1 SIN SEMILA.	28
TABLA 22. RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA PARA LA COMPARACION DE LOS DOS METODOS PARA LA MUESTRA 2 SIN SEMILLA.	
TABLA 23. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE PA RA LA DETERMINACION DEL OXIGENO DISUELTO.	30
TABLA 24. CALCULO DE LAS PRINCIPALES FUENTES DE INCERTIDUMBRE PARA LA DBO ₂ .	30
TABLA 25. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE EXPANDIDA U.	32

RESUMEN

TITULO.

VALIDACION DE LA TECNICA ANALITICA DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO (DBO₅) EN EL LABORATORIO DE PSL PROANALISIS LTDA DETERMINANDO EL OXIGENO DISUELTO POR EL METODO YODOMETRICO Y POR EL METODO ELECTROMETRICO.*

AUTOR.

FREDDY ALEXANDER PULIDO SOLANO**

PALABRAS CLAVES.

DBO₅, oxígeno disuelto, validación, método yodométrico, método electrométrico.

DESCRIPCIÓN.

La contaminación ambiental se ha convertido en un problema de grandes magnitudes tanto en Colombia como en el mundo entero, siendo la contaminación del agua uno de los más importantes problemas que tiene que afrontar el hombre hoy en día. Por eso se han implementado normas para controlar la calidad del agua potable como las residuales.

Uno de los parámetros de control del agua es la demanda bioquímica de oxígeno, la cual es un buen indicador del nivel de contaminación de las aguas. Esta técnica junto a otras se validaron en el laboratorio de PSL PROANALISIS LTDA como cumplimiento de uno de los requisitos para la acreditación bajo la norma ISO 17025 “requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, para dar credibilidad en la emisión de resultados a los cliente que solicitan los servicios del laboratorio.

En los estudios de la validación se hallaron el límite de detección del método, límite de cuantificación, exactitud, coeficiente de variación y los límites iniciales para la carta de control, además se realizó una comparación entre las técnicas yodométrica y electrométrica.

*Tesis de grado

**Facultad de ciencias, programa de química, Director: Jaime Camargo.

SUMMARY

TITLE.

VALIDATION OF THE TECHNIQUE ANALYTIC DEMAND BIOCHEMISTRY OF OXYGENATE (DBO5) IN THE LABORATORY DE PSL PROANALISIS LTDA DETERMINING THE OXYGENATE DISSOLVED FOR THE METHOD YODOMETRICO AND FOR THE METHOD ELECTROMETRICO. *

AUTHOR

FREDDY ALEXANDER PULIDO SOLANO * *

KEY WORDS

DBO5, oxygenate dissolved, validation, method yodométrico, method electrometric.

DESCRIPCIÓN

The environmental contamination has become a problem of big magnitudes as much in Colombia as in the whole world, being the contamination of the water one of the most important problems that has to confront the man today in day. For that reason norms have been implemented to control the quality of the drinkable water as that of verities.

One of the parameters of control of the water is the biochemical demand of I oxygenate, which is a good indicator of the level of contamination of the waters. This technique together has other they were validated in the laboratory of PSL PROANALISIS LTDA like execution of one of the requirements for the low accreditation the norm ISO 17025 relative general "requirements to the competition of the rehearsal laboratories and calibration."

In the studies of the validation they were the limit of detection of the method, limit of quantification, accuracy, variation coefficient and you limit them initials for the control letter, one also carries out a comparison between the technical yodométrico and electrometric.

* Grade thesis

* * Ability of sciences, programs of chemistry, Director: Jaime Camargo.

INTRODUCCION

El hombre debe disponer de agua natural y limpia para proteger su salud. El agua se considera contaminada cuando su composición o estado no reúne las condiciones requeridas para los usos a los que se hubiera destinado en su estado natural. En condiciones normales disminuye la posibilidad de contraer enfermedades como el cólera, la fiebre tifoidea, la disentería y las enfermedades diarreicas; esta última es la principal causa de mortalidad de los niños de 1 a 4 años. El crecimiento de la industrialización, de la urbanización y de la población humana acrecienta los problemas de contaminación y en consecuencia el suministro de agua potable y el tratamiento de las aguas cloacales.

El agua fuente de vida está siendo contaminada por el mal uso que le está dando el hombre, ya sean aguas de desecho urbano, como las de desecho industrial están contaminando las fuentes de aguas naturales. En vista de la gran preocupación que representa en estos momentos el notorio deterioro del medio ambiente se han implementado diversos planes de mejoramiento y ensayos analíticos para establecer la calidad del agua.

Las entidades encargadas de velar por el medio ambiente están controlando a todos aquellos que de manera directa e indirectamente están contribuyendo en la contaminación de las fuentes de aguas naturales, y también están exigiendo a los laboratorios que realizan los análisis de estas fuentes de contaminación a emitir resultados confiables.

Por esta razón el laboratorio de PSL PROANALISIS LTDA realiza su acreditación ante el IDEAM bajo la norma ISO-IEC-17025 para

ser mucho más competente, cumplir con todas las exigencias de los clientes y cumplir con un mejoramiento continuo basado en un sistema de gestión de calidad.

Uno de los parámetros validados es la demanda bioquímica de oxígeno, el cual fue sometido a un estudio comparativo entre dos métodos y se hallaron una serie de atributos que suministraron una información muy valiosa para la aplicación de esta técnica analítica en el laboratorio y así cumplir con las exigencias de calidad establecidas.

1. ESTADO DEL ARTE.

Los ríos, lagos y mares recogen, desde tiempos inmemoriales, las basuras producidas por la actividad humana. El ciclo natural del agua tiene una gran capacidad de purificación. Pero esta misma facilidad de regeneración del agua, y su aparente abundancia, hace que sea el vertedero habitual en el que arrojamos los residuos producidos por nuestras actividades. Pesticidas, desechos químicos, metales pesados, residuos radiactivos, etc., se encuentran, en cantidades mayores o menores, al analizar las aguas de los más remotos lugares del mundo. Muchas aguas están contaminadas hasta el punto de hacerlas peligrosas para la salud humana, y dañinas para la vida. ²

Primero fueron los ríos, las zonas portuarias de las grandes ciudades y las zonas industriales las que se convirtieron en sucias cloacas, cargadas de productos químicos, espumas y toda clase de contaminantes. Con la industrialización y el desarrollo económico este problema se ha ido trasladando a los países en vías de desarrollo, a la vez que en los países desarrollados se producían importantes mejoras.

1.1 AGUAS NATURALES.

El agua natural constituye un sistema complejo y heterogéneo, formado por una fase acuosa, una gaseosa y una o varias fases sólidas, las cuales se encuentran interactuando entre sí mediante equilibrios químicos regidos por leyes termodinámicas, y en cuya composición química intervienen, además, otros factores (geológicos, hidrogeológicos, geomorfológicos, podológicos,

microbiológicos, climáticos y ambientales). El agua natural en su conjunto constituye un recurso renovable que interviene en el ciclo hidrológico. Se ha demostrado que su cantidad global no varía, aunque sí su cantidad local y su calidad. Uno de los subsistemas del agua natural lo constituye el agua mineral, cuya composición es estable y es considerado un recurso mineral.^{2,3}

Las características del sistema de las aguas naturales en general, están relacionadas con la estructura y peculiaridades del agua pura. El agua pura está constituida por moléculas, donde dos átomos de hidrógeno se encuentran unidos a uno de oxígeno (H_2O), separados entre sí 105° . Esta estructura le confiere a la molécula de agua propiedades que la distinguen de otras moléculas de composición similar como el amoniacó (NH_3) o el sulfuro de hidrógeno (H_2S), las cuales a temperatura y presión normales se encuentran en estado gaseoso, mientras el agua se encuentra en estado líquido.

El agua constituye un tercio de la superficie terrestre. Existe gran variedad de fuentes de aguas tales como lagos, ríos, mares, pozos, glaciares en las cuales el agua no se encuentra de una forma pura sino acompañada de sales, sedimentos, minerales y muchos organismos acuáticos. Las fuentes de aguas dulces son de gran importancia para la vida del hombre debido a que estas se utilizan para su alimentación y otros usos domésticos, por eso es de gran importancia saber su origen y contenido de impurezas que éstas contienen.

1.1.1 Toma de muestras.

La toma de muestras de agua es una operación delicada, que debe ser llevada a cabo con el mayor cuidado, esto condiciona los resultados analíticos y la interpretación que nos será dada. De una manera general la muestra debe ser homogénea y representativa. Generalmente se recomienda el uso de frascos de vidrio tipo ámbar

los cuales deben cumplir con un protocolo de lavado. El uso de frascos plásticos esta muy generalizado debido a las facilidades de transporte, su reutilización puede sin embargo dar problemas de contaminación si la limpieza no ha sido perfecta.²

1.2 AGUAS RESIDUALES.

Bajo la terminología de aguas residuales se agrupan habitualmente aguas de origen es diversos, se encuentran en esta categoría las aguas de origen urbano formadas por las aguas domésticas (lavado corporal y de ropa, lavado de locales, aguas de cocina) y las aguas residuales cargadas de heces y orines.

Toda esta masa de efluentes está más o menos diluida por las aguas de lavado de los servicios públicos y las aguas pluviales. El agua así colectada en una red de alcantarillado aparece como un líquido turbio de color grisáceo que contiene material en suspensión de origen orgánico y mineral en cantidades variables.

Las aguas de origen industrial tienen generalmente una composición más específica y directamente ligada al tipo de industria.

1.2.1 Toma de muestras.

Teniendo en cuenta la diversidad de la naturaleza de las aguas residuales así como de los sistemas de transporte y de dilución, es difícil definir una técnica de toma de muestras. El objetivo a alcanzar consiste esencialmente en obtener muestras representativas del vertido y del medio receptor. En la practica, el problema del muestreo en las aguas residuales es todavía más delicado que el de las aguas naturales, si no se realiza en muy buenas condiciones, los errores debido a las características de la toma de muestras serán siempre prácticamente, muy superiores a los errores del análisis.^{3,11}

1.3 DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO₅).

La Demanda Bioquímica de Oxígeno es la cantidad de oxígeno consumido durante un período de incubación específico, para la degradación bioquímica de la materia orgánica. También permite determinar el oxígeno necesario para oxidar las formas reducidas del nitrógeno (demanda nitrogenada) a menos que su oxidación se prevenga con un inhibidor.

El método consiste en incubar la muestra por 5 días en una botella especial para DBO de aproximadamente 300 mL. Se debe medir el oxígeno disuelto antes y después del período de incubación; el DBO se calcula con la diferencia entre estos dos valores.^{3, 11}

1.3.1 Limitaciones e interferencias.

El material de vidrio sucio puede afectar los resultados de la prueba, se recomienda lavar los frascos y las pipetas con mezcla sulfocrómica, luego con agua del grifo y por último con 3 porciones de agua destilada, finalmente se esterilizan a 105 °C por 2 horas.

Si las muestras contienen metales tóxicos o cloro deben recibir tratamiento especial.

1.3.2 Toma y preservación de muestras.

Tomar una muestra representativa de 1000 mL en un recipiente de vidrio esterilizado para hacer el análisis por duplicado. Las muestras para análisis de DBO, pueden degradarse significativamente, durante el período comprendido entre la recolección de las muestras y el análisis, resultando valores bajos de DBO. Si las muestras se enfrían, es necesario tener en cuenta el tiempo de espera para que la muestra llegue a la temperatura ambiente del laboratorio, como requisito para poder iniciar la prueba.

Si el análisis se realiza antes de dos horas después de recolectar las muestras, no es necesario almacenar las muestras en frío. El análisis debe hacerse antes de 24 horas, después de 6 horas es necesario reportar en el informe, el tiempo y la temperatura de

almacenamiento. En ningún caso el análisis se debe iniciar después de 24 horas de la recolección de la muestra.⁴

1.4 DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO.

Los niveles de oxígeno (OD) en aguas naturales y residuales dependen de la actividad física, química y bioquímica del sistema de aguas. El análisis de OD es una prueba clave en la contaminación del agua y control del proceso de tratamiento de aguas residuales.

Existen diferentes métodos para la determinación de OD entre los que se encuentran el método de Winkler o yodométrico y sus modificaciones, y el electrométrico que utiliza electrodos de membrana.⁴

1.4.1 El método de Winkler o yodométrico.

El método yodométrico es el procedimiento titulométrico más exacto y fiable para analizar OD; Se basa en la adición de solución de manganeso divalente seguido de álcali fuerte, a la muestra contenida en un frasco con tapón de vidrio. El OD oxida rápidamente una cantidad equivalente del precipitado disperso de hidróxido manganeso divalente a hidróxidos con mayor estado de valencia, en presencia de iones yoduro en solución ácida el manganeso oxidado revierte al estado divalente, con liberación de yodo equivalente al contenido original de OD. Entonces se valora el yodo con una solución patrón de tiosulfato de sodio, en presencia de un indicador de almidón.

Se han desarrollado varias modificaciones del método yodométrico para eliminar o reducir al mínimo los efectos de las interferencias, de todos modos, el método sigue siendo inaplicable a una serie de aguas residuales domésticas e industriales.⁴

1.4.2 Método electrométrico.

Los electrodos de membrana proporcionan un método excelente para analizar OD en aguas contaminadas, muy coloreadas y diluyentes residuales fuertes. Se recomiendan para condiciones especialmente desfavorables para el uso yodométrico, o cuando esta prueba y sus modificaciones están sujetas a errores graves debido a interferencias.

Los electrodos de membrana sensibles al oxígeno, de tipo polarográfico o galvánico, están compuestos por dos electrodos metálicos sólidos en contacto con un electrolito de soporte separados de la solución problema por una membrana selectiva. La diferencia básica entre el sistema galvánico y polarográfico está en el que en el primero la reacción es espontánea mientras que en el segundo se precisa una fuente de voltaje para polarizar el electrodo indicado. Normalmente se utilizan membranas de polietileno y fluorocarbono, al ser permeables al oxígeno molecular y relativamente robustas.

Las películas de plásticos utilizadas en los electrodos de membrana son permeables a una serie de gases además del oxígeno. El uso prolongado en aguas cargadas de gases como sulfuro de hidrógeno tienden a reducir la sensibilidad de la celda.

En investigaciones de laboratorio, los electrodos de membrana se han utilizado para análisis continuos de oxígeno disuelto en cultivos bacterianos y en pruebas de DBO₅.^{2,4}

1.5 NORMA ISO/ IEC 17025.

Es la norma internacional que establece los requisitos generales que un laboratorio tiene que cumplir para que se reconozca su competencia para realizar ensayos y/o calibraciones, incluyendo el muestreo para la obtención de su acreditación. Incluye los métodos

normalizados, métodos no cubiertos por especificaciones normalizadas y métodos desarrollados por el laboratorio.

Esta norma internacional es aplicable a todos los laboratorios, independientemente de la cantidad de personal o extensión del alcance las actividades de ensayo y/o calibración.^{1, 13}

1.6 VALIDACION.

Validación es la confirmación mediante examen y aporte de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico previsto.

La validación de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz, la cantidad de parámetros a analizar y de la logística empleada para su desarrollo puede requerir de un tiempo más o menos considerable. La validación debe ser un procedimiento que incluya los parámetros fundamentales para que el método analítico pueda empezar a reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza. El método validado debe ser sometido a un seguimiento sistemático por medio de gráficas o cartas de control que aseguren la calidad del método.^{8, 9}

La validación en el laboratorio se hace con base en los Procedimientos Técnicos de Ensayo y las Guías específicas de análisis a través de la evaluación de los siguientes atributos del método: Límite de detección, límite de cuantificación, coeficiente de variación, límites iniciales para las cartas de control, rango de confianza y exactitud.

Si bien la norma ISO/IEC 17025 no requiere la validación de los métodos normalizados aplicados en un laboratorio específico, sí establece que se deberán obtener datos sobre el rendimiento de su propio uso, es decir que siempre resulta apropiado contar con algún

grado de validación, incluso cuando se utilicen métodos normalizados.^{1, 13}

1.7 ANOVA.

En estadística, análisis de varianza (ANOVA, según terminología inglesa) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.^{14, 10}

Con el análisis de varianza se pueden analizar simultáneamente la influencia de dos o más factores de clasificación sobre una variable respuesta continua, esto se conoce como análisis factorial de la varianza. En el anova se compara en la mayoría de casos medias, varianzas mediante la comparación de hipótesis.^{12, 8}

2. METODOLOGÍA.

2.1 ETAPA PRELIMINAR DE LA VALIDACIÓN.

Los equipos y materiales utilizados fueron sometidos a una serie de procedimientos tales como mantenimiento, ajustes y calibración. Al material volumétrico se le realizó una verificación a pesar de ser un material nuevo, la nevera de incubación y el medidor de oxígeno disuelto se les practicó un mantenimiento y ajuste, la balanza analítica fue calibrada. Estos ajustes fueron realizados por CM y cia. LTDA y analítica & redes, empresas con experiencia y con certificados de calidad, que garantizan la credibilidad de los resultados.



Figura 1. Medidor de oxígeno disuelto marca Lutron.



Figura 2. Neveras de incubación, 20 ± 1 °C.



Figura 3. Recipientes de incubación (winkler) de 300ml de capacidad.

2.2 INTERVALO DE VALIDACIÓN.

El intervalo de aplicación del método validado se determinó con un estudio realizado teniendo como base el tipo de muestras que llagan comúnmente al laboratorio y se pudo establecer que el valor mínimo de acción es de 1ppm de O_2 y un valor máximo de 400 ppm de O_2 , para valores mayores de 400 ppm se deberá realizar una dilución que permita que el valor obtenido esté dentro del rango de trabajo.

2.3 VALIDACIÓN.

Se realizó una serie de blancos para comprobar la calidad del agua de dilución, un patrón de 1 ppm, para determinar el límite de detección y cuantificación, un patrón de 50 ppm y un patrón de 200 ppm el cual fue establecido como estándar de control. Además se trabajó con dos muestras una de concentración baja y otra de concentración alta, estas muestras se sembraron en periodos de doce horas para establecer su comportamiento. Estos patrones y muestras fueron sembrados con semilla y sin semilla además se realizó una comparación entre los métodos yodométrico y electrométrico.

Los datos obtenidos fueron sometidos a una serie de tratamientos estadísticos para conocer el comportamiento y atributos de los métodos comparados.

2.4 RECHAZO DE DATOS ATÍPICOS.

Para cada serie de datos obtenidos se calculó el estadístico t para los valores extremos (mínimos y máximos).

$$t_{\text{alto}} = (x_{\text{alto}} - x_{\text{prom}})/s \text{ para el valor alto;}$$

$$t_{\text{bajo}} = (x_{\text{prom}} - x_{\text{bajo}})/s \text{ para el valor bajo}$$

Si el valor de t calculado es mayor que el valor de t (ver anexo 2) el dato se rechaza.^{5, 12}

2.5 LIMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACION.

El límite de detección y cuantificación se calculó para los dos métodos con base en el patrón de 1 ppm utilizando las siguientes fórmulas:

Límite de detección : $X + [t \text{ Student } (n-1 \text{ gl}, 99\%, \text{ Ver anexo 3}) * S]$

Límite de cuantificación: $LDM * 2.5$

2.6 COEFICIENTE DE VARIACION.

El coeficiente de variación se determinó con base en los datos obtenidos de las muestras M1 y M2, utilizando la siguiente fórmula.

$$C.V. = s/\bar{X} * 100$$

Donde S es la desviación estandar y X es el valor promedio.

2.7 PRECISION.

Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas. Se expresa en términos de la desviación estándar (s). Otra forma de expresar la precisión es la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).^{5,7}

2.8 EXACTITUD.

La exactitud se expresa como el error relativo (%E) se calcula con base a las pruebas interlaboratorios del IDEAM debido a que los patrones analizados son certificados y se determina con la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{(X_p - X_t)}{X_t} \times 100$$

Donde X_p es el valor promedio y X_t el valor teórico.

2.9 LÍMITES INICIALES PARA LAS CARTAS DE CONTROL.

Se obtiene el “valor teórico X_t ”, el “valor promedio X_p ” de los resultados obtenidos de los análisis realizados al estándar identificado como estándar de control.

Se calculó la desviación estándar “S” de todos los resultados sin tener en cuenta la existencia de duplicados.

El límites de alarma y control se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Límite superior de alarma (de alerta) LSA} = X_p + 2 * S$$

$$\text{Límite inferior de alarma (de alerta) LIA} = X_p - 2 * S$$

Límite superior de control (de acción) $LSC = Xp + 3 * S$

Límite inferior de control (de acción) $LIC = Xp - 3 * S$

Con la ayuda del programa Excel, se grafica la fecha de análisis en el eje de las abscisas contra el valor de la concentración obtenida para el analito en el eje de las ordenadas. Se representan en la gráfica los límites de control y el valor teórico del estándar.^{5, 6}

2.10 INCERTIDUMBRE.

La metodología utilizada se fundamenta en la estimación de la incertidumbre basada en la contribución de las fuentes INDIVIDUALES (metodología recomendada por la EURACHEM), en esta metodología se divide el proceso de medida química en sus partes fundamentales (etapas del proceso y parámetros de los cuales depende el resultado) y cada una de esas partes se subdivide a la vez en contribuciones más pequeñas, por último se calcula la incertidumbre de cada una de las partes y se combinan para obtener la incertidumbre global del proceso de medida químico.

Teniendo en cuenta que la precisión frecuentemente varía significativamente con el nivel de respuesta (concentración), el valor estimado de la incertidumbre debe ser ajustado para permitir que la precisión sea aplicable a un resultado en particular, por esta razón en la metodología usada, se estima un valor para la incertidumbre combinada y este se multiplica por el valor de la concentración y el factor de cobertura para obtener una estimación de la incertidumbre expandida del método.^{13, 15}

2.10. 1 PRINCIPALES FUENTES DE INCERTIDUMBRE.

- **Medición de la muestra.**
 - Incertidumbre material volumétrico
 - Efecto de la temperatura
 - Dispersión de las mediciones volumétricas
(Verificación del material volumétrico)
- **Dilución de la muestra (Winkler).**
 - Efecto de la temperatura
 - Dispersión de las mediciones volumétricas
(Verificación del volumen del winkler)
- **Medición del oxígeno disuelto inicial.**
 - Error máximo en la medición entregado por el equipo
 - División de escala de aparato
 - Dispersión de las mediciones de oxígeno disuelto
 - Variación de las condiciones ambientales
- **Medición del oxígeno disuelto final.**
 - Igual que para el oxígeno disuelto inicial
- **Tolerancia en la temperatura del proceso de incubación de la muestra.**
- **Incertidumbre en la calibración de la incubadora**
- **Cálculo de la DBO₅.**

Nota: No se dispone de la incertidumbre del material volumétrico (recipientes winkler).

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

3.1 RECHAZO DE DATOS ATÍPICOS.

3.1.1 METODO YODOMETRICO SIN SEMILLA.

Tabla 1. Datos obtenidos para el método yodométrico sin semilla.

1 (mg O₂/L)	50 (mg O₂/L)	200(mg O₂/L)	M1(mg O₂/L)	M2(mg O₂/L)
1.1	46.8	178	26.7	342
1.2	48.0	193	28.6	332
1.2	47.2	185	28.8	350
1.1	46.0	195	27.5	338
0.9	49.8	197	29.3	350

Realizando el análisis de la prueba t a los resultados obtenidos de los patrones y muestras por el método yodométrico no se rechaza ningún valor, debido a que se encuentran dentro del rango aceptable de máximo y mínimo permitido.

3.1.2 METODO YODOMETRICO CON SEMILLA.

Tabla 2. Datos obtenidos para el método yodométrico con semilla

1(mg O₂/L)	50 (mg O₂/L)	200(mg O₂/L)	M1(mg O₂/L)	M2(mg O₂/L)
0.9	48.0	183	32.6	332
1.2	49.2	193	31.5	345
1.3	46.8	192	33.2	355
1.1	48.0	202	32.4	339
1.3	46.8	192	33.9	351

Realizando el análisis de la prueba t se rechazó el dato de 0.9 para el patrón de 1(mg O₂/L), por que el valor se encuentra fuera del mínimo aceptable.

3.1.3 METODO ELECTROMETRICO SIN SEMILLA.

Tabla 3. Datos obtenidos para el método electrométrico sin semilla.

1 (mg O₂/L)	50 (mg O₂/L)	200(mg O₂/L)	M1(mg O₂/L)	M2(mg O₂/L)
1.2	44.4	194	26.5	328
1.1	45.6	180	25.1	331
09	48	185	27.8	325
1.2	45.6	176	25.5	324
1.1	44.4	190	28.5	339

Se realizó el análisis de la prueba t a los resultados obtenidos y no se rechaza ningún dato por que se encuentran dentro del mínimo y máximo aceptable.

3.1.4 METODO ELECTROMETRICO CON SEMILLA.

Tabla 4. Datos obtenidos para el método electrométrico con semilla.

1 (mg O₂/L)	50 (mg O₂/L)	200(mg O₂/L)	M1(mg O₂/L)	M2(mg O₂/L)
1.2	49	189	28.1	346
1.1	48.5	178	26.6	332
1.2	49.8	195	25.5	328
1.3	48	192	27.8	342
1.1	47.4	187	26.6	339

Se realizó el análisis de la prueba t a los resultados obtenidos y no se rechaza ningún dato por que se encuentran dentro del mínimo y máximo aceptable.

3.2 LIMITE DE DETECCION Y LÍMITE DE CUATIFICACION DEL METODO.

El límite de detección y cuantificación se determinó con base al patrón de 1 (mg O₂/L) para el método yodométrico y para el electrométrico.

Tabla 5. Determinación del límite de detección y cuantificación del método yodométrico.

METODO YODOMETRICO		
	SIN SEMILLA	CON SEMILLA
	1.1	1.2
	1.2	1.3
	1.2	1.1
	1.1	1.3
	0.9	-
PROMEDIO	1.1	1.2
S	0.12	0.09
CV	10.9	7.5
LDM	1.6	1.6
LCM	4.0	4.0

Tabla 6. Determinación del límite de detección y cuantificación del método electrométrico.

METODO ELECTROMETRICO		
	SIN SEMILLA	CON SEMILLA
	1.2	1.2
	1.1	1.1
	0.9	1.2
	1.2	1.3
	1.1	1.1
PROMEDIO	1.1	1.2
S	0.12	0.084
CV	10.9	7.0
LDM	1.6	1.3
LCM	4	3.3

3.3 COEFICIENTE DE VARIACION.

El coeficiente de variación se determinó con los resultados de las muestras M1 y M2.

3.3.1 METODO YODOMETRICO.

Tabla 7. Determinación del coeficiente de variación para el método yodométrico.

	SIN SEMILLA		CON SEMILLA	
	M1	M2	M1	M2
	26.7	342	32.6	332
	28.6	332	31.5	345
	28.8	350	33.2	355
	27.5	338	32.4	339
	29.3	350	33.9	351
PROMEDIO	28.2	342	32.7	344
S	1.1	7.8	0.89	9.2
CV	3.9	2.3	2.7	2.7

3.3.2 METODO ELECTROMETRICO.

Tabla 8. Determinación del coeficiente de variación para el método electrométrico.

	SIN SEMILLA		CON SEMILLA	
	M1	M2	M1	M2
	26.5	328	28.1	346
	25.1	331	26.6	332
	27.8	325	25.5	328
	25.5	324	27.8	342
	28.5	339	26.6	339
PROMEDIO	26.7	329	26.9	337
S	1.5	6	1	7.3
CV	5.6	1.8	3.7	2.2

3.4 LIMITES INICIALES PARA LA CARTA DE CONTROL.

Los límites iniciales para la carta de control se determinaron con base en los patrones de 200 mg O₂/L.

3.4.1 METODO YODOMETRICO.

Tabla 9. Determinación de la carta de control del método yodométrico.

	SIN SEMILLA	CON SEMILLA
	178	183
	193	193
	185	192
	195	202
	197	192
PROMEDIO	190	192
S	7.92	6.73
C.V	4.2	3.5
LSA	206	205
LIA	174	179
LSC	214	212
LIC	166	172

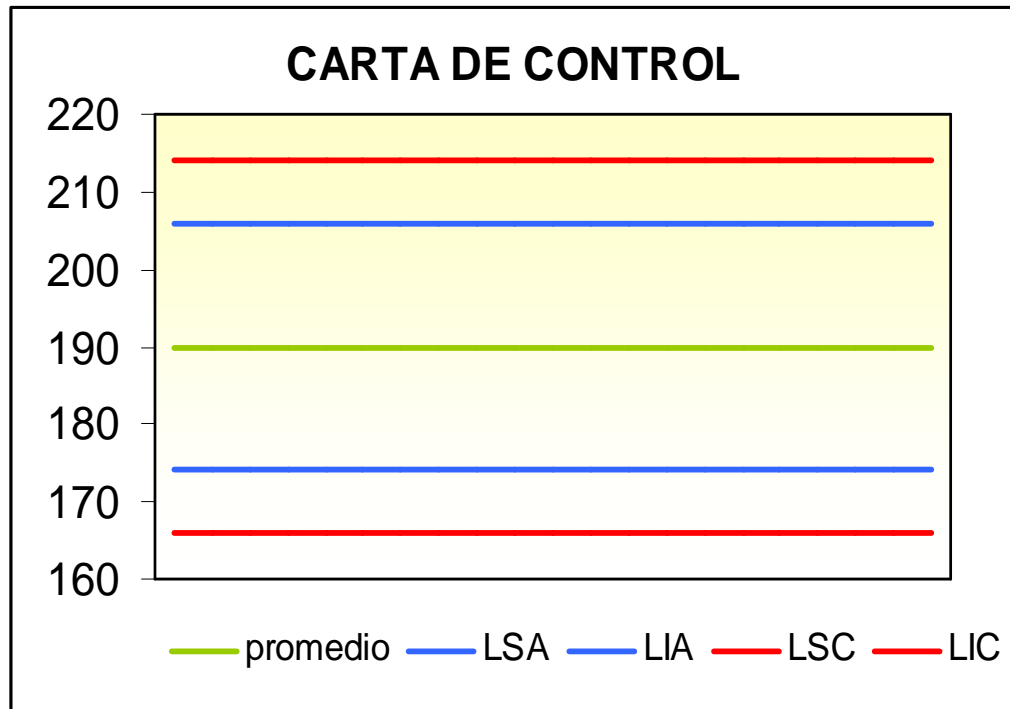


Figura 4. Carta inicial de control para el método yodométrico.

La carta de control se realizó con los datos del patrón de 200 mg O₂/L sin semilla debido a que este presenta el mayor coeficiente de variación, esto se estableció con el fin de dar un mayor rango de trabajo en la realización de los ensayos analíticos sin que afecten los criterios de calidad establecidos.

La carta de control se recalculará cada 20 nuevos datos estableciendo nuevos valores para los límites permitidos.

3.4.2 METODO ELECTROMETRICO.

Tabla 10. Determinación de la carta de control del método electrométrico.

	SIN SEMILLA	CON SEMILLA
	194	189
	180	178
	185	195
	176	192
	190	187
PROMEDIO	185	188
S	7.28	6.46
C.V	3.9	3.4
LSA	200	201
LIA	170	175
LSC	207	207
LIC	163	169

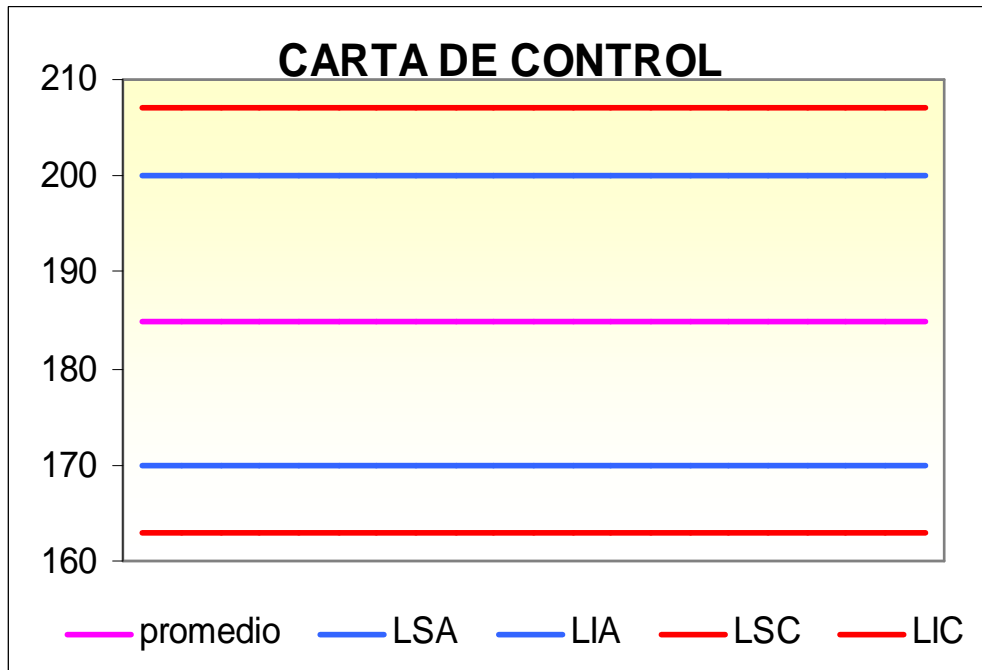


Figura 5. Carta inicial de control para el método electrométrico.

La carta de control se realizó con los datos del patrón de 200 mg O₂/L sin semilla debido a que este presenta el mayor coeficiente de variación.

La carta de control se recalculará cada 20 nuevos datos estableciendo nuevos valores para los límites permitidos.

3.5 EXACTITUD.

Se expresa como error relativo y se determinó en base a los patrones de las pruebas interlaboratorios del IDEAM.

Patrón bajo:

Valor reportado por el laboratorio: 23 mg O₂/L

Valor de referencia: 23.23 mg O₂/L

$$\% = \left| \frac{23 - 23.23}{23} \right| * 100$$

$$= 1\%$$

Patrón alto:

Valor reportado por el laboratorio: 240mg O₂/L

Valor de referencia: 264 mg O₂/L

$$\% = \left| \frac{240 - 264}{264} \right| * 100$$

$$= 9.1\%$$

Los resultados están dentro del rango establecido por el laboratorio el cual es de 30%.

3.6 ATRIBUTOS DEL METODO YODOMETRICO.

Tabla 11. Atributos del método yodométrico.

Límite de detección del método, LDM	1.6 mg O₂/L
Límite de cuantificación, LCM	4.0 mg O₂/L
Coeficiente de variación, CV	3.9%
Límite superior de alarma, LSA	206 mg O₂/L
Límite inferior de alarma, LIA	174 mg O₂/L
Límite superior de control, LSC	214 mg O₂/L
Límite inferior de control, LIC	166 mg O₂/L

Los datos para expresar en los atributos del método se basaron en los cálculos estadísticos donde el coeficiente de variación fue el más alto.

La exactitud para el método yodométrico no se calculó por que las pruebas de desempeño del IDEAM se realizaron solo con el método electrométrico.

3.7 ATRIBUTOS DEL METODO ELECTROMETRICO.

Tabla 12. Atributos del método electrométrico.

Límite de detección del método, LDM		1.6 mg O₂/L
Límite de cuantificación, LCM		4.0 mg O₂/L
Coeficiente de variación, CV		5.6 %
Límite superior de alarma, LSA		200 mg O₂/L
Límite inferior de alarma, LIA		170 mg O₂/L
Límite superior de control, LSC		207 mg O₂/L
Límite inferior de control, LIC		163 mg O₂/L
Exactitud (% error relativo)	Patrón bajo	1.0 %
	Patrón alto	9.1 %

Los datos para expresar los atributos del método electrométrico se basaron en los cálculos estadísticos donde el coeficiente de

variación fue el más alto sin que se afecten los criterios de calidad establecidos por el laboratorio.

3.8 ANÁLISIS DE LA VARIANZA.

Se realizó una anova de dos factores con base en las muestras M1 y M2 las cuales fueron sembradas en periodos de 12 horas respectivamente, para un 95 % de confianza. Estos cálculos se efectuaron con la ayuda del programa Excel.

3.8.1 MÉTODO YODOMÉTRICO.

Tabla 13. Datos del método yodométrico para el análisis de la varianza de la muestra M1.

Muestra 1		
	Sin semilla	Con semilla
Tanda 1	26.7	28.1
	28.6	26.6
	28.8	25.5
	27.5	27.8
	29.3	26.6
promedio	28.2	26.9
Tanda 2	17.4	20.3
	16.6	19.7
	17	22.3
	17.8	20.6
	18.4	22.4
promedio	17.4	21.1

Tanda 3	15.4	18.3
	13.8	16.5
	14.2	17.5
	14.5	18.4
	13.4	16.7
promedio	14.3	17.5

Tabla 14. Resultados del análisis de la varianza de la muestra M1 para el método yodométrico.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	25.947	1	25.947	28.0761046	1.9544E-05	4.25967721
Columnas	722.456	2	361.228	390.868891	4.8776E-19	3.40282611
Interacción	36.704	2	18.352	19.85789	8.1578E-06	3.40282611
Dentro del grupo	22.18	24	0.92416667			
Total	807.287	29				

Muestras con siembra y sin siembra:

F calculado 28.07 > 4.25 F crítico.

Periodos de incubación:

F calculado 390 > 3.40 F crítico.

Con la realización de la Anova se hizo el test de hipótesis de la prueba F para ver que no exista diferencia en la siembra de las muestras con semilla y sin semilla, el valor F calculado es mayor que el valor crítico para F, dado que el criterio de rechazo no se cumple podemos concluir que sí existe diferencia en la siembra de las muestras con o sin semilla, en los periodos de incubación para la muestra M1 por el método yodométrico, también se presenta que el valor F calculado es mayor que el valor F crítico por consiguiente si hay diferencia en los periodos de incubación.

Tabla 15. Datos del método yodométrico para el análisis de la varianza de la muestra M2.

Muestra 2		
	Sin semilla	Con semilla
Tanda 1	342	332
	332	345
	350	355
	338	339
	350	351
promedio	342	344
Tanda 2	275	295
	266	280
	281	298
	275	290
	260	285
promedio	271	290

Tanda 3	210	240
	225	250
	235	260
	205	245
	210	230
promedio	217	245

Tabla 16. Resultados del análisis de la varianza de la muestra M2 para el método yodométrico.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	1936.03333	1	1936.03333	21.0935173	0.00011697	4.25967721
Columnas	63468.0667	2	31734.0333	345.74941	2.0287E-18	3.40282611
Interacción	862.066667	2	431.033333	4.69620483	0.01900036	3.40282611
Dentro del grupo	2202.8	24	91.7833333			
Total	68468.9667	29				

Muestras con semilla y sin semilla:

F calculado 21.09 > 4.25 F crítico.

Periodos de incubación:

F calculado 345 > 3.40 F crítico.

Con la realización de la Anova se hizo el test de hipótesis de la prueba F para ver que no exista diferencia en la siembra de las muestras con semilla y sin semilla, el valor F calculado es mayor que el valor crítico para F, dado que el criterio de rechazo no se cumple podemos concluir que sí influye la siembra de las muestras con y sin semilla y para los periodos de de incubación de la muestra M2 por el método yodométrico.

3.8.2 MÉTODO ELECTROMÉTRICO.

Tabla 17. Datos del método electrométrico para el análisis de la varianza de la muestra M1.

Muestra 1		
	Sin semilla	Con semilla
Tanda 1	26.5	28.1
	25.1	26.6
	27.8	25.5
	25.5	27.8
	28.5	26.6
promedio	26.7	27.1
Tanda 2	18.4	22.3
	16.5	19.5
	20.1	23.4
	16.5	19.4
	17.9	20.1
promedio	17.9	20.9

Tanda 3	13.2	17.4
	11.5	15.4
	12.6	15
	14.7	18.4
	12.5	15.2
promedio	12.9	16.3

Tabla 18. Resultados del análisis de la varianza de la muestra M1 por el método electrométrico.

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	37.1853333	1	37.1853333	17.9192033	0.00029191	4.25967721
Columnas	756.428667	2	378.214333	182.257329	3.0878E-15	3.40282611
Interacción	14.9286667	2	7.46433333	3.59698016	0.04302181	3.40282611
Dentro del grupo	49.804	24	2.07516667			
Total	858.346667	29				

Muestras con semilla y sin semilla:

F calculado 17.9 > 4.25 F crítico.

Periodos de incubación:

F calculado 182 > 3.40 F crítico.

Con la realización de la Anova se hizo el test de hipótesis de la prueba F para ver que no exista diferencia en la siembra de las muestras con semilla y sin semilla, el valor F calculado es mayor que el valor crítico para F, dado que el criterio de rechazo no se cumple podemos concluir que sí existe diferencia en la siembra de las muestras con o sin semilla y en los periodos de incubación para la muestra 1 por el método electrométrico.

Tabla 19. Datos del método electrométrico para el análisis de la varianza de la muestra M2.

Muestra 2		
	Sin semilla	Con semilla
Tanda 1	328	346
	331	332
	325	328
	324	342
	339	339
promedio	329	337
Tanda 2	275	301
	265	295
	285	304
	290	310
	275	295
promedio	278	301

Tanda 3	225	250
	236	261
	225	248
	245	255
	235	245
promedio	233	252

Tabla 20. Resultados del análisis de la varianza de la muestra M2 por el método electrométrico.

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	2050.13333	1	2050.13333	36.5551263	3.0426E-06	4.25967721
Columnas	41330.0667	2	20665.0333	368.470134	9.6901E-19	3.40282611
Interacción	297.266667	2	148.633333	2.65022288	0.09121036	3.40282611
Dentro del grupo	1346	24	56.0833333			
Total	45023.4667	29				

Muestras con semilla y sin semilla:

F calculado 36.5 > 4.25 F crítico.

Periodos de incubación:

F calculado 368 > 3.40 F crítico.

Con la realización de la Anova se hizo el test de hipótesis de la prueba F para ver que no exista diferencia en la siembra de las muestras con semilla y sin semilla, el valor F calculado es mayor que el valor crítico para F, dado que el criterio de rechazo no se cumple podemos concluir que sí existe diferencia en la siembra de las muestras con semilla o sin semilla y en los periodos de incubación para la muestra M2 por el método electrométrico.

Tabla 21. Resultados del análisis de la varianza para la comparación de los dos métodos para la muestra M1 sin semilla.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	4.88033333	1	4.88033333	3.68698061	0.06679977	4.25967721
Columnas	1013.07267	2	506.536333	382.676656	6.2413E-19	3.40282611
Interacción	5.85266667	2	2.92633333	2.21077814	0.13145002	3.40282611
Dentro del grupo	31.768	24	1.32366667			
Total	1055.57367	29				

Muestra sin semilla:

F calculado 3.68 < 4.25 F crítico.

Periodos de incubación:

F calculado 382 > 3.40 F crítico.

Con la realización de la Anova se hizo el test de hipótesis de la prueba F para ver que no exista diferencia en la siembra de las muestras para los dos métodos, el valor F calculado es menor que el valor crítico para F, dado que el criterio de rechazo se cumple podemos concluir que no existe diferencia en la siembra de las muestras para los dos métodos, pero el valor F calculado es mayor que el valor F crítico para los diferentes periodos de incubación, esto concluye que sí existe diferencia entre los periodos de incubación para la muestra M1.

Tabla 22. Resultados del análisis de la varianza para la comparación de los dos métodos para la muestra M2 sin semilla.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	80.0333333	1	80.0333333	0.97980004	0.33212345	4.25967721
Columnas	61607.4667	2	30803.7333	377.11161	7.4009E-19	3.40282611
Interacción	1107.46667	2	553.733333	6.77902469	0.00463552	3.40282611
Dentro del grupo	1960.4	24	81.6833333			
Total	64755.3667	29				

Muestra sin semilla:

F calculado $0.97 < 4.25$ F crítico.

Periodos de incubación:

F calculado $377 > 3.40$ F crítico.

Con la realización de la Anova se hizo el test de hipótesis de la prueba F para ver que no exista diferencia en la siembra de las muestras por los dos métodos, el valor F calculado es menor que el valor crítico para F dado que el criterio de rechazo se cumple podemos concluir que no existe diferencia en la siembra de las muestras para los dos métodos, pero el valor F calculado es mayor que el valor F crítico para los diferentes periodos de incubación, esto concluye que sí existe diferencia entre los periodos de incubación para la muestra M2.

Tabla 23. Resultados del análisis de la varianza para la comparación de los dos métodos para la muestra M1 con semilla.

ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Muestra	1,452	1	1,452	0,86652079	0,3611901	4,25967721	
Columnas	509,408	2	254,704	152,001591	2,355E-14	3,40282611	
Interacción Dentro del grupo	2,184	2	1,092	0,65168092	0,53014685	3,40282611	
	40,216	24	1,67566667				
Total	553,26	29					

Muestra con semilla:

F calculado 0.86 < 4.25 F crítico.

Periodos de incubación:

F calculado 152 > 3.40 F crítico.

Se hizo el test de hipótesis de la prueba F para ver que no exista diferencia en la siembra de las muestras por los dos métodos, el valor F calculado es menor que el valor crítico para F dado que el criterio de rechazo se cumple podemos concluir que no existe diferencia en la siembra de las muestras con semilla para los dos métodos, pero el valor F calculado es mayor que el valor F crítico para los diferentes periodos de incubación, esto concluye que sí existe diferencia entre los periodos de incubación para la muestra M1.

Tabla 24. Resultados del análisis de la varianza para la comparación de los dos métodos para la muestra M2 con semilla.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	104,533333	1	104,533333	1,57945102	0,22093433	4,25967721
Columnas	42784,0667	2	21392,0333	323,223873	4,4275E-18	3,40282611
Interacción	458,466667	2	229,233333	3,46361118	0,04769182	3,40282611
Dentro del grupo	1588,4	24	66,1833333			
Total	44935,4667	29				

Muestra con semilla:

F calculado $1.57 < 4.25$ F crítico.

Periodos de incubación:

F calculado $323 > 3.40$ F crítico.

Se hizo el test de hipótesis de la prueba F para ver que no exista diferencia en la siembra de las muestras por los dos métodos, el valor F calculado es menor que el valor crítico para F dado que el criterio de rechazo se cumple podemos concluir que no existe diferencia en la siembra de las muestras con semilla para los dos métodos, pero el valor F calculado es mayor que el valor F crítico para los diferentes periodos de incubación, esto concluye que sí existe diferencia entre los periodos de incubación para la muestra M2 con semilla.

3.9 INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO.

3.9.1 MEDICIÓN DEL OXÍGENO DISUELTO

Tabla 25. Cálculo de la incertidumbre para la determinación de oxígeno disuelto.

Fuente de Incertidumbre	Valores intermedios de incertidumbre	
Error del equipo indicado en el manual	Error u1	0,3 0,2
División de escala de aparato	División escala u2	0,01 0,003
Dispersión de las mediciones de oxígeno disuelto	s número mediciones n u3	0,06 10 0,02
Incertidumbre combinada final Uc	0,17	
Incertidumbre estándar relativa medición oxígeno disuelto	0,03	

- **Cálculo de las incertidumbres estándares y de las incertidumbres combinadas parciales.**

Tabla 26. Cálculo de las principales fuentes de incertidumbre para la DBO₅.

Fuente de incertidumbre	Valores intermedios de incertidumbre	
Medición de la muestra		
Incertidumbre material volumétrico para la medición de la muestra	Tolerancia μ del material U 1	0.02 0.01
Efecto de la diferencia de la temperatura ambiente con la temperatura de calibración del material volumétrico usado	Volumen X del material volumétrico Diferencia de temperatura U 2	10 5 0.006
Dispersión de las mediciones volumétricas (verificación del material volumétrico)	Desviación estándar s U 3	0.004 0.004
Incertidumbre combinada para volumen de muestra	Uc 1 (volumen muestra)	0.01
Incertidumbre estándar relativa para medición volumen de muestra	Volumen x del material volumétrico IER 1 (volumen muestra)	10 0.0014
Dilución de la muestra (winkler)		
Efecto de la diferencia de la temperatura ambiente con la temperatura de calibración del winkler	Volumen x del material volumétrico Diferencia de temperatura U4	300 6 0.2
Dispersión de las mediciones volumétricas (verificación de volumen del winkler)	Desviación estándar s U5	0
Incertidumbre combinada para dilución	Uc2 (dilución)	0.2
Incertidumbre estándar relativa	Volumen x del winkler	300

para dilución de la muestra	IER 2 (dilución)	0.0007
Medición del oxígeno disuelto		
Incertidumbre estándar relativa para medición oxígeno disuelto inicial	IER 3 (oxígeno inicial)	0.03
Incertidumbre estándar relativa para medición oxígeno disuelto final	IER 4 (oxígeno final)	0.03

➤ **CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE COMBINADA FINAL**

Cálculo de la incertidumbre combinada U_c :

$$U_c = [(IER\ 1)^2 + (IER\ 2)^2 + (IER\ 3)^2 + (IER\ 4)^2 + (IER\ 5)^2 + (IER\ 6)^2]^{1/2}$$

Se utilizan las Incertidumbres Estándar Relativas porque en el cálculo final para obtener la demanda involucra un cociente.

➤ **CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE COMBINADA EN LA CONCENTRACIÓN**

$U_c \text{ en } X = U_c * X \text{ mg/L}$, en donde X es el valor de la demanda bioquímica de oxígeno determinada en el proceso analítico.

➤ **CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE EXPANDIDA U Y EXPRESIÓN DEL RESULTADO FINAL**

Cálculo de la incertidumbre expandida: $U = 2.6 * U_c * X$

Expresión del resultado: $X \pm U \text{ mg/L}$, donde X es el valor de la demanda bioquímica de oxígeno determinada en el proceso analítico.

3.9.2 INCERTIDUMBRE PARA LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

Tabla 27. Calculo de la incertidumbre expandida U.

Fuente de Incertidumbre	Valores parciales de incertidumbre (Estándar, Combinada o Relativa)	
Medición volumen de la muestra	IER1	0.0014
Dilución de la muestra	IER2	0,0007
Medición oxígeno disuelto inicial	IER3	0.03
Medición oxígeno disuelto final	IER4	0.03
Incertidumbre combinada final Uc		0.04
Concentración del analito		X
Incertidumbre expandida U		$\pm K * X * 0.04$

La expresión general para la incertidumbre es $\pm K * X * 0.04$ donde K es un factor de 2.6 para un 95% de confianza (anexo 4), X es el valor de la muestra o analito y 0.04 es la incertidumbre combinada final.

4. CONCLUSIONES.

- Se estableció que los valores para los atributos de los métodos están basados en aquellos donde se presentó mayor coeficiente de variación, esto para dar un poco de holgura en la aplicación de los métodos, pero sin sobre pasar los criterios de calidad establecidos en el laboratorio.
- Se determinó que el límite de detección para el método yodométrico y electrométrico es de 1.6 mg O₂/L con base en los patrones de 1 mg O₂/L sembrados sin semilla.
- El límite de cuantificación para el método yodométrico y electrométrico es de 4.0 mg O₂/L de la siembra de los patrones de 1 mg O₂/L sin semilla.
- Para el coeficiente de variación del método yodométrico se estableció que será el de 3.9 por ser el de mayor valor.
- El coeficiente de variación para el método electrométrico es de 5.6 por presentar el de mayor valor.
- La carta inicial de control para el método yodométrico se calculó con los valores del estándar de 200 mg O₂/L sin semilla.

- Para el método electrométrico la carta de control se halló con los valores del estándar de 200 mg O₂/L sembrados sin semilla.
- Con el análisis de la varianza se puede decir que sí existe diferencia en las muestras sembradas con semilla y las que se sembraron sin semilla.
- Realizando el análisis de la varianza se establece que no existe diferencia entre los métodos yodométrico y electrométrico en la realización de la DBO₅.
- Se pudo establecer que las muestras para la determinación de la DBO₅ si presentan un alto grado de degradación con respecto al tiempo de almacenamiento, esto establece que la determinación se debe realizar en el menor tiempo posible para obtener un resultado confiable y tener en cuenta el periodo de almacenamiento recomendado en el estándar métodos.
- Con la realización de esta validación el laboratorio comprobó que puede aplicar estos métodos con resultados confiables y con criterios de calidad.
- Con la prueba de desempeño presentada ante el IDEAM se establece que el laboratorio de PSL PROANALISIS LTDA es competente en la emisión de resultados analíticos.

5. RECOMENDACIONES.

- El equipo lutron para la determinación del oxígeno disuelto se debe verificar y ajustar cada vez que se utilice.
- Verificar periódicamente el estado del material de vidrio utilizado en la realización de los ensayos analíticos.
- Se debe comprobar y ajustar la temperatura de incubación de las neveras para asegurar que esté dentro del rango óptimo de 20 ± 1 °C.
- El material de vidrio utilizado debe estar limpio y esterilizado, para que sustancias externas no afecten la prueba.
- El agua utilizada en la dilución de las muestras debe ser de alta calidad y fresca.
- Los reactivos utilizados deben ser de buena calidad y no presentar contaminación o presencia de partículas extrañas, que afecten la calidad de los análisis.
- se recomienda realizar duplicados para verificar la calidad de los análisis.
- Aplicar todos los criterios de calidad en la realización de los análisis para cumplir con la norma ISO 17025 y garantizar resultados confiables.

- Se recomienda utilizar inóculo o semilla en las muestras para garantizar unos buenos resultados.
- Se debe comprobar periódicamente los resultados de los análisis utilizando el método yodométrico y electromédico simultáneamente.

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. INCONTEC. Norma NTC ISO-ICE 17025 2001. Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración.
2. FRANK.N. manual del agua su naturaleza, tratamiento y aplicaciones. Tomo I, Mc Graw-Hill. Mexico, 1989.
3. J.RODIER, análisis de las aguas, Barcelona, ediciones Omega 1998.
4. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation. STANDART METHODS for the examination of water and wastewater. 21 th edition 2005, American Public Health Association 1015 Fifteenth Street. NW. Washington D.C.
5. Protocolo estandarización de métodos analíticos, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, Programa de Fisicoquímica Ambiental, 1999.
6. MONTGOMERY D. C (1991). Control estadístico de calidad. México, ALFAOMEGA grupo editorial iberoamerica S.A de C. V.
7. MILLER J. C. y MILLER J N. (1993). Estadística para química analítica. Segunda edición. Wilmington, Delaware, E. U. A. Addison-Wesley iberoamericana, S. A.

8. PEREZ. C. (1999). Control estadístico de calidad. México, ALFAOMEGA. Grupo editor S.A. de C. V.
9. DOUGLAS A. SKOOG. Análisis instrumental, Mc Graw-Hill, cuarta edición, 1994.
10. PEREZ. C (2002). Estadística aplicada a través de Excel. México, alfaomega grupo editor S. A. de C. V.
11. HERMAN E. manual de tratamiento de aguas negras. México, editorial limusa. 1994.
12. ROBERT O. KUELHL. Diseño de experimentos. México, THOMSON editores, segunda edición, 2001.
13. Guía para el aseguramiento de la calidad analítica en laboratorios de química ambiental, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM, Programa de Fisicoquímica Ambiental, 1999.
14. MURRAY R SPIEGEL. Probabilidad y estadística, Bogota, Mc Graw-Hill, segunda edición 2001.
15. EURACHEM/CITAC guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, second Edition.

Anexos.

Anexo 1. Principales fuentes de incertidumbre para la DBO₅.

Fuente de Incertidumbre	Obtención del valor numérico
Medición de la muestra	
Incertidumbre material volumétrico para la medición de la muestra	Esta incertidumbre se obtiene del valor μ indicado en el material volumétrico o en el certificado respectivo (debe ser suministrado por el proveedor) Incertidumbre estándar $u1 = \mu / (3)^{1/2}$ Se asume una distribución rectangular a menos que el fabricante indique otro tipo de distribución (nivel de confianza) diferente.
Efecto de la diferencia de la temperatura ambiente con la temperatura de calibración del material volumétrico usado	Se obtiene esta contribución a partir una variación estimada en la temperatura de 6°C, del coeficiente de expansión de volumen para el agua $2 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ y el volumen del material volumétrico utilizado para la medición de la muestra (x). Incertidumbre estándar $u2 = [x \cdot 6 \cdot 2 \cdot 10^{-4}] / (3)^{1/2}$ Se divide entre $(3)^{1/2}$ asumiendo una distribución rectangular.
Dispersión de las mediciones volumétricas (Verificación del material volumétrico)	Esta incertidumbre se obtiene a través de la desviación estándar (s) calculada a partir de la verificación del volumen (n=10 mediciones) del material volumétrico usado para medir la muestra. Incertidumbre estándar $u3 = s / (n)^{1/2}$
Incertidumbre combinada para medición volumen de muestra	$Uc\ 1\ (\text{volumen}) = [(u1)^2 + (u2)^2 + (u3)^2]^{1/2}$
Incertidumbre estándar relativa para medición volumen de muestra	IER 1 (volumen) = $Uc\ 1 / x$ Donde x es el volumen del material volumétrico

Dilución de la muestra (winkler)	
Efecto de la diferencia de la temperatura ambiente con la temperatura de calibración del winkler	Se obtiene esta contribución a partir una variación estimada en la temperatura de 6°C, del coeficiente de expansión de volumen para el agua $2 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ y el volumen del material volumétrico utilizado para la medición de la muestra (x). Incertidumbre estándar $u_4 = [x \cdot 6 \cdot 2 \cdot 10^{-4}] / (3)^{1/2}$ Se divide entre $(3)^{1/2}$ asumiendo una distribución rectangular.
Dispersión de las mediciones volumétricas (Verificación del volumen del winkler)	Esta incertidumbre se obtiene a través de la desviación estándar (s) calculada a partir de la verificación del volumen (n=10 mediciones) del material volumétrico usado para diluir la muestra. Incertidumbre estándar $u_5 = s / (n)^{1/2}$
Incertidumbre combinada para dilución	$Uc\ 2\ (\text{dilución}) = [(u_4)^2 + (u_5)^2]^{1/2}$
Incertidumbre estándar relativa para dilución de la muestra	IER 2 (dilución) = $Uc\ 2 / x$ Donde x es el volumen del material volumétrico (winkler)
Medición del oxígeno disuelto inicial	
Incertidumbre estándar relativa para medición oxígeno disuelto inicial	IER 3 (oxígeno inicial) = $Uc\ \text{final} / X$ En donde $Uc\ \text{final}$ es calculada en el procedimiento del anexo. X corresponde al valor promedio de oxígeno disuelto medido para determinar la desviación estándar de dichas mediciones
Incertidumbre estándar relativa para medición oxígeno disuelto final	IER 4 (oxígeno final) = IER 3 (oxígeno inicial)
Incubación de la muestra	
Tolerancia temperatura en el proceso de incubación	Esta incertidumbre se obtiene a partir de la tolerancia T en la temperatura de incubación de las muestras durante 5 días. Incertidumbre estándar $u_6 = T / (3)^{1/2}$

Incertidumbre estándar relativa de la tolerancia en la temperatura de incubación de las muestras	IER 5 (Tolerancia temperatura incubación) = $u_6 / 20$
Incertidumbre de la calibración incubadora	Esta incertidumbre se obtiene a partir del valor de incertidumbre μ reportado en el informe de calibración (verificación externa trazable) o en el certificado de calibración emitido por un proveedor idóneo. Incertidumbre estándar $u_7 = \mu / K$ Donde K es el factor de cobertura utilizado para calcular la incertidumbre expandida y reportado en el informe o certificado de calibración
Incertidumbre estándar relativa en la calibración de la incubadora	IER 6 (incertidumbre calibración incubadora) = $u_7 / 20$

u_i : Incertidumbre estándar de la fuente i

IER_i : Incertidumbre estándar relativa de la fuente i

U_c : Incertidumbre combinada de un grupo de fuentes

K = 2.6 para un nivel del 95% de confianza.

Anexo 2. Tabla de los valores críticos del estadístico t para el rechazo de datos.

Valores críticos del estadístico t para rechazo de datos.

n	95%	n	95%	n	95%	n	95%
3	1,15	11	2,24	19	2,53	27	2,69
4	1,46	12	2,29	20	2,56	28	2,71
5	1,67	13	2,33	21	2,58	29	2,72
6	1,82	14	2,37	22	2,6	30	2,74
7	1,94	15	2,41	23	2,62	40	2,87
8	2,03	16	2,44	24	2,64	50	2,96
9	2,11	17	2,47	25	2,66	60	3,03
10	2,18	18	2,50	26	2,67	100	3,21

Anexo 3. Tabla de valores de distribución para el t de student.

Tabla 1 Valores de la distribución t de student para un 99 % de confianza

gl	99%	gl	99%	gl	99%	gl	99%
1	31.82	11	2.72	21	2.52	40	2.42
2	6.96	12	2.68	22	2.51	50	2.4
3	4.54	13	2.65	23	2.5	60	2.39
4	3.75	14	2.62	24	2.49	70	2.38
5	3.36	15	2.6	25	2.48	80	2.37
6	3.14	16	2.58	26	2.48	90	2.37
7	3	17	2.57	27	2.47	100	2.36
8	2.9	18	2.55	28	2.47	∞	2.33
9	2.82	19	2.54	29	2.46		
10	2.76	20	2.53	30	2.46		

gl : grados de libertad

Anexo 4. Valores para el valor K de cobertura de un 95% de confianza, para un número de muestras iguales o inferiores a 6.

Table 1: Student's t for 95% confidence (2-tailed)

Degrees of freedom v	t
1	12.7
2	4.3
3	3.2
4	2.8
5	2.6
6	2.5

Anexo 5. Formulas utilizadas para hallar la DBO₅.

Puesto que la DBO nunca excede la DQO, se puede asumir que la DBO es un porcentaje (%) de la DQO.

Considerando la fórmula para calcular la DBO

$$mg / L DBO_5 = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

Donde: D1 = 9.0 mg/l (oxígeno de saturación del agua a 20°C)
D2 = 3.0 mg/l (óptimo nivel bajo de consumo de oxígeno)

Se tiene que:

$$P = \frac{\text{Volumen de la muestra en mL}}{\text{Volumen total}} \Rightarrow P = \frac{x}{300 \text{ mL}}$$

Puesto que la DBO = %DQO, entonces sustituyendo tenemos

$$\% DQO = \frac{9 - 3}{x / 300 \text{ mL}}$$

$$x = \frac{(9 - 3) 300 \text{ mL}}{\% DQO} = \frac{1800}{\% DQO}$$

Por lo tanto teniendo el valor de la DQO y asumiendo rangos de posibilidades de DBO (20, 40, 60 y 80 %) se puede calcular volúmenes adecuados para sembrar la muestra.

$$DBO_5 (mgO_2/L) = \frac{(OD_1 - OD_2) \times V_{\text{frasco}}}{V_{\text{muestra}}}$$

Donde:

OD₁ = Oxígeno disuelto de la muestra inmediatamente después de su preparación,
en mgO₂/L.

OD₂ = Oxígeno disuelto de la muestra después de 5 días de incubación a 20°C, en mg O₂/L.