

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”

TEMA:

IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DEL ENSAYO DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO MEDIANTE LA TÉCNICA COLORIMÉTRICA DE REFLUJO CERRADO EN AGUAS RESIDUALES.

AUTOR:

ANTHONY JOSUE FREIRE CASTRO

Guayaquil - Ecuador

2026

Resumen

La determinación confiable de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) constituye un elemento fundamental para el control operativo y ambiental de las aguas residuales. Este estudio tuvo como propósito implementar y verificar el método colorimétrico de reflujo cerrado conforme a Standard Methods 5220 D y ASTM D1252-06, garantizando su idoneidad bajo las condiciones específicas de un laboratorio de control de procesos en Guayaquil, Ecuador. Se desarrolló una investigación aplicada de enfoque cuantitativo y experimental, evaluando parámetros de desempeño tales como selectividad, límites de detección y cuantificación, linealidad, sensibilidad analítica, veracidad, precisión, estimación de la incertidumbre y robustez mediante diseño factorial. Los resultados evidenciaron comportamiento lineal adecuado dentro del intervalo de trabajo, cumplimiento de criterios estadísticos de precisión y recuperación, y una incertidumbre expandida acorde con los lineamientos de la guía EURACHEM y la norma ISO/IEC 17025. El estudio de robustez demostró estabilidad del método frente a pequeñas variaciones controladas en temperatura, tiempo de digestión y equipo utilizado. Finalmente, la aplicación en el monitoreo real del afluente confirmó la confiabilidad metrológica del procedimiento implementado, consolidando su uso rutinario y su potencial presentación ante procesos de acreditación.

Palabras clave: Demanda Química de Oxígeno, verificación de métodos, incertidumbre de medición, reflujo cerrado, control de calidad analítico.

Abstract

The reliable determination of Chemical Oxygen Demand (COD) is essential for operational control and environmental monitoring of wastewater treatment processes. This study aimed to implement and verify the closed reflux colorimetric method in accordance with Standard Methods 5220 D and ASTM D1252-06, ensuring its suitability under the specific operating conditions of a process control laboratory in Guayaquil, Ecuador. An applied, quantitative, and experimental research approach was adopted to evaluate key analytical performance parameters, including selectivity, limits of detection and quantification, linearity, analytical sensitivity, trueness, precision, measurement uncertainty, and robustness through a factorial design. The results demonstrated appropriate linear behavior within the working range, compliance with statistical acceptance criteria for precision and recovery, and expanded uncertainty values consistent with EURACHEM guidelines and ISO/IEC 17025 requirements. The robust assessment confirmed method stability under controlled variations in digestion temperature, reaction time, and digestion equipment. Finally, the application of the verified method to real influent monitoring confirmed its metrological reliability, supporting its routine implementation and potential accreditation within the laboratory quality management system.

Keywords: Chemical Oxygen Demand, method verification, measurement uncertainty, closed reflux, analytical quality control.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, por su amor, paciencia y apoyo inquebrantable en cada etapa de mi formación. A mis docentes y mentores, por compartir su conocimiento y fomentar en mí el compromiso con la ciencia, la precisión y la mejora continua. Este logro es reflejo del esfuerzo conjunto, la perseverancia y la pasión por el aprendizaje que me acompañan en cada desafío profesional.

AGRADECIMIENTO

A la Jefatura del Laboratorio, por brindarme el espacio, los recursos y la confianza para desarrollar el trabajo experimental que sustenta este proyecto. Extiendo mi sincero agradecimiento a mi tutor de tesis, por su orientación académica, su paciencia y su valioso acompañamiento durante todo el proceso. Su guía fue fundamental para alcanzar los objetivos propuestos y consolidar mi formación profesional.

Declaración Expresa

Yo Anthony Josue Freire Castro acuerdo y reconozco que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. El o los estudiantes deberán procurar en cualquier caso de cesión de sus derechos patrimoniales incluir una cláusula en la cesión que proteja la vigencia de la licencia aquí concedida a la ESPOL.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, secreto empresarial, derechos patrimoniales de autor sobre software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autores/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 10 de abril del 2026.

Ing. Anthony Josue
Freire Castro

EVALUADORES

Gerhard Sergio Gavilánez Delgado, MS.c.

TUTOR

Cesar Augusto Araque Molina, Ph.D.

EVALUADOR

Joel Vielma Puente, Ph.D.

PRESIDENTE

ABREVIATURAS O SIGLAS

DQO: Demanda Química de Oxígeno.

DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno.

O.D: Oxígeno disuelto

UV-VIS: Ultra violeta – visible.

L.O.D: Límite de detección.

L.O.Q: Límite de cuantificación.

EURACHEM: Red de organizaciones europeas de química analítica. 66

S.M: Standard methods for the examination of water and wastewater.

S.A.E: Servicio de Acreditación Ecuatoriano.

K.H.P: ftalato ácido de potasio.

C.V(%): coeficiente de variación.

RSD (%): Desviación estándar relativa.

R^2 : Coeficiente de determinación.

r : Coeficiente de correlación.

%RE: Error relativo.

MRC: Material de Referencia Certificado.

Cl^{-1} : Cloruros.

ANOVA: Análisis de varianza.

DOE: Diseño de experimento.

p-valor: probabilidad de que el estadístico estudiado F sea mayor al error tipo I de 5%.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	II
Abstract.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
Declaración Expresa	VI
ABREVIATURAS O SIGLAS.....	VIII
TABLA DE CONTENIDO	IX
LISTADO DE FIGURAS.....	XIII
LISTADO DE TABLAS.....	XIV
CAPÍTULO 1.....	49
1. INTRODUCCIÓN.....	49
1.1 Antecedentes	51
1.2 Descripción del problema	52
1.3 Objetivos.....	53
1.3.1 Objetivo General	53
1.3.2 Objetivo Específicos.....	53
1.4 Hipótesis	54
1.5 Alcance.....	54
CAPÍTULO 2.....	55
2. MARCO TEÓRICO.....	55
2.1 Calidad del Agua y Aguas residuales	55
2.1.1 Concepto de calidad del agua	55
2.1.2 Origen y clasificación de aguas residuales	56
2.1.3 Impactos ambientales de las descargas sin tratamiento.....	56
2.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	57
2.2.1 Definición de DQO	57
2.2.2 Fundamento químico del ensayo.....	57
2.2.3 Importancia de la DQO en plantas de tratamiento y monitoreo ambiental.....	58
2.3 Métodos para la determinación de la DQO	59
2.3.1 Método de reflujos abiertos (convencional).....	59
2.3.2 Método de reflujos cerrados (colorimétrico).....	59
2.3.3 Comparación entre ambos métodos	60

2.4	Técnica Colorimétrica con reflujo cerrado	60
2.4.1	Principio de reacción y desarrollo de color	60
2.4.2	Equipos y materiales utilizados	61
2.4.3	Ventajas operativas y ambientales	62
2.5	Verificación y Validación de Métodos Analíticos	63
2.5.1	Diferencia entre implementación, verificación y validación	63
2.5.2	Requisitos del Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE)	63
2.6	Parámetros de desempeño a evaluar	64
2.6.1	Selectividad	64
2.6.2	Límite de detección	64
2.6.3	Límite de cuantificación	65
2.6.4	Rango de trabajo o intervalo lineal.....	65
2.6.5	Linealidad	66
2.6.6	Sensibilidad Analítica	66
2.6.7	Veracidad	66
2.6.8	Precisión	67
2.6.8.2	Límites de precisión	68
2.6.9	Guía Internacional para validación/verificación (EURACHEM).....	68
2.7	Estimación de la Incertidumbre de la medición.....	70
2.7.1	Introducción	70
2.7.2	Fundamento teórico	71
2.7.3	Especificar el mensurando.....	71
2.7.4	Identificación de fuentes de incertidumbre	71
2.7.5	Cuantificación de los componentes	72
2.7.6	Combinación de componentes	73
2.7.7	Incertidumbre expandida	74
2.8	Estudio de Robustez del método.....	74
2.8.1	Definición de robustez	74
2.8.2	Factores para evaluar del método	74
2.8.3	Análisis factorial 23	75
2.9	Implementación de los resultados de la verificación para controles de rutina.	78
2.9.1	Control de BLANCO (ZERO de equipo)	78
2.9.2	Uso del límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)	78
2.9.3	Control de precisión y veracidad	80
2.9.4	Uso de la incertidumbre	81
CAPÍTULO 3	82

3. METODOLOGÍA.....	82
3.1 Enfoque de la investigación	82
3.1.1 Tipo de investigación	82
3.1.2 Diseño de investigación	83
3.2 Metodología	83
3.2.1 Variables	83
3.2.2 Diseño experimental.....	84
3.2.3 Recolección de datos	84
3.2.4 Análisis estadístico.....	51
CAPÍTULO 4.....	67
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1 Diseño del procedimiento específico de ensayo.	67
4.2 Evaluación de los criterios de calidad.	67
4.2.1 Selectividad Cualitativa.....	68
4.2.2 Selectividad Cuantitativa.....	72
4.2.3 Límite de Detección y de Cuantificación.....	74
4.2.4 Linealidad: Estudio de curva por día	78
4.2.5 Linealidad: Curva general	87
4.2.6 Sensibilidad analítica	91
4.2.7 Efecto matriz.....	92
4.3 Estudio de Exactitud	93
4.3.1 Veracidad: evaluación de sesgo	93
4.3.2 Precisión: repetibilidad y precisión intermedia	95
4.4 Estimación de la Incertidumbre	116
4.4.1 Nivel de 100 mg/L	116
4.4.2 Nivel de 300 mg/L	117
4.4.3 Nivel de 700 mg/L	118
4.4.4 Nivel de 1500 mg/L	119
4.5 Robustez.....	120
4.6 Declaración del método verificado.....	121
4.7 Aplicación de los resultados de la verificación en el monitoreo del Afluyente de una planta de tratamiento.	122
CAPÍTULO 5.....	125
5. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES	125
5.1 Conclusiones.....	125
5.2 Recomendaciones.....	126
6. Referencias	128

Apéndices y anexos	131
Anexo A. Procedimiento Estandarizado para la determinación del ensayo DQO	131
Anexo B. Declaración del método verificado	135
Anexo C. Material de Referencia Certificado.....	136
Anexo D. Certificados de Calibración Micropipeta	137
Anexo E. Certificado de Calibración Termo reactor	138
Anexo F. Certificado d calibración balanza analítica	139
Anexo G. Certificado de análisis del Cloruro de Sodio	140
Anexo H. Certificado de analisis del Ftalato acido de potasio.....	141

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Cálculo de la desviación estándar del blanco	65
Figura 2.2 Representación geométrica de un diseño factorial 2^3 . Cada vértice del cubo corresponde a una combinación única de los niveles bajo (-1) y alto(+1) de los tres factores.....	76
Figura 3.1 Diagrama de la cuantificación de DQO de acuerdo al SM-5220 D y ASTM D1252-06-2020	49
Figura 3.2 Diagrama de Ishikawa para la determinación de la Incertidumbre del método.....	51
Figura 3.3 Diagrama de dispersión entre la variable independiente y la respuesta analítica.....	52
Figura 3.4. Gráfico de residuos del modelo de regresión lineal.	53
Figura 3.5. Gráfico de probabilidad normal de los residuos.	54
Figura 3.6. Gráfica de interacción entre los factores A y B.....	54
Figura 4.1 Espectro de absorción del estándar de 500 mg/L de DQO	68
Figura 4.2 Comparación de espectros de absorción entre E500 y E500 con interferente de Cloruros	69
Figura 4.3 Comparación de espectros de absorción entre E500 y E500 con interferente de Sulfuros	71
Figura 4.4 Gráfico Q-Q de los residuos - Curva Día 1	79
Figura 4.5 Gráfico Q-Q de los residuos - Curva Día 2.....	79
Figura 4.6 Gráfico Q-Q de los residuos - Curva Día 3.....	80
Figura 4.7 Gráfico de residuos de la curva de calibración - Día 1.....	81
Figura 4.8 Gráfico de residuos de la curva de calibración - Día 2.....	81
Figura 4.9 Gráfico de residuos de la curva de calibración - Día 3.....	82
Figura 4.10 Curva de calibración del método - día 1	85
Figura 4.11 Curva de calibración del método - día 2.....	85
Figura 4.12 Curva de calibración del método - día 2.....	86
Figura 4.13 Gráfico de normalidad.....	87
Figura 4.14 Gráfico de variabilidad de residuos	88
Figura 4.15 Curva de calibración general para la determinación de DQO	90
Figura 4.16 Curvas de calibración obtenidas por calibración externa y por adición estándar	92
Figura 4.17 Gráfico de probabilidad normal – muestra cruda.....	97
Figura 4.18 Evaluación de los residuales en la matriz cruda.....	98
Figura 4.19 Gráfico de probabilidad Normal – matriz fortificada de 100 mg/L....	101
Figura 4.20 Evaluación de los residuales en la matriz fortificada de 100 mg/L ..	102
Figura 4.21 Gráfico de probabilidad Normal - matriz fortificada de 300 mg/L ...	105
Figura 4.22 Evaluación de los residuales en la matriz fortificada de 300 mg/L ..	106
Figura 4.23 Gráfico de probabilidad Normal - matriz fortificada de 700 mg/L	109
Figura 4.24 Evaluación de los residuales en la matriz fortificada de 700 mg/L ..	110
Figura 4.25 Gráfico de probabilidad Normal - matriz fortificada de 1500 mg/L..	113
Figura 4.26 Evaluación de los residuales en la matriz fortificada de 1500 mg/L	114

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Características operaciones entre métodos.....	60
Tabla 2.2 Diseño experimental con dos niveles (-1) y (+1) para cada factor	76
Tabla 3.1 Resumen de las pruebas de hipótesis sobre los estimadores de pendiente y ordenada	56
Tabla 3.2 Tabla de ANOVA para un Diseño completamente aleatorizado	60
Tabla 3.3 Regla de decisión	62
Tabla 3.4 Tabla de signos del diseño factorial 2^3	65
Tabla 3.5 ANOVA para el diseño 2^3	66
Tabla 4.1 Similitud del coseno entre el espectro E500 y E500 con cloruros añadidos.	71
Tabla 4.2 Similitud del coseno entre el espectro E500 y E500 con sulfuro añadido	72
Tabla 4.3. Evaluación de la selectividad cuantitativa del método frente a cloruros mediante ensayos de recuperación	73
Tabla 4.4 Estudio de blanco	74
Tabla 4.5 ANOVA del estudio de blanco	74
Tabla 4.6 Comprobación experimental del límite de detección (LOD).....	76
Tabla 4.7 Comprobación experimental del límite de cuantificación (LOQ)	77
Tabla 4.8 Prueba de Shapiro-Wilk aplicada a los residuos	78
Tabla 4.9 Prueba de White aplicada a los residuos	80
Tabla 4.10 Parámetros de regresión de las curvas de calibración.....	83
Tabla 4.11 ANOVA sobre la pendiente - Curva día 1	83
Tabla 4.12 ANOVA sobre la pendiente - Curva día 2	83
Tabla 4.13 ANOVA sobre la pendiente - Curva día 3	83
Tabla 4.14 Intervalos de confianza (95%) de los parámetros y la ordenada.....	84
Tabla 4.15 Prueba de S-W para normalidad de residuos	87
Tabla 4.16 Test de homocedasticidad.....	88
Tabla 4.17 Estadísticos globales de la regresión lineal de la curva general	89
Tabla 4.18 ANOVA del modelo de regresión lineal	89
Tabla 4.19 Coeficientes de la regresión lineal de la curva general	90
Tabla 4.20 Parámetros de regresión lineal obtenidos para la curva general y la curva con adición estándar	92
Tabla 4.21 Evaluación del efecto matriz mediante el intervalo de confianza del 90% del cociente de pendientes	93
Tabla 4.22 Evaluación de la veracidad del método mediante material de referencia certificado (MRC)	93
Tabla 4.23 Resumen estadístico de la evaluación del sesgo	94
Tabla 4.24 Resultados de DQO muestra cruda por día	95
Tabla 4.25 Prueba de Grubbs para detección de valores atípicos en la muestra cruda.....	96
Tabla 4.26 Análisis de varianza (ANOVA) de la muestra cruda.....	96
Tabla 4.27 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk - muestra cruda.....	97
Tabla 4.28 Prueba de Brown-Forsythe – Muestra cruda.....	98
Tabla 4.29 Resultados de DQO de la muestra de agua residual fortificada 100 mg/L	99

Tabla 4.30 Recuperación adimensional de DQO en muestra fortificada 100 mg/L	100
Tabla 4.31 ANOVA sobre las recuperaciones de la fortificación 100 mg/L	100
Tabla 4.32 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk – 100 mg/L	100
Tabla 4.33 Prueba de Brown-Forsythe– 100 mg/L	101
Tabla 4.34 Evaluación de la precisión en el nivel 100 mg/L	102
Tabla 4.35 Parámetros derivados de precisión en el nivel de 100 mg/L	103
Tabla 4.36 Resultados de DQO de la muestra de agua residual fortificada 300 mg/L	103
Tabla 4.37 Recuperación adimensional de DQO en muestra fortificada 300 mg/L	104
Tabla 4.38 ANOVA sobre las recuperaciones de la fortificación 300 mg/L	104
Tabla 4.39 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk – 300 mg/L	104
Tabla 4.40 Prueba de Brown-Forsythe – 300 mg/L	105
Tabla 4.41 Evaluación de la precisión en el nivel 300 mg/L	106
Tabla 4.42 Parámetros derivados de precisión en el nivel de 300 mg/L	107
Tabla 4.43 Resultados de DQO de la muestra de agua residual fortificada 700 mg/L	107
Tabla 4.44 Recuperación adimensional de DQO en muestra fortificada 700 mg/L	108
Tabla 4.45 ANOVA sobre las recuperaciones de la fortificación 700 mg/L	108
Tabla 4.46 Prueba de normalidad de Shapiro - Wilk - 700 mg/L	109
Tabla 4.47 Prueba de Brown - Forsythe - 700 mg/L	110
Tabla 4.48 Evaluación de la precisión en el nivel 700 mg/L	111
Tabla 4.49 Parámetros derivados de precisión en el nivel de 700 mg/L	111
Tabla 4.50 Resultados de DQO de la muestra de agua residual fortificada 1500 mg/L	112
Tabla 4.51 Recuperación adimensional de DQO en muestra fortificada 1500 mg/L	112
Tabla 4.52 ANOVA sobre las recuperaciones de la fortificación 1500 mg/L	113
Tabla 4.53 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk – 1500 mg/L	113
Tabla 4.54 Prueba de Brown-Forsythe – 1500 mg/L	114
Tabla 4.55 Evaluación de la precisión en el nivel 1500 mg/L	115
Tabla 4.56 Parámetros derivados de precisión en el nivel de 1500 mg/L	115
Tabla 4.57 Resumen del presupuesto de incertidumbre para DQO - Nivel 100 mg/L	116
Tabla 4.58 Incertidumbre combinada y expandida en el nivel de 100 mg/L	116
Tabla 4.59 Resumen del presupuesto de incertidumbre para DQO - Nivel 300 mg/L	117
Tabla 4.60 Incertidumbre combinada y expandida en el nivel de 300 mg/L	117
Tabla 4.61 Resumen del presupuesto de incertidumbre para DQO - Nivel 700 mg/L	118
Tabla 4.62 Incertidumbre combinada y expandida en el nivel de 700 mg/L	118
Tabla 4.63 Resumen del presupuesto de incertidumbre para DQO - Nivel 1500 mg/L	119
Tabla 4.64 Incertidumbre combinada y expandida en el nivel de 1500 mg/L	119
Tabla 4.65 Diseño experimental y niveles	120
Tabla 4.66 ANOVA factorial	120
Tabla 4.67 Resumen de efectos principales del estudio de robustez (2 ³)	121

Tabla 4.68 Resultados de blancos analíticos.....	122
Tabla 4.69 Control de calidad con estándares de DQO.....	122
Tabla 4.70 Resultados de DQO del punto de monitoreo.....	123
Tabla 4.71 Resultado reportado de DQO en afluente.....	124

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La creciente presión de la preservación sobre los recursos hídricos, derivada del aumento de las actividades domésticas e industriales, ha intensificado la necesidad de implementar sistemas confiables de monitoreo y control de la calidad del agua. En particular, las aguas residuales constituyen una de las principales fuentes de contaminación de los cuerpos receptores cuando no son tratadas y evaluadas adecuadamente, lo que genera impactos negativos sobre los ecosistemas acuáticos, la salud pública y el cumplimiento de la normativa ambiental vigente (Metcalf & Eddy et al., 2003).

Dentro de los parámetros más utilizados para la caracterización de la carga orgánica de las aguas residuales se encuentra la Demanda Química de Oxígeno (DQO), la cual permite cuantificar la cantidad de materia orgánica e inorgánica susceptible de ser oxidada químicamente. Este parámetro es ampliamente empleado en plantas de tratamiento y laboratorios de control ambiental debido a su rapidez, reproducibilidad y utilidad para el control operativo de procesos, así como para la evaluación del cumplimiento de límites regulatorios (American Public Health Association (APHA), 2023).

Tradicionalmente, la determinación de la DQO se ha realizado mediante el método de refluo abierto, el cual es considerado el método de referencia. No obstante, esta técnica presenta desventajas operativas relacionadas con el uso de grandes volúmenes de reactivos peligrosos, mayor residuos y riesgos asociados a la manipulación de ácidos concentrados. En respuesta a estas limitaciones, el método colorimétrico de refluo cerrado se ha desarrollado como una alternativa que promete eficiencia, responsabilidad ambiental y resultados confiables mediante la espectrofotometría UV-visible. (American Public Health Association (APHA), 2023).

Sin embargo, la adopción de un método normalizado no garantiza por sí misma la confiabilidad de los resultados. De acuerdo con los lineamientos de la norma ISO/IEC 17025:2018 del SAE, todo laboratorio que implemente un método debe demostrar, mediante evidencia objetiva, que este funciona adecuadamente bajo

sus condiciones específicas de operación. En este contexto, la verificación del método se convierte en un requisito indispensable para asegurar la validez metrológica de los resultados, especialmente cuando estos son utilizados para la toma de decisiones ambientales, operativas o regulatorias (Servicio de Acreditación Ecuatoriano, 2021).

El problema que aborda el presente trabajo radica en la necesidad de implementar y verificar el método colorimétrico de reflujo cerrado para la determinación de la DQO en aguas residuales, garantizando que sus parámetros de desempeño analítico cumplan con los criterios establecidos por normas y guías técnicas reconocidas. La ausencia de una verificación adecuada puede conducir a resultados inexactos o no trazables, afectando la confiabilidad del monitoreo de procesos de tratamiento y el cumplimiento de la normativa ambiental.

La importancia de este estudio se fundamenta en su contribución al fortalecimiento de los sistemas de aseguramiento de la calidad analítica en el laboratorio de control de procesos. Asimismo, su justificación se apoya en antecedentes reportados en la literatura técnica, donde diversos autores han demostrado la necesidad de validar y verificar métodos analíticos para la determinación de DQO, como requisito previo para su aplicación rutinaria y su presentación ante organismos de acreditación (Gavi, 2021; Jácome, 2014; Zumba, 2018). De igual manera, la guía EURACHEM establece los criterios técnicos y estadísticos para la evaluación del desempeño de métodos analíticos, enfatizando la estimación como elemento clave de la trazabilidad y confiabilidad de los resultados (EURACHEM, 2014).

Desde el punto de vista metodológico, el presente trabajo se desarrolla bajo un enfoque de investigación aplicada, de tipo cuantitativo y experimental. La estrategia utilizada combina el análisis documental de normas técnicas y guías internacionales, como Standard Methods 5220 D, ASTM D1252-06 y EURACHEM con la ejecución de ensayos experimentales en laboratorio, diseñados para evaluar de manera sistemática los parámetros de desempeño del método bajo condiciones controladas. De esta forma, se busca generar evidencia técnica que respalde la implementación del método colorimétrico de reflujo cerrado y su eventual acreditación conforme a los requisitos del Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE).

En conjunto, esta investigación contribuye a garantizar la confiabilidad, trazabilidad y calidad metrológica de los resultados de DQO, promoviendo prácticas analíticas alineadas con estándares internacionales y con las exigencias actuales del control ambiental y la gestión integral de laboratorios de química.

1.1 Antecedentes

La DQO es un parámetro esencial en el análisis de aguas residuales, es utilizado universalmente para cuantificar la concentración de materia orgánica presente en una muestra. La confianza en los resultados obtenidos por los laboratorios de control de procesos es fundamental para garantizar decisiones en la gestión ambiental y operativa.

En primer lugar Rodríguez & Zapata (2023) realizaron una validación del método colorimétrico de reflujo cerrado para determinar la DQO en aguas residuales domésticas. Evaluaron parámetros como exactitud, precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación, cumplimiento con los criterios de aceptación establecidos por el organismo nacional de Nicaragua, obteniendo una incertidumbre expandida de 0.97 mg O_2 /L con un factor de cobertura k con un nivel de 95 % de confianza.

Seguidamente Paucar (2022) llevó a cabo la validación del método HACH 8000 en el laboratorio ABGES, enfocándose en la determinación de DQO en muestras de agua potable, el método fue validado pero la autora afirma que los resultados no son del todo confiables porque los equipos utilizados no se encontraban calibrados.

Por otra parte Zumba (2018) validó en nivel bajo, medio y alto el método de ensayo para DQO en aguas, siguiendo procedimientos específicos del "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", y los resultados cumplieron con los criterios de validación establecidos, indicando que el método es válido y puede presentarse para acreditación ante el SAE.

A continuación, Jácome (2014) realizó la validación del método para la determinación de DQO en diferentes rangos de concentración para el rango medio de 100 mg/L a 1500 mg/L con una incertidumbre obtenida de 9% cuyos coeficientes

de repetibilidad y reproducibilidad menores al 5%, los resultados demostraron que el método cumple con los parámetros de validación establecidos.

Por último, un trabajo muy importante de revisar es el de Gavi (2021) quien validó el ensayo de DQO en aguas de consumo, natural, residual y lixiviado empleando la metodología 8000 HACH para un intervalo de trabajo de 100 a 1500 mg/L de DQO, demostrando el cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos tales como CV_R y $CV_r \leq 5\%$, sesgo $\leq 10\%$ y una incertidumbre $U \leq 20\%$.

En efecto, estos estudios subrayan la importancia de desarrollar y ejecutar planes de validación para los métodos de DQO en laboratorios de control de procesos. La implementación de procedimientos validados no solo mejora la confianza en los resultados, sino que también es esencial para obtener acreditaciones internacionales, asegurando así la fiabilidad en los resultados presentados.

1.2 Descripción del problema

El incremento en la descarga de aguas residuales procedentes de actividades domésticas e industriales ha generado la necesidad de realizar evaluaciones cada vez más rigurosas sobre su impacto ambiental. Entre los parámetros fundamentales para determinar la carga orgánica presente en estos efluentes se encuentra la Demanda Química de Oxígeno (DQO), la cual cuantifica la cantidad de materia orgánica susceptible de ser oxidada químicamente.

Tradicionalmente, la determinación de la DQO se ha efectuado mediante el método de reflujo abierto, una técnica efectiva pero que demanda el uso de mayores volúmenes de reactivos peligrosos y una manipulación más compleja, incrementando los riesgos para el personal y el ambiente. En respuesta a estas limitaciones, la técnica colorimétrica de reflujo cerrado se presenta como una alternativa más segura, eficiente y ambientalmente responsable. Este método reduce el consumo de reactivos, minimiza la exposición a compuestos tóxicos y agiliza el análisis al incorporar la lectura espectrofotométrica.

No obstante, para asegurar la confiabilidad de los resultados generados por esta técnica, es imprescindible su implementación y verificación adecuada conforme a

los lineamientos establecidos por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE), ello implica la evaluación de los parámetros de desempeño.

La falta de una correcta aplicación del método puede conducir a resultados inexactos que afecten la toma de decisiones en procesos de tratamiento de aguas y en el cumplimiento de la normativa ambiental vigente. Este problema repercute directamente en laboratorios de monitoreo ambiental, operadores de plantas de tratamiento y autoridades reguladoras, que dependen de datos analíticos para proteger los cuerpos hídricos y garantizar la salud pública.

En consecuencia, la situación descrita no se limita únicamente a la aplicación de una técnica analítica, sino que abarca la necesidad de asegurar su funcionamiento con personal capacitado y recursos adecuados. De esta manera se plantea la siguiente interrogante ¿el método colorimétrico ASTM D1252-06 y Standard Methods 5220D de reflujo cerrado es adecuado para la cuantificación de la demanda química de oxígeno en aguas residuales domésticas?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Implementar y verificar el ensayo de Demanda Química de Oxígeno (DQO) mediante la técnica colorimétrica de reflujo cerrado en aguas residuales con el propósito de garantizar la confiabilidad de los resultados y su aplicación efectiva en el control y monitoreo de la calidad del agua.

1.3.2 Objetivo Específicos

1. Establecer las condiciones óptimas de trabajo para la implementación del ensayo de DQO mediante la técnica colorimétrica de reflujo cerrado con la metodología ASTM D1252-06 y Standard Methods 5220D.
2. Determinar los parámetros como selectividad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), intervalo de trabajo incluyendo linealidad, sensibilidad analítica del método conforme a los requisitos del Servicio de Acreditación Ecuatoriana (SAE).

3. Evaluar la veracidad y precisión del método conforme a criterios establecido en la guía EURACHEM.
4. Estimar la incertidumbre asociada a la medición de DQO con el fin de garantizar la trazabilidad y la confiabilidad de los resultados analíticos.
5. Realizar un estudio de robustez del método frente a influencias externas como variaciones en la temperatura de digestión, tiempo de reacción y diferentes equipos de digestión para con el propósito de evaluar su estabilidad bajo estas pequeñas variaciones en las condiciones de trabajo.
6. Evaluar indicadores de desempeño del método para controles de rutina.

1.4 Hipótesis

La implementación del método colorimétrico de reflujo cerrado para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno en aguas residuales, bajo condiciones controladas de operación y mediante la verificación de sus parámetros analíticos, permitirá obtener resultados confiables, reproducibles y trazables.

1.5 Alcance

El presente proyecto se desarrollará en la ciudad de Guayaquil, Ecuador, en el Laboratorio de Control de Procesos de una Ptar, y estará enfocado en la implementación y verificación del método colorimétrico de reflujo cerrado para la determinación de la DQO en muestras de aguas residuales.

El estudio abarcará la evaluación de los principales parámetros de desempeño analítico, incluyendo exactitud, precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación, estimación de la incertidumbre y robustez. Además, se documentará el procedimiento verificado con base en los resultados obtenidos, y finalmente el monitoreo del afluente de una planta de lodos activados para producción de agua de servicio durante el mes de Noviembre.

El proyecto tendrá una duración estimada de seis meses, comprendidos entre julio y diciembre de 2025, periodo durante el cual se llevarán a cabo las etapas de implementación, pruebas experimentales, análisis de datos y documentación técnica.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Calidad del Agua y Aguas residuales

2.1.1 Concepto de calidad del agua

La calidad del agua se define como el conjunto de características físicas, químicas y biológicas que determinan su idoneidad para un uso determinado. Según (Metcalf & Eddy et al., 2003) la calidad del agua depende de las condiciones naturales y de las actividades humanas que alteran su composición.

En el contexto del tratamiento de aguas residuales, la calidad se evalúa mediante parámetros que indican el grado de contaminación y la necesidad de depuración. (Metcalf & Eddy et al., 2003) clasifican los parámetros de calidad del agua en tres grupos principales:

- **Parámetros físicos:** temperatura, color, olor, sabor, turbidez y sólidos (suspendidos, disueltos, totales y sedimentables).
- **Parámetros químicos:** pH, oxígeno disuelto (OD), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO), nutrientes (nitrógeno y fósforo) y presencia de sustancias tóxicas.
- **Parámetros biológicos:** bacterias, virus, protozoos y otros organismos indicadores de contaminación fecal.

2.1.2 Origen y clasificación de aguas residuales

Las aguas residuales son aquellas que resultan del uso del agua en actividades domésticas, industriales o comerciales, y que contienen sustancias disueltas o suspendidas que alteran sus propiedades naturales (Metcalf & Eddy et al., 2003).

Su composición depende del origen y del tipo de uso que se haya dado al agua, por lo que su tratamiento requiere una caracterización previa. Según (Metcalf & Eddy et al., 2003) las aguas residuales se clasifican según su origen en las siguientes categorías:

1. **Aguas residuales domésticas o sanitarias:** procedentes de viviendas, instituciones y establecimientos públicos. Contienen materia orgánica biodegradable, grasas, detergentes, microorganismos patógenos y sólidos suspendidos.
2. **Aguas residuales industriales:** generadas por los procesos productivos, con características variables según el tipo de industria; pueden incluir metales pesados, solventes y compuestos orgánicos persistentes (Metcalf & Eddy et al., 2003).
3. **Aguas residuales agrícolas:** provienen del uso de fertilizantes, pesticidas y del drenaje de suelos de cultivo (Metcalf & Eddy et al., 2003).

2.1.3 Impactos ambientales de las descargas sin tratamiento

El vertido de aguas residuales sin tratamiento genera efectos negativos sobre el medio ambiente, la salud pública y los ecosistemas acuáticos (Metcalf & Eddy et al., 2003). destacan que la magnitud del impacto depende de la cantidad y del tipo de contaminantes vertidos, así como de la capacidad de autodepuración del cuerpo receptor.

Entre los principales impactos ambientales mencionados por los autores se encuentran:

1. **Degradación de la calidad del agua:** el vertido directo de materia orgánica incrementa la DBO y reduce el oxígeno disuelto, provocando condiciones

anaerobias y la muerte de organismos acuáticos (Metcalf & Eddy et al., 2003).

- 2. Eutrofización:** el exceso de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, estimula el crecimiento excesivo de algas y macrófitos, alterando el equilibrio ecológico y afectando la vida acuática (Metcalf & Eddy et al., 2003).
- 3. Toxicidad y bioacumulación:** compuestos como los metales pesados y sustancias orgánicas persistentes pueden acumularse en los organismos acuáticos y transmitirse a lo largo de la cadena trófica (Metcalf & Eddy et al., 2003).
- 4. Propagación de enfermedades:** los microorganismos patógenos presentes en aguas residuales no tratadas pueden contaminar fuentes de agua potable y causar brotes de enfermedades infecciosas (Metcalf & Eddy et al., 2003).

2.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

2.2.1 Definición de DQO

La DQO es un parámetro utilizado para estimar la cantidad total de materia orgánica presente en una muestra de agua residual, mediante la determinación del oxígeno equivalente necesario para su oxidación química. Este indicador incluye no solo la fracción biodegradable de la materia orgánica, sino también aquellos compuestos orgánicos y algunos inorgánicos que pueden ser oxidados químicamente, lo que permite obtener una medida global de la carga contaminante del agua (Ramalho, 1983).

Debido a que la DQO se basa en un proceso químico y no biológico, su determinación es rápida y reproducible, lo que la convierte en una herramienta empleada ampliamente dentro del control operativo de las plantas de tratamiento, caracterización de aguas residuales y la evaluación de descargas. (R. R. Jairo, 2010)

2.2.2 Fundamento químico del ensayo

El ensayo de DQO se fundamenta en la oxidación de la materia orgánica presente en el agua residual mediante un agente oxidante fuerte, comúnmente el dicromato

de potasio, en un medio fuertemente ácido. Durante el proceso, los compuestos orgánicos son oxidados hasta productos finales estables, principalmente dióxido de carbono y agua, mientras que el cromo hexavalente (Cr^{+6}) es reducido a como trivalente (Cr^{+3}). La cantidad de oxidante consumido es directamente proporcional a la concentración de materia orgánica presente en la muestra (Ramalho, 1983).

Para asegurar una oxidación eficiente, el ensayo se realiza generalmente bajo condiciones de reflujo y a temperatura elevada, utilizando ácido sulfúrico como medio de reacción. El sulfato de plata actúa como catalizador, facilitando la oxidación de compuestos orgánicos de difícil degradación, mientras que el sulfato de mercurio se emplea para eliminar la interferencia causada por los cloruros. Una vez completada de la digestión, la determinación del dicromato remanente, mediante titulación o métodos colorimétricos, permite calcular la DQO expresada como oxígeno equivalente, consolidando así un método robusto y ampliamente aceptado para la evaluación de la contaminación orgánica en aguas residuales (R. R. Jairo, 2010)

2.2.3 Importancia de la DQO en plantas de tratamiento y monitoreo ambiental

La DQO es un parámetro clave en el diseño, operación y control de las plantas de tratamiento de aguas residuales, así como en el monitoreo de la calidad ambiental de los cuerpos receptores. Según (Metcalf & Eddy et al., 2003), la DQO se utiliza para:

1. Evaluar la carga contaminante afluente
2. Controlar la eficiencia del tratamiento:
3. Monitorear cuerpos receptores:

Además, su determinación rápida la convierte en una herramienta esencial para la toma de decisiones operativas y para la vigilancia ambiental continua de vertidos industriales y municipales.

2.3 Métodos para la determinación de la DQO

2.3.1 Método de reflujo abierto (convencional)

Desarrollado según el Standard Methods 5220 B, este procedimiento implica la digestión de la muestra durante dos horas con exceso de dicromato, ácido sulfúrico concentrado, sulfato de mercurio (eliminar la interferencia del cloruro) y sulfato de plata como catalizador. La reacción se realiza bajo reflujo para evitar pérdidas por evaporación, y el exceso de oxidante se titula posteriormente con sulfato ferroso amoniacal de acuerdo con la reacción (2.1)



Aunque preciso, este método presenta desventajas: requiere manipulación de ácidos concentrados, genera grandes volúmenes de residuos peligrosos y es lento (American Public Health Association (APHA), 2023).

2.3.2 Método de reflujo cerrado (colorimétrico)

El método de reflujo cerrado fue desarrollado como una alternativa más segura, rápida y ambientalmente sostenible. Este método también utiliza dicromato de potasio como oxidante, pero la digestión se realiza dentro de tubos sellados o viales herméticos de vidrio, que contienen todos los reactivos premezclados (Metcalf & Eddy et al., 2003).

2.3.3 Comparación entre ambos métodos

Tabla 2.1 Características operaciones entre métodos

Característica	Reflujo Abierto	Reflujo cerrado (colorimétrico)
Seguridad	Alto riesgo por vapores ácidos y mercurio	Bajo riesgo, sistema sellado
Tiempo	4 – 6 h en total	2-3 h en total
Residuos Generados	Altos (Cr^{6+} , Hg^{2+} , ácidos)	Muy bajos
Costo Operativo	Bajo por muestra pero alto en la gestión de residuos	Moderado
Exactitud	Alta es el método de referencia	Alta (generalmente un coeficiente de correlación $r > 0.98$)
Sostenibilidad	Baja por la generación excesiva de residuos tóxicos	Alta mínima impacto ambiental
Equipos requeridos	Sistema de reflujo y equipo de titulación	Termo reactor y espectrofotómetro

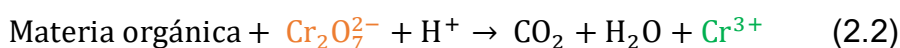
Nota: Adaptado del (American Public Health Association (APHA), 2023)

2.4 Técnica Colorimétrica con reflujo cerrado

2.4.1 Principio de reacción y desarrollo de color

El método colorimétrico de DQO por reflujo cerrado se fundamenta en la oxidación química de la materia orgánica mediante dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en medio fuertemente ácido (H_2SO_4), dentro de viales herméticamente sellados. Durante la digestión, el ion dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) actúa como oxidante, reduciéndose a ion cromo (III) (Cr^{3+}) a medida que oxida los compuestos orgánicos presentes en la muestra (American Public Health Association (APHA), 2023).

La ecuación simplificada que representa la reacción química está dada por la ecuación 2.2



El ion Cr^{3+} formado tiene un color verde intenso, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de materia orgánica oxidada. Por tanto, la absorbancia de la solución

medida a una longitud de onda característica ($\lambda = 600 \text{ nm}$) se relaciona directamente con la concentración de oxígeno químicamente demandado (American Public Health Association (APHA), 2023)

Este principio analítico se fundamenta en la Ley de Bouguer Beer-Lambert, la cual establece que la absorbancia (A) es proporcional a la concentración (c) del analito, la longitud del trayecto óptico (b) y el coeficiente de absorción molar (ϵ) del compuesto medido como lo indica la ecuación 2.3

$$A = \epsilon bc \quad (2.3)$$

Según (Skoog et al., 2016), esta relación constituye la base de la espectrofotometría cuantitativa moderna, permitiendo que la intensidad del color (absorbancia) sea utilizada para calcular la concentración de un componente químico en solución.

En el caso del ensayo de DQO, la absorbancia del ion Cr^{3+} se mide mediante un espectrofotómetro UV-Vis calibrado previamente con soluciones patrón de ftalato ácido de potasio (KHP), un compuesto orgánico estable y de pureza conocida (American Public Health Association (APHA), 2023). De esta manera, el instrumento usa la señal analítica absorbancia para convertirla en miligramos de oxígeno por litro ($\text{mg O}_2/\text{L}$) mediante la curva de calibración lineal obtenida bajo las mismas condiciones de digestión.

2.4.2 Equipos y materiales utilizados

El método de DQO colorimétrica requiere equipamiento especializado que garantice precisión, repetibilidad y seguridad. Los principales equipos y materiales son los siguientes:

- 1. Termorreactor o bloque digestor:** dispositivo que mantiene los viales sellados a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h, asegurando la oxidación completa de la materia orgánica (American Public Health Association (APHA), 2023)).
- 2. Espectrofotómetro UV-Vis:** equipo utilizado para medir la absorbancia del ion Cr^{3+} a una longitud de onda determinada ($\sim 600 \text{ nm}$) (Skoog et al., 2016).

3. **Viales premezclados o sellados:** tubos de vidrio que contienen volúmenes precisos de ácido sulfúrico, dicromato y catalizadores. Al ser herméticos, reducen la exposición a vapores y minimizan errores de manipulación (American Public Health Association (APHA), 2023).
4. **Soluciones patrón de ftalato ácido de potasio (KHP):** se utilizan para la curva de calibración y para verificar la exactitud del método, ya que el KHP tiene una demanda química de oxígeno conocida ($1 \text{ mg KHP} = 1.171 \text{ mg O}_2$) (American Public Health Association (APHA), 2023).

El conjunto de estos instrumentos asegura un análisis confiable, seguro y estandarizado en concordancia con los protocolos internacionales de calidad analítica.

2.4.3 Ventajas operativas y ambientales

El método de reflujado cerrado ofrece ventajas significativas frente al método convencional en términos de operatividad, seguridad y sostenibilidad ambiental. Según (American Public Health Association (APHA), 2023), el uso de viales sellados reduce drásticamente el contacto del analista con ácido sulfúrico concentrado y cromo hexavalente (Cr^{6+}), ambos altamente corrosivos y tóxicos. Esto disminuye el riesgo de inhalación de vapores ácidos y quemaduras químicas, promoviendo un entorno de trabajo más seguro.

Asimismo, el volumen de reactivos por muestra es mucho menor que en el método abierto, lo que reduce hasta en un 90 % la generación de residuos peligrosos (American Public Health Association (APHA), 2023). Estos residuos, confinados dentro de los viales, pueden gestionarse como desechos cerrados, minimizando la exposición del personal y del ambiente.

Desde el punto de vista analítico, (Skoog et al., 2016) destaca que el método colorimétrico permite mediciones más rápidas y reproducibles, al eliminar pasos de titulación manual y al aplicar principios espectrofotométricos con alta sensibilidad.

En consecuencia, este enfoque representa un avance hacia un análisis verde:

- Menor consumo de reactivos peligrosos.
- Reducción de emisiones y residuos peligrosos.

- Seguridad para el personal de laboratorio.
- Optimización en el tiempo y recursos.

2.5 Verificación y Validación de Métodos Analíticos

2.5.1 Diferencia entre implementación, verificación y validación

La Implementación de un método analítico de acuerdo a los criterios del Servicio de Acreditación Ecuatoriano (2021) es poner en uso un método en el laboratorio: documentarlo, entrenar al personal, instalar/calibrar equipos, definir el intervalo de trabajo y comenzar a aplicarlo bajo control.

La definición de verificación de acuerdo al Centro Español de Metrología (2012) es aportar evidencia objetiva de que un elemento satisface los requisitos especificados.

Por otra parte una verificación es la que se confirma que los requisitos especificados son adecuados para el uso previsto; es decir, demuestra idoneidad para el propósito.

Finalmente la EURACHEM (2014) indica que cuando un laboratorio adopta un método ya normalizado, el trabajo básico de validación suele existir, pero se debe verificar que funciona en sus condiciones en el laboratorio.

2.5.2 Requisitos del Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE)

El documento oficial del SAE (CR GA01 R07) aclara cómo cumplir ISO/IEC 17025:2018 en selección y verificación de métodos

El SAE exige mantener métodos bajo control conforme a criterios de aseguramiento y, según el tipo de ensayo, evaluar características de desempeño (LOD, LOQ, intervalo/linealidad, veracidad, precisión, incertidumbre, robustez). el laboratorio debe verificar que el método cumple los requisitos de desempeño bajo sus condiciones y conservar registros.

2.6 Parámetros de desempeño a evaluar

2.6.1 Selectividad

La selectividad evalúa la capacidad del método para medir el analito de interés sin interferencias significativas de otras sustancias presentes en la matriz, tales como impurezas, productos de degradación o componentes del solvente. Un método selectivo permite distinguir la señal del analito frente a señales de interferentes. Durante la verificación, puede comprobarse mediante la comparación de espectros, cromatogramas o señales analíticas entre muestras fortificadas, muestras en blanco y muestras reales (EURACHEM, 2014).

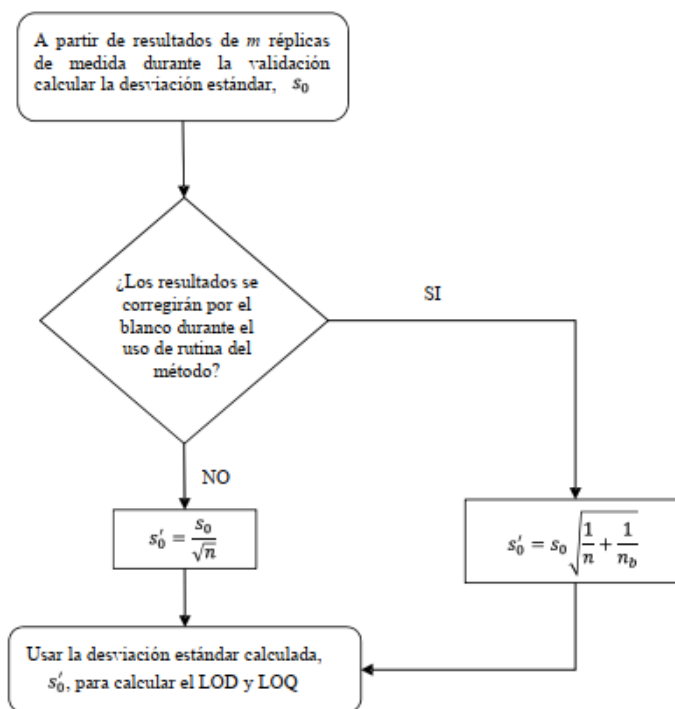
2.6.2 Límite de detección

El límite de detección representa la mínima cantidad de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada con precisión adecuada. Se expresa en la misma unidad que la concentración del analito.

Según Eurachem, puede determinarse experimentalmente a partir de la desviación estándar de la respuesta del blanco (s'_0) y la pendiente de la curva de calibración (m), aplicando la ecuación 2.4

$$\text{LOD} = \frac{3s'_0}{m} \quad (2.4)$$

Para determinar la desviación estándar del blanco seguiremos el diagrama de flujo de acuerdo con la figura 2.1. Este parámetro es crucial para asegurar que el método posee la sensibilidad necesaria para el propósito analítico.



s_0 es la desviación estándar estimada de m resultados individuales en o cerca de concentración cero.
 s'_0 es la desviación estándar usada para calcular LOD y LOQ.
 n es el número de réplicas de observación promediadas cuando se informan resultados donde cada réplica es obtenida siguiendo enteramente el procedimiento de medición.
 n_b es el número de observaciones de blanco promediadas cuando se calcula la corrección del blanco de acuerdo al procedimiento de medición.

Figura 2.1 Cálculo de la desviación estándar del blanco

2.6.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración más baja del analito que puede ser cuantificada con una precisión y exactitud aceptables. Se calcula de forma similar al LOD, pero aplicando un factor de 10, y la desviación estándar del blanco es el mismo que se obtiene de acuerdo con la figura 2.1. Este parámetro define el punto mínimo del rango de trabajo válido del método.

$$LOQ = 10 \frac{s'_0}{m} \quad (2.5)$$

2.6.4 Rango de trabajo o intervalo lineal

Define el intervalo de concentraciones en el cual el método produce resultados confiables con adecuada precisión, veracidad y linealidad. Debe abarcar desde el LOQ hasta el valor máximo en que el detector o el instrumento mantienen respuesta lineal. Durante la verificación, se construye una curva de calibración y se evalúa la

correlación lineal ($r \geq 0,995$), así como otros parámetros estadísticos (EURACHEM, 2014)

2.6.5 Linealidad

La linealidad mide qué tan proporcional es la respuesta instrumental con respecto a la concentración del analito. Se evalúa generalmente mediante una regresión lineal de los datos de calibración.

Además del coeficiente de correlación (r), Eurachem sugiere revisar el intercepto, la pendiente y la distribución de los residuos. Una buena linealidad implica que el método responde de forma predecible dentro del rango de interés analítico (EURACHEM, 2014)

2.6.6 Sensibilidad Analítica

Es la variación de la respuesta de un equipo instrumental ante un cambio en la entrada es decir matemáticamente se expresa con la ecuación 2.6 y es la pendiente de la curva de calibración que relaciona la señal del equipo (absorbancia) con la concentración (mg/L).

$$m = \frac{\Delta y \text{ (señal del equipo)}}{\Delta x \text{ (concentración)}} \quad (2.6)$$

2.6.7 Veracidad

2.6.7.1 Evaluación del Sesgo

El sesgo (bias) se calcula como la diferencia entre el valor promedio de los resultados obtenidos por el método en verificación y el valor de referencia aceptado. Puede expresarse en valor absoluto, relativo o en recuperación, según las unidades del analito, como se logra apreciar en la ecuación 2.7 y 2.8 respectivamente.

$$\text{Sesgo (b)} = \bar{X} - X_{\text{ref}} \quad (2.7)$$

$$\text{Sesgo relativo, b (\%)} = \frac{\bar{X} - X_{\text{ref}}}{X_{\text{ref}}} \times 100 \quad (2.8)$$

donde:

- \bar{X} = promedio de los resultados experimentales,
- X_{ref} = valor verdadero o valor certificado del material de referencia.

Fuentes comunes de sesgo

- Errores sistemáticos en el instrumento.
- Reactivos contaminados o degradados.
- Pérdidas de analito durante la preparación de la muestra.
- Procedimientos no estandarizados o condiciones mal controladas.

2.6.8 Precisión

La precisión describe el grado de dispersión de los resultados entre mediciones repetidas bajo condiciones definidas. Cuanto menor sea la variabilidad entre los valores obtenidos, mayor será la precisión del método.

La precisión refleja errores aleatorios, no sistemáticos; por tanto, un método puede ser muy preciso aunque no sea veraz (es decir, todas las mediciones muy juntas, pero alejadas del valor verdadero) (EURACHEM, 2014).

2.6.8.1 Evaluación de la precisión

La precisión se cuantifica mediante la desviación estándar (s) o el coeficiente de variación (CV o RSD %) como indica la ecuación 2.9

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.9)$$

donde:

- s = desviación estándar de los resultados,
- \bar{X} = media aritmética.

La Guía Eurachem distingue tres niveles de precisión según las condiciones de repetición:

a) Repetibilidad

Corresponde a la variabilidad bajo condiciones idénticas: mismo analista, mismo equipo, mismo día y mismas condiciones ambientales. Evalúa la estabilidad a corto plazo del método. Generalmente se realizan entre 6 y 10 réplicas para determinar el RSD.

b) Precisión intermedia

Evalúa la variabilidad dentro del mismo laboratorio, pero considerando cambios deliberados: diferentes días, operadores, equipos o lotes de reactivos. Permite estimar la estabilidad del método en el tiempo y su reproducibilidad operacional interna.

c) Reproducibilidad

Representa la variación obtenida cuando el método se aplica en diferentes laboratorios, bajo condiciones nominalmente equivalentes. Se determina en estudios Inter laboratorio y es clave en la validación colaborativa de métodos normalizados.

2.6.8.2 Límites de precisión

La desviación estándar obtenida del estudio de precisión, s_r (repetibilidad) y s_R (reproducibilidad) o s_L (precisión intermedia), permite al analista con un nivel de confianza del 95 % definir si la diferencia entre resultados por duplicado de una misma muestra obtenida en condiciones establecidas es o no significativo.

El límite de repetividad (r) se calcula con la ecuación 2.10

$$r = 2.8 \times s_r \quad (2.10)$$

Y el de reproducibilidad (R) se calcula igual que la ecuación 2.10 sustituyendo s_r por s_R (EURACHEM, 2014).

2.6.9 Guía Internacional para validación/verificación (EURACHEM)

La guía se organiza en capítulos que abordan las etapas del proceso de validación, desde la planificación hasta la evaluación de resultados, y presenta de manera práctica el uso de tablas, ecuaciones y criterios de aceptación. Estas herramientas permiten documentar de forma cuantitativa la idoneidad metrológica de un método analítico, ya sea nuevo, modificado o adoptado de fuentes normativas existentes (EURACHEM, 2014).

El enfoque teórico de Eurachem se basa en la metodología estadística aplicada, donde las tablas y ecuaciones proporcionan los medios para estimar, evaluar y

comparar las principales características de desempeño de un método: precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), entre otros (EURACHEM, 2014)

- **Uso teórico de las tablas**

Las tablas de la guía EURACHEM no son meramente ilustrativas; sirven como formatos de trabajo estandarizados para recopilar, analizar y reportar datos de validación.

En ellas se especifica:

- El parámetro evaluado.
- El procedimiento de cálculo.
- Los criterios de aceptación recomendados.
- Las fuentes de incertidumbre relevantes.

El laboratorio utiliza estas tablas como plantillas metodológicas, que luego adapta a su propio sistema de gestión. De este modo, se garantiza la trazabilidad estadística y la comparabilidad entre laboratorios.

Por ejemplo, para la evaluación de linealidad, EURACHEM sugiere tablas que recogen los valores de concentración, respuesta instrumental, residuales y coeficientes de regresión, junto con su análisis de varianza y desviaciones respecto al modelo teórico.

- **Uso teórico de las ecuaciones**

Las ecuaciones presentadas en EURACHEM constituyen el fundamento para calcular los parámetros de desempeño. Cada ecuación está acompañada de su explicación estadística y de las condiciones en las que su aplicación es válida.

Algunos ejemplos teóricos de aplicación incluyen:

- Ecuación de regresión lineal: para evaluar la relación entre concentración y señal (principio de la Ley de Beer-Lambert en métodos espectrofotométricos).
- Ecuaciones para LOD y LOQ: derivadas de la desviación estándar del blanco o de niveles bajos del analito.

- Cálculo de precisión: mediante la varianza y el coeficiente de variación (%RSD) en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

Estas ecuaciones permiten cuantificar el comportamiento sistemático y aleatorio del método, brindando evidencia objetiva de su desempeño estadístico.

- **Criterios de aceptación**

La guía EURACHEM propone que los criterios de aceptación se establezcan a priori, antes de iniciar los ensayos experimentales, para asegurar la objetividad y evitar sesgos. Dichos criterios dependen del tipo de matriz, concentración esperada, nivel de riesgo y requisitos del cliente o normativa.

Ejemplos típicos de criterios incluyen:

- Linealidad: coeficiente de determinación (R^2) $\geq 0,995$.
- Repetibilidad: RSD ≤ 5 % para concentraciones medias.
- Recuperación: 90–110 % para estándares de control.

EURACHEM enfatiza que los criterios deben ser realistas y basados en el uso previsto, y no en valores absolutos. El propósito es demostrar que el método cumple con los requisitos de desempeño para su aplicación analítica, no necesariamente que alcance la perfección metrológica.

2.7 Estimación de la Incertidumbre de la medición

2.7.1 Introducción

La incertidumbre de la medición constituye un parámetro esencial en la evaluación de la calidad de los resultados analíticos. De acuerdo con la Guía Eurachem (2025), la incertidumbre representa un intervalo dentro del cual se espera que se encuentre el valor verdadero del mensurando, con una probabilidad o nivel de confianza determinado.

Este concepto no pretende eliminar los errores, sino cuantificar la magnitud de las posibles desviaciones generadas por las diversas fuentes de variabilidad del proceso analítico, como el muestreo, la calibración, la instrumentación, las condiciones ambientales o la intervención del analista (EURACHEM, 2014).

2.7.2 Fundamento teórico

Eurachem adopta los principios del Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM, JCGM 100:2008), el cual define la incertidumbre como una estimación cuantitativa de la dispersión de los valores que podrían razonablemente atribuirse a un mensurando. (EURACHEM/CITAC, 2012)

El proceso de estimación de la incertidumbre se estructura en tres etapas principales:

1. Especificar el mensurando.
2. Identificación de las fuentes de incertidumbre.
3. Cuantificación los componentes de la incertidumbre.
4. Calcular la incertidumbre combinada.

2.7.3 Especificar el mensurando

En el marco de la estimación de la incertidumbre, la definición del mensurando debe formularse de manera clara, precisa y sin ambigüedades, indicando exactamente qué se pretende medir. Asimismo, es necesario establecer una expresión cuantitativa que relacione el valor del mensurando con los distintos parámetros de los que depende, los cuales pueden incluir otros mensurados, variables no medidas directamente o constantes físicas.

Toda esta información debe encontrarse documentada en el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) correspondiente, garantizando la trazabilidad y la coherencia del proceso de medición (EURACHEM/CITAC, 2012) .

2.7.4 Identificación de fuentes de incertidumbre

El primer paso consiste en reconocer todas las fuentes relevantes que pueden contribuir a la variabilidad del resultado final. Entre las más habituales se incluyen:

- Muestreo: representatividad, homogeneidad y conservación de la muestra.
- Preparación de la muestra: errores en pesadas, diluciones o pérdidas del analito.
- Instrumentación: calibración, deriva, estabilidad o resolución del detector.

- Curva de calibración: pendiente, intercepto y ajuste del modelo.
- Factores ambientales: temperatura, presión y humedad.
- Repetibilidad: variabilidad bajo condiciones idénticas.

Eurachem recomienda organizar esta información mediante un diagrama de causa-efecto (Ishikawa), con el fin de visualizar las etapas críticas del proceso y priorizar los factores dominantes (EURACHEM/CITAC, 2012).

2.7.5 Cuantificación de los componentes

Cada fuente identificada debe expresarse como una incertidumbre estándar, que representa su contribución a la variabilidad del resultado. Estas pueden obtenerse por dos vías:

- **Tipo A:** derivadas de datos experimentales mediante análisis estadístico (por ejemplo, desviación estándar de repeticiones), como se muestra a continuación

$$u(x_i) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} \quad (2.11)$$

Donde s es la desviación estándar de las n repeticiones.

- **Tipo B:** basadas en información no estadística, como certificados de calibración, especificaciones del fabricante o referencias bibliográficas.

2.7.5.1 Distribución rectangular (uniforme)

Se aplica cuando solo se conocen límites ($\pm a$) y no hay evidencia de que un valor dentro del intervalo se más probable que otro; por ejemplo, tolerancias del fabricante o certificados que entregan límites sin aclarar nivel de confianza. Si el valor verdadero puede estar entre $x - a$ y $x + a$ rango total es $2a$, entonces la incertidumbre estándar esta descrita por la ecuación 2.12 (EURACHEM/CITAC, 2012).

$$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (2.12)$$

2.7.5.2 Incertidumbre debida al patrón o instrumento calibrado

La incertidumbre típica se obtiene dividiendo la incertidumbre expandida dada en el certificado de calibración del patrón por el factor de cobertura indicado k

$$u(p) = \frac{U(p)}{k} \quad (2.13)$$

2.7.5.3 Incertidumbre de la curva de calibración

Eurachem indica que, en práctica rutinaria, la contribución dominante suele venir de la variabilidad en y (tanto en los puntos de calibración como en la lectura de la muestra), y propone estimar la incertidumbre de x_{pred} debida a esa variabilidad usando la desviación estándar residual del ajuste (EURACHEM/CITAC, 2012).

La incertidumbre estándar de la concentración estimada por la curva debida a la variación aleatoria en y se expresa como:

$$u(x_{pred}, y) = \frac{S}{b_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{pred} - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \quad (2.14)$$

Donde:

- S : desviación estándar residual del ajuste, $S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (y_j - (b_0 + b_1 x_j))^2}{n-2}}$ (2.15)
- b_1 : pendiente de la curva,
- p : número de mediciones (réplicas) realizadas para la muestra (para obtener y_{obs}),
- n : número total de mediciones usadas para construir la curva,
- \bar{x} : concentración promedio de los patrones
- $S_{xx} = \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2$ (2.16)

2.7.6 Combinación de componentes

La incertidumbre combinada (u_c) se obtiene integrando las contribuciones individuales de cada fuente mediante la propagación de la varianza:

$$u_{c,rel}(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{u_i}{y}\right)^2} \quad (2.17)$$

donde:

- u_i/y : incertidumbre estándar relativa de cada componente (adimensional),
- $u_c(y)$: incertidumbre combinada relativa del mensurando,
- n : número total de fuentes de incertidumbre consideradas.

La incertidumbre combinada absoluta $u_c(y)$ puede obtenerse posteriormente multiplicando la incertidumbre combinada relativa por el valor del mensurando, según la relación 2.13

$$u_c(y) = y \cdot u_{c,rel}(y) \quad (2.18)$$

En la mayoría de los métodos analíticos se asume que las variables son independientes; por tanto, los términos de covarianza pueden omitirse salvo que exista evidencia de correlación entre fuentes (EURACHEM/CITAC, 2012).

2.7.7 Incertidumbre expandida

La incertidumbre expandida (U) define el rango dentro del cual se espera encontrar el valor verdadero con un nivel de confianza determinado. Se calcula multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura (k) como se expresa en la ecuación 2.19 (EURACHEM/CITAC, 2012).

$$U = k \cdot u_c \quad (2.19)$$

Eurachem recomienda emplear $k = 2$, equivalente a un nivel de confianza del 95 %. El resultado final debe reportarse de la siguiente forma

$$C = x \pm U \quad (2.20)$$

2.8 Estudio de Robustez del método

2.8.1 Definición de robustez

La robustez se define como esa habilidad que tiene el método analítico para mantener sus características de desempeño ante cualquier pequeñas sean estas de variaciones intencionales durante la ejecución de este. La guía Eurachem señala que evaluar este aspecto permite al laboratorio identificar cuales factores son críticos de monitorear y asegurar para que el método produzca resultados confiables (EURACHEM, 2014)

2.8.2 Factores para evaluar del método

1.- Temperatura de digestión. – El método colorimétrico de DQO de reflujo cerrado del S.M especifica claramente una temperatura de 150 ± 2 °C, es decir permite establecer levemente una variación ± 2 °C, esto nos permitirá ver la eficiencia de la oxidación química del ion dicromático a ion crómico.

2.- Tiempo de reacción. – El método define un tiempo de digestión muy claro de 2 horas, pero ensayar tiempos ligeramente mayores o menores ayudará a estudiar si la formación del cromóforo depende del tiempo total de oxidación.

3.- Diferentes marcas de digestores. - Esto permitirá evaluar si un equipo de diferente marca, variación instrumental, diseño, uniformidad térmica afecta al desempeño del método.

2.8.3 Análisis factorial 2^3

2.8.3.1 Fundamento del análisis factorial en estudios de robustez.

En los estudios de robustez de métodos analíticos no se busca optimizar una respuesta, sino evaluar la sensibilidad del método frente a pequeñas variaciones deliberadas en las condiciones operativas. Para este propósito, la guía EURACHEM recomienda el uso de diseño factoriales, ya que permiten analizar simultáneamente varios factores y sus posibles interacciones con un número reducido de experimentos, manteniendo un alto poder explicativo.

El diseño factorial completo 2^k es uno de los más utilizados cuando cada factor se evalúa en dos niveles, denominados nivel bajo (-1) y nivel alto(+1). En particular, el diseño factorial 2^3 evalúa tres factores, cada uno en dos niveles, dando lugar a ocho combinaciones experimentales. Este enfoque resulta especialmente adecuado para estudios de robustez (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008)

2.8.3.2 Representación conceptual del diseño factorial 2^3 .

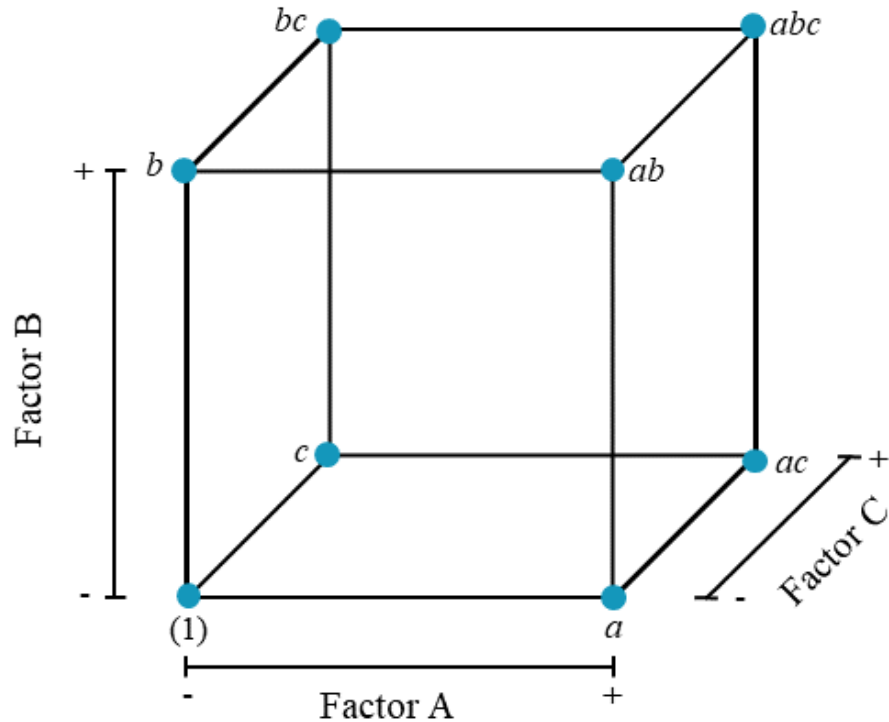


Figura 2.2 Representación geométrica de un diseño factorial 2^3 . Cada vértice del cubo corresponde a una combinación única de los niveles bajo (-1) y alto(+1) de los tres factores.

2.8.3.3 Matriz experimental del diseño 2^3 .

Un diseño factorial 2^3 completo consta de ocho corridas experimentales, que corresponden a todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores A, B y C:

Tabla 2.2 Diseño experimental con dos niveles (-1) y (+1) para cada factor

Corrida	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Nota: Adoptado del (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008)

Cada corrida representa un conjunto específico de condiciones bajo las cuales se mide la variable de respuesta (mg DQO/L). Para mejorar la estimación de la

variabilidad experimental, estas corridas pueden realizarse con réplicas, lo que permite posteriormente aplicar análisis de varianza (Montgomery et al., 2006).

2.8.3.4 Modelo estadístico del diseño factorial 2^3 .

El modelo matemático que describe un diseño factorial 2^3 puede expresarse como:

$$Y = \beta_0 + \beta_A A + \beta_B B + \beta_C C + \beta_{AB} AB + \beta_{AC} AC + \beta_{BC} BC + \beta_{ABC} ABC + \varepsilon \quad (2.21)$$

Donde:

- Y : variable de respuesta (mg DQO/L),
- β_0 : media general,
- $\beta_A, \beta_B, \beta_C$: efectos principales,
- $\beta_{AB}, \beta_{AC}, \beta_{BC}$: interacciones dobles,
- β_{ABC} : interacción triple,
- ε : error experimental

Este modelo permite cuantificar no solo el efecto individual de cada factor, sino también cómo el efecto de un factor depende del nivel de otro, lo cual es esencial en estudios de robustez (Montgomery et al., 2006).

2.8.3.5 Efectos principales e interacciones.

2.8.3.5.1 Efectos principales

Un efecto principal mide el cambio promedio en la respuesta cuando un factor pasa de su nivel bajo (-1) a su nivel alto (+1), manteniendo constantes los demás factores. Matemáticamente el efecto principal de un factor A se calcula como:

$$E_A = \bar{Y}_{A+} - \bar{Y}_{A-} \quad (2.22)$$

Donde \bar{Y}_{A+} y \bar{Y}_{A-} representan los promedios de la respuesta en los niveles alto y bajo del factor, respectivamente (Montgomery et al., 2006).

2.8.3.5.2 Interacciones

Una interacción ocurre cuando el efecto de un factor depende del nivel de otro. Por ejemplo, una interacción AB indica que el efecto de la temperatura de digestión depende del tiempo de digestión. La detección de interacciones es una de las principales ventajas del diseño factorial frente a los estudios de un factor a la vez (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008)

2.8.3.6 Interpretación en el contexto de robustez del método.

Desde el punto de vista de la robustez, el diseño factorial 2^3 permite:

1. Identificar cuales factores deben ser estrictamente controlados.
2. Detectar combinaciones de factores que puedan comprometer el desempeño del método.
3. Confirmar que pequeñas variaciones operativas no afectan significativamente la medición de DQO.

Si ningún efecto principal ni interacción resulta significativo, el método se considera robusto dentro del intervalo de variación estudiado. Por el contrario, la presencia de efectos significativo indica la necesidad de reforzar el control de dichas variables en el procedimiento normalizado de trabajo (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

2.9 Implementación de los resultados de la verificación para controles de rutina.

Conforme a lo que señala la ISO 17025, el laboratorio deberá tener un procedimiento para monitorear la validez de los resultados y debe incluir técnicas estadísticas para detectar tendencias. Además, la guía de Eurachem señala que “los datos de validación deben servir también para diseñar el control de calidad interno” (es decir, en rutina) (EURACHEM, 2014)

2.9.1 Control de BLANCO (ZERO de equipo)

El vial que se usa para encerrar el equipo llamado ZERO puede ser usado una ya otra vez para diferentes mediciones usando un mismo lote de viales, pero se debe medir la absorbancia del vial en blanco a lo largo del tiempo y prepare un nuevo vial de blanco (ZERO) cuando la absorbancia cambie en 0.01 unidades de absorbancia (American Public Health Association (APHA), 2023)

2.9.2 Uso del límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Los parámetros LOD y LOQ son fundamentales en el control de rutina ya que delimitan el rango operacional del método.

En rutina, debe incluirse la ejecución del blanco de método con cada lote o cada día de análisis, según se haya definido. Esto garantiza que el resultado final de la medición de la muestra tenga como componente de error la contribución del blanco adecuadamente controlada, y no se liberen valores sesgados por contaminación o señal de fondo elevada.

De acuerdo al valor de la muestra versus los valores de L.O.D y L.O.Q se deberá de tomar las siguientes acciones

1. Resultado < L.O.D

El analito no puede diferenciarse de forma fiable, y la posibilidad de que lo que se midió sea solamente ruido. En el reporte se debe indicar como “< LOD” o no detectado.

2. Resultado entre L.O.D y L.O.Q

En este rango el analito puede detectarse pero no puede cuantificarse con precisión y exactitud del método. Se debe reportar como <L.O.Q

3. Resultado \geq LOQ

Se puede reportar el valor cuantitativo normal como indica la ecuación 2.14, pero se debe de asegurar que el método en ese rango cumple con los criterios de precisión y demás requisitos de la verificación/validación.

Cuando se hace un blanco de método este representa la respuesta del método en ausencia del analito y es importante controlar que ese valor sea siempre < L.O.Q, si el resultado supera al L.O.Q esto implica que:

1. Hay contaminación significativa en los reactivos, materiales o equipo.
2. El método está fuera de control.
3. Todos los resultados del lote quedan comprometidos porque no puede distinguirse cuanto del valor reportado de la muestra es el analito real y cual es producto de la contaminación.

2.9.2.1 Acciones inmediatas cuando el blanco > L.O.Q

- a) **No reportar los resultados del lote:** se deberá de detener la emisión de resultados asociados a ese lote y tratar esta desviación como un trabajo no conforme.
- b) **Investigar la causa:** evaluar las posibles fuentes de contaminación, en este caso podía usar un diagrama de Ishikawa, la técnica de los 5 porques, entre otras técnicas.
- c) **Repetir el blanco y las muestras:** Se deberá preparar un nuevo blanco de método y si el nuevo blanco está en control, repetir las muestras. Si vuelve a dar > L.O.Q se deberá detener el método y realizar una limpieza completa o mantenimiento del instrumento.
- d) **Registrar y documentar:** De acuerdo a la ISO 17025 numeral 7.10.3 indica que se debe conservar los registros cuando existan no conformidades y las acciones correctivas tomadas para solucionarlas.

2.9.3 Control de precisión y veracidad

El control de precisión mide la variabilidad del método a corto y largo plazo. En DQO, esta variabilidad puede provenir del sistema de digestión, la temperatura, el tiempo de refluj o lectura espectrofotométrica.

¿Cómo se controla?

1. Repetición de muestras duplicadas
2. Cálculo del %RPD (Relative Percent Difference) entre duplicados:

$$RPD = \frac{|C_1 - C_2|}{\frac{(C_1 + C_2)}{2}} \times 100 \quad (2.15)$$

Donde C_1 y C_2 son las concentraciones obtenidas (mg O₂/L).

Los límites de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos en la verificación nos ayudarán a establecer valores máximos de aceptación donde se aceptará el duplicado si el RPD (%) $\leq CV\%_{m\acute{a}x}$. En cada nivel se obtuvo el r y R respectivamente son los límites de repetibilidad y reproducibilidad, se dividirá para

ese límite para el valor nominal correspondiente al nivel estudiado y de esa forma se obtendrá el coeficiente de variación (%) máximo.

La veracidad (o exactitud) se evalúa comparando los resultados del laboratorio con un material de referencia certificado (MRC) o una solución patrón conocida, este valor debe estar dentro de los límites del % recuperación de cada nivel obtenido en el estudio.

2.9.4 Uso de la incertidumbre

El uso de la incertidumbre en los reportes de rutina tiene tres fines principales:

1. Aportar trazabilidad metrológica al resultado.
2. Demostrar competencia técnica
3. Respaldar decisiones regulatorias.

La ISO 17025 numeral 7.8.6.1 exige declarar la *regla de decisión* usada, Por tanto:

- Si $x + U > Límite$: resultado inseguro o no conforme.
- Si $x - U > Límite$: resultado claramente no conforme.
- Si $x + U \leq Límite$: resultado conforme con confianza $\geq 95 \%$.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

El presente proyecto se clasifica como una investigación del tipo aplicada, debido a que su meta es implementar y verificar el método colorimétrico de refluo cerrado para la cuantificación de la DQO en aguas residuales. La finalidad del estudio es aportar una solución técnicamente confiable fortaleciendo los procesos de control de calidad del agua.

El trabajo también incorpora un componente documental, ya que requiere del análisis de normas técnicas, libros y guías de validación, entre ellas el Standard Methods, la guía Eurachem que fundamentan la verificación del método.

Asimismo, constituye una investigación de laboratorio, pues la obtención de los resultados se efectuará bajo condiciones controladas, siguiendo procedimiento analíticos estandarizados y utilizando equipos específicos como digestores de refluo cerrado y sistemas espectrofotométricos.

En cuanto a su enfoque, la investigación se considera cuantitativa-experimental, en el sentido de que se basa en la generación y análisis de datos numéricos obtenidos mediante procedimientos repetibles. El estudio experimental se orienta a evaluar sistemáticamente los parámetros analíticos del método —como linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y estabilidad— a través de ensayos diseñados para medir el rendimiento del procedimiento bajo condiciones definidas y replicables.

Esta aproximación permite obtener evidencia objetiva que respalde la confiabilidad del método para su implementación en el laboratorio. Respecto al nivel de conocimiento, el estudio se sitúa en un nivel descriptivo-explicativo. Es descriptivo porque detalla su desempeño en términos de precisión, exactitud, linealidad, robustez y otros parámetros de verificación.

3.1.2 Diseño de investigación

El diseño en este estudio es de tipo experimental, ya que para el proceso de implementar y verificación el método colorimétrico de reflujo cerrado para la determinación de la DQO requiere la manipulación controlada de condiciones analíticas con el fin de evaluar su efecto sobre el desempeño del procedimiento analítico.

La elección de este tipo de diseño se justifica porque los objetivos del estudio tanto general como específicos exigen generar evidencia cuantitativa y objetiva sobre el comportamiento del método. Para ello, es necesario ejecutar pruebas estadísticas planificadas que permiten analizar la respuesta del método y contrastarla con los criterios establecidos en el Standard Methods, Eurachem y las exigencias del SAE.

Este diseño experimental también permite verificar parámetros como veracidad, precisión, sensibilidad, límites operativos, incertidumbre y robustez, los cuales solo pueden evaluarse mediante ensayos formales, control de condiciones y comparándolos frente a criterios establecidos. Así, el uso de ese diseño es coherente con la necesidad de garantizar que el método implementado cumpla con los requisitos de validez metrológica para su aplicación rutinaria en un laboratorio.

Asimismo, el enfoque experimental se ajusta al quinto objetivo específico, que considera la evaluación de la robustez del método frente a pequeñas variaciones controladas, su análisis es posible únicamente dentro de un diseño estadístico experimental. En conjunto, el diseño seleccionado demuestra ser el más adecuado para responder al problema de la investigación y asegurar que la implementación del método de DQO sea confiable, reproducible y alineado con estándares internacionales.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables

3.2.1.1 *Variable independiente*

Concentración teórica de Demanda Química de Oxígeno (DQO), expresada en mg/L.

3.2.1.2 Variable dependiente

Resultados obtenidos de la medición de la concentración de DQO, expresados en mg/L, determinados mediante la técnica colorimétrica de refluo cerrado.

3.2.2 Diseño experimental

El diseño experimental se estableció con el objetivo de evaluar el desempeño analítico del método colorimétrico de refluo cerrado para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), de acuerdo con los lineamientos establecidos por el Servicio de Acreditación Ecuatoriano (SAE), la norma NTE INEN ISO/IEC 17025:2018 y las guías EURACHEM aplicables a la validación y verificación de métodos analíticos.

El diseño se basa en ensayos planificados para cada parámetro de desempeño que de acuerdo a los criterios del SAE, son los siguientes:

- Selectividad
- L.O.D y L.O.Q
- Intervalo de trabajo
- Linealidad
- Sensibilidad analítica
- Veracidad: sesgo
- Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)
- Robustez

Cada parámetro constituye un conjunto experimental independiente, diseñado conforme a lo establecido en el Standard Methods y la guía Eurachem.

3.2.3 Recolección de datos

3.2.3.1 Métodos y técnicas

En esta sección se describen los procedimientos analíticos y técnicas empleadas para obtener los datos necesarios en el proceso de verificación del método. La recolección de información se llevó a cabo mediante la ejecución de pruebas experimentales específicas, diseñadas para evaluar cada uno de los parámetros de desempeño establecidos.

Técnica para la determinación de la DQO.

Este apartado tiene objetivo asegurar que el procedimiento colorimétrico de refluo cerrado para la cuantificación de DQO funcione correctamente antes de iniciar la etapa de verificación formal. En esta etapa de la implementación se llevó a cabo utilizando viales premezclados Hach de rango alto, espectrofotómetro UV-VIS y un termo reactor Hach DRB200 como equipos principales (American Public Health Association (APHA), 2023), las acciones desarrolladas fueron:

- a. Preparación del patrón primario (KHP):** se adquirió ftalato ácido de potasio (KHP) con pureza certificada, utilizado como patrón primario reconocido para DQO conforme lo indica Standard Methods 5220 D y la ASTM D1252 – 06 (reapproved 2020). Se preparó una solución madre a concentración conocida y a partir de esta solución preparar las diferentes concentraciones de los puntos de calibración de la curva.
- b. Uso de viales premezclados Hach (High Range):** Se emplearon viales sellados con reactivos pre dosificados, los cuales contienen todos los componentes necesarios para la digestión, y reacción colorimétrica. Este sistema cerrado garantiza:
 - Seguridad en la manipulación,
 - Consistencia química entre ensayos.
- c. Preparación y verificación del espectrofotómetro:**
 - Se enciende, estabiliza y configura el espectrofotómetro asignado al análisis de DQO.
 - Se verificación los parámetros esenciales: selección correcta de la longitud de onda especificada por el método para DQO HR.
 - Revisión del ZERO y comprobación de la estabilidad del detector.El equipo fue programado en el modo correspondiente para lectura de DQO HR.
- d. Implementación del procedimiento analítico**
 - Se tomó una muestra del ingreso de la Ptar según los lineamientos del Standard Methods para la colección y preservación.
 - Se homogeneiza y se añade un volumen exacto de 2 mL de muestra, estándares y/o blanco reactivo con una micropipeta a los viales codificados con el tipo de muestra.

- Se mezcla adecuadamente mediante agitación manual, y se colocaron los viales en el digestor a 150°C durante 2 horas, siguiendo el método oficial de DQO en reflujo cerrado.

Luego enfriar a temperatura ambiente, se procedió a leer directamente la absorbancia en el espectrofotómetro.

A continuación, en la figura 3.1 se presenta un diagrama de flujo estandarizado del método analítico para la cuantificación de DQO mediante la digestión de reflujo cerrado y posterior lectura colorimétrica, siguiendo los lineamientos del (American Public Health Association (APHA), 2023; ASTM International, 2020)

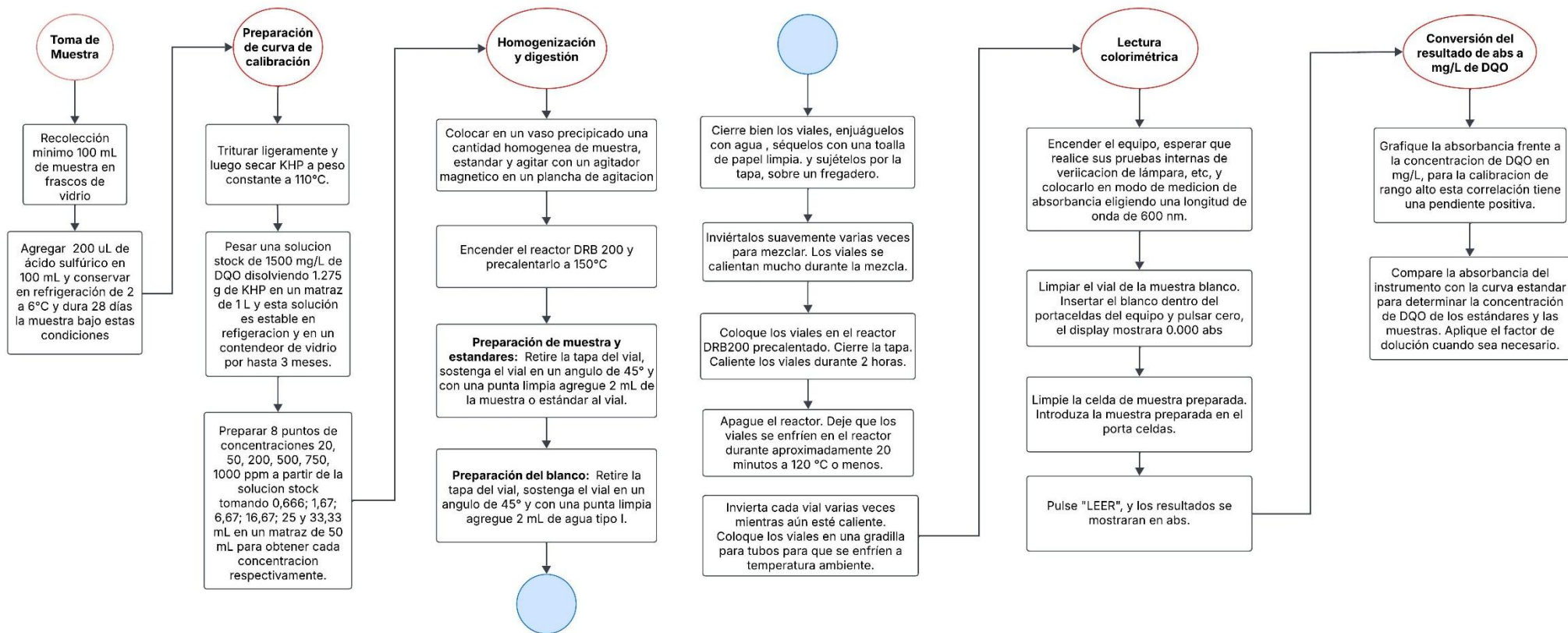


Figura 3.1 Diagrama de la cuantificación de DQO de acuerdo al SM-5220 D y ASTM D1252-06-2020

Determinación de parámetros de evaluación

Selectividad

Interferencias: Se evaluó la capacidad del método para identificar el cromóforo (ion crómico, Cr^{3+}) que surge de la reacción de oxidación del patrón primario KHP con el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).

Se analizaron muestras sin matriz orgánica añadida (blancos), muestra fortificada con el KHP y muestras con KHP pero con el interferente de cloruros añadido en varios niveles, verificando que la señal colorimétrica corresponda únicamente al analito objetivo.

Efecto matriz: En esta prueba se tomó una muestra de efluente de la Ptar y se procedió con la construcción de la curva de calibración por adición de estándar, para evaluar las pendientes.

Aplicación

Selectividad cualitativa: Se registraron espectros de absorción dentro del rango de 550 a 670 nm de longitud de onda con el estándar de KHP "E500" mg/L de DQO, blanco y estándar + interferente, estos barridos espectrales se hicieron por duplicados. Las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro Hach DR 6000, utilizando una resolución espectral de 1 nm. Los espectros obtenidos fueron comparados visualmente y mediante el criterio matemático de la similitud del coseno de acuerdo con la ecuación 3.1, para verificar que la señal analítica del analito no presentara interferencias espectrales relevantes.

$$\text{Similitud de coseno} = \cos(\theta) = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_i^2}} \quad (3.1)$$

Selectividad cuantitativa: Para evaluar la influencia de potenciales interferentes, se añadieron niveles crecientes de cloruros: 500 – 1000 – 1500 y 2000 mg/L a soluciones fortificadas con el analito a concentraciones de 50 – 100 – 500 y 1500 mg/L DQO. Cada combinación analito + interferente se analizó por duplicado, permitiendo determinar el efecto sobre la recuperación ecuación 3.2 y la precisión con la ecuación 3.3

$$\%R = \frac{C_{medida}}{C_{teórica}} \times 100 \quad (3.2)$$

Donde:

- C_{medida} : concentración de DQO obtenida experimentalmente en presencia del interferente (mg/L)
- $C_{teórica}$: concentración teórica o normal de DQO adicionada a la muestra (mg/L).

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.3)$$

Donde:

- s : desviación estándar de las mediciones replicadas (mg/L).
- \bar{x} : valor promedio de la concentración de DQO medida (mg/L).

Efecto matriz: Se aplicó un diseño de curvas paralelas (curva general vs. curva por adición de matriz), evaluado mediante el estadístico R con la ecuación 3.4. Las mediciones se realizaron en 8 puntos por duplicado por punto. Esta técnica permitió determinar si la matriz alteraba la pendiente.

$$R = \frac{b_{1,CAD}}{b_{1,CN}} \quad (3.4)$$

Para construir el intervalo de confianza al 90% (IC90) del cociente, se aplicó la transformación logarítmica natural:

$$\ln(R) = \ln\left(\frac{b_{1,CAD}}{b_{1,CN}}\right) \quad (3.5)$$

El error estándar de $\ln(R)$ se estimó por propagación de los errores estándar de ambas pendiente:

$$SE(\ln(R)) = \sqrt{\left(\frac{SE(b_{1,CAD})}{b_{1,CAD}}\right)^2 + \left(\frac{SE(b_{1,CN})}{b_{1,CN}}\right)^2} \quad (3.6)$$

El IC90 en escala logarítmica se calculó como:

$$\ln(R) \pm t_{0.95,\nu} SE(\ln(R)) \quad (3.7)$$

y se transformó nuevamente a la escala original mediante la función exponencial para obtener el IC90 de R.

Criterios de aceptación

Selectividad - interferencia (cualitativa): Se comparan espectros de muestra pura con KHP y KHP – cloruros y se consideran espectralmente iguales si en los dos espectros la similitud espectral basada en el coseno es ≥ 0.95 .

Selectividad – interferencia (cuantitativa): El % de recuperación deberá ser $100 \pm 10 \%$ y el C.V% ≤ 5 (EURACHEM, 2014)

Selectividad – efecto matriz: Para evaluar si existe efecto matriz significativo en la determinación de DQO mediante el método colorimétrico de reflujo cerrado, se compararán las pendientes de la curva de calibración normal (C.N) y la curva obtenida por adición estándar (C.A.D). Se calcula el cociente entre pendientes R y su intervalo de confianza al 90% (IC90). El IC90 se considera libre de efecto matriz si el IC90 del cociente de pendientes se encuentra dentro del intervalo técnico de equivalencia de 0,90 a 1,10 (Miller & Miller, 2010)

Límite de Detección (L.O.D)

Se realizó un estudio de blanco para calcular siguiendo los lineamientos de la guía Eurachem el L.O.D. El LOD teórico se calculó utilizando condiciones de repetibilidad y precisión intermedia con un total de 10 mediciones del blanco de muestra durante 3 días. Luego se procedió a calcular la desviación estándar del blanco, posteriormente se aplicó la ecuación 3.8 que indica la guía Eurachem para la obtener el LOD teórico.

$$L.O.D_{teorico} = \frac{3 * s'_o}{pendiente} \quad (3.8)$$

Posteriormente se confirma el L.O.D de manera experimental verificando que la señal fuese coherente con los criterios de aceptación definidos.

Aplicación experimental

Para aceptar el límite de detección experimental se realizaron 7 mediciones de blanco fortificado, próximo al nivel de L.OD teórico, del método se aplicaron 3 criterios técnicos que forman base de la ISO 11885, 8466-1, recomendaciones del EPA (40 CFR) y la función de Horwitz son: precisión aceptable y las recuperaciones estén dentro de los criterios de aceptación (Horwitz & Albert, 2006).

Criterio de aceptación

- Coherencia estadística entre valor experimental y teórico, $(|\bar{x} - LOD_{teorico}| \leq 2s$
- $RSD \leq 20\%$ para el nivel cercano al L.O.D
- Recuperación aceptable: 80-120%

Límite de Cuantificación (L.O.Q)

El LOQ se calculó utilizando condiciones de repetibilidad y precisión intermedia con un total de 10 mediciones del blanco de muestra durante 3 días. Luego se procedió a calcular la desviación estándar del blanco, posteriormente se aplicó la ecuación 2.17 que indica la guía Eurachem para la obtener el LOQ teórico.

$$L.O.Q_{teorico} = \frac{10 * s'_o}{pendiente} \quad (3.9)$$

Posteriormente se confirma el L.O.D de manera experimental verificando que la señal fuese coherente con los criterios de aceptación.

Aplicación experimental

Para aceptar el límite de cuantificación experimental se realizaron 7 mediciones de blanco fortificado, se acepta cuando se mantiene dentro del intervalo operativo recomendado por el fabricante y por Standard Methods. El L.O.Q experimental se considera verificado y aceptado cuando se cumplen los criterios de aceptación (American Public Health Association (APHA), 2023).

Criterio de aceptación

- Precisión aceptable : $RSD \leq 20\%$
- Recuperación aceptable: 80-120 %
- Confirmación de relación práctica $L.O.Q \geq 3 \times MDL$

Intervalo de trabajo e intervalo lineal

El intervalo de trabajo y la linealidad del método se evaluarán mediante una inspección visual del gráfico, con el apoyo de estadísticas y un gráfico de residuales de una regresión lineal, además la evaluación del intervalo de trabajo se sustentará con datos de estudios de precisión y sesgo, con concentraciones que cubran todo el intervalo de trabajo del método.

La linealidad del método se verificó mediante la construcción de 1 curva de calibración con 8 niveles de concentración preparados a partir del patrón primario KHP de 1500 mg/L. Cada nivel se analizó en por duplicado, por 3 días distintos, para evaluar estabilidad de la respuesta. Las absorbancias se registraron en el espectrofotómetro Hach DR 6000. Posteriormente, se aplicó un ajuste por regresión lineal a la ecuación descrita por la expresión 3.10 para cada curva

$$y = mx + b \quad (3.10)$$

Seguido de un análisis estadístico para cada una.

- Evaluación de residuos,
- Análisis de homocedasticidad,
- Correlación entre variables (R^2),
- Verificación de significancia de la pendiente,

Esta técnica permitió verificar si la relación entre concentración y respuesta instrumental se mantenía proporcional en el rango de trabajo.

Criterio de aceptación

Linealidad

Se evalúa según criterios de aceptación utilizados internacionalmente $R^2 \geq 0.995$, pendiente significativamente $\neq 0$, residuos aleatorios sin tendencia y errores relativos $|\%RE| \leq 20$ para niveles de 20-50 mg/L, $|\%RE| \leq 15$ para niveles medios de 50 -200 mg/L y $|\%RE| \leq 10$ para niveles > 200 mg/L (International Organization for Standardization, 2021).

Intervalo de trabajo

La evaluación del intervalo de trabajo se realizó mediante estudios de repetibilidad, precisión intermedia y exactitud, aplicando ensayos de adición estándar sobre una matriz real de agua residual tratada, representativa de las condiciones rutinarias de análisis. Los estudios se desarrollaron en los niveles de 100, 300, 700 y 1500 mg/L de DQO.

Se establecieron como criterios de aceptación un coeficiente de variación relativo de ≤ 10 % para la repetibilidad, ≤ 15 % para la precisión intermedia y recuperaciones comprendidas entre 80 % y 120 %. Los resultados obtenidos demostraron un comportamiento metrológico satisfactorio en todos los niveles evaluados, cumpliendo simultáneamente los criterios definidos conforme a la guía (EURACHEM, 2014)

En consecuencia, se establece como intervalo de trabajo del método el rango comprendido entre 100 y 1500 mg/L de DQO, dentro del cual el método presenta una precisión y exactitud adecuadas para su uso previsto, garantizando la confiabilidad de los resultados analíticos reportados bajo condiciones normales de operación del laboratorio.

Veracidad (sesgo)

Se trabajó con un MRC tipo muestra, donde se hicieron varias repeticiones y se evaluó según los criterios que especifica la Eurachem y el certificado de análisis del MRC.

Análisis mediante un MRC

Se realizaron 10 mediciones independientes del MRC con valor certificado de 142 ± 4 mg/L, trabajando bajo condiciones de repetibilidad.

Criterios de aceptación para la evaluación del sesgo

Las mediciones obtenidas fueron analizadas con la estadística siguiente:

- La media y cada repetición debe encontrarse dentro del intervalo declarado (138-146 mg/L)
- Recuperación aceptable entre 90-110% para la media y cada repetición.
- Análisis del sesgo relativo
- Prueba t para evaluar si existía sesgo estadísticamente significativo, $t_{cal} < t_{crit}$

Precisión (Repetibilidad y precisión intermedia)

La determinación simultánea de estos dos componentes fue realizada mediante un diseño en el cual se hicieron adiciones de concentración conocida de DQO dentro del intervalo de trabajo con el patrón primario KHP a una muestra de agua residual que previamente fue preservada con H_2SO_4 a un pH < 2 y caracterizada para obtener su DQO nativa.

Después del estudio de precisión se procedió a evaluarlo con las técnicas estadísticas de ANOVA para posteriormente obtener la desviación estándar de repetibilidad y de precisión intermedia.

- **Repetibilidad:** Para cada nivel (100,300,700, 1500 mg/L) se realizaron 6 repeticiones bajo condiciones estrictas de repetibilidad (mismo analista, equipo, día, reactivos, soluciones, condiciones ambientales).

- **Precisión intermedia:** Se repitió el ensayo en tres días consecutivos, manteniendo el mismo analista y equipo obteniéndose un total de 18 mediciones por nivel.

Criterios de aceptación

Para la evaluación de la precisión se establecieron criterios diferenciados para repetibilidad y precisión intermedia, siguiendo las recomendaciones de la ISO 5725-2:2019, Eurachem y el modelo de Horwitz para métodos ambientales ((EURACHEM, 2014; Horwitz & Albert, 2006; International Organization for Standardization, 2019)

1. En nivel bajo cerca de límite inferior operativo (100 mg/L) se aceptó un $\%RSD_r \leq 4$, $\%RSD_{pi} \leq 8$, % recuperación 84-116.
2. En niveles medios como 300 mg/L se considera aceptable $\%RSD_r \leq 3,39$, $\%RSD_{pi} \leq 6,78$, % recuperación 89,8-110,2 y para 700 mg/L un $\%RSD_r \leq 2,98$, $\%RSD_{pi} \leq 5,97$, % recuperación 91,0-109,0.
3. En niveles altos como 1500 mg/L se adoptó un criterio de $\%RSD_r \leq 2,66$, $\%RSD_{pi} \leq 5,32$, % recuperación 94,7-105,3.

Bajo estos criterios el método presenta un precisión adecuada para su uso en el análisis rutinario de DQO.

Robustez operacional

La robustez del método se evaluó modificando ligeramente variables críticas del procedimiento. Se utilizó un diseño factorial 2³, en el cual se variaron los factores:

- Factor 1: temperatura de digestión en los niveles: (-1) 148 y (+1) 150°C
- Factor 2: equipo de digestión: (-1) Hach y (+1) Merck
- Factor 3: tiempo de digestión: (-1) 1 h 45 min y (+1) 2 h 15 min.

Cada combinación se analizó por duplicado.

Criterio de aceptación

Los efectos principales e interacciones se evaluaron mediante análisis comparativo o ANOVA, verificando que:

- Se compara efectos principales e interacciones
- Se considera que el método es robusto si: no existe impacto significativo ($p \geq 0.005$) de cada factor e interacción sobre el valor de DQO.

Declaración: Se considera que el método es robusto si: no existe impacto significativo ($p \geq 0.005$) de cada factor e interacción sobre el valor de DQO.

Incertidumbre

Para la identificación de los factores de incertidumbre se emplea el diagrama de Ishikawa presentando en la Figura 3.2. Posteriormente se utilizó el modelo matemático de incertidumbre basado en la guía Eurachem obteniendo la incertidumbre combinada y expandida del método.

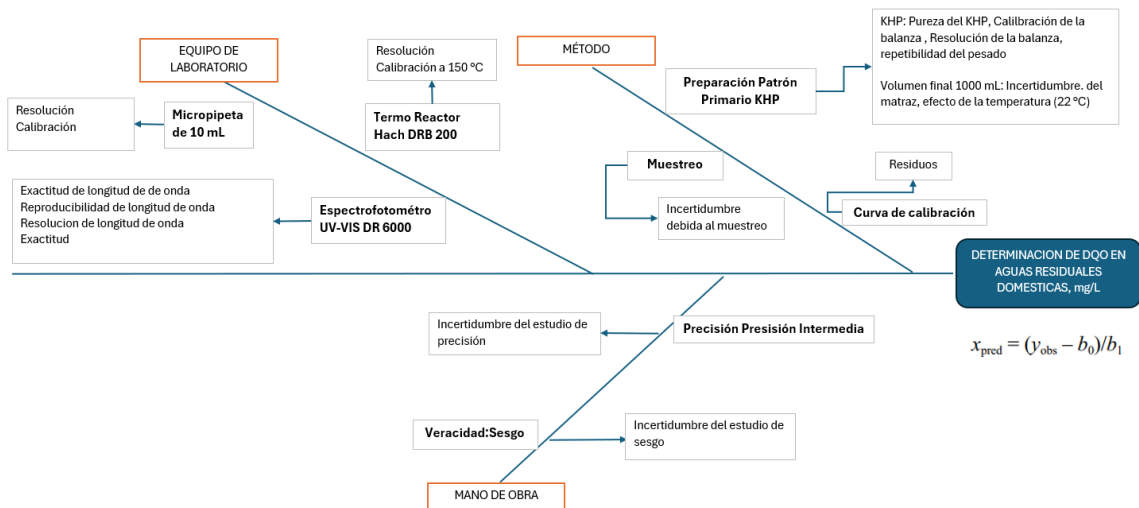


Figura 3.2 Diagrama de Ishikawa para la determinación de la Incertidumbre del método

Criterio de aceptación

Se plantea como criterio de aceptación los siguientes criterios:

1. Para un intervalo de 100-300 una $U_{rela}(\%) \leq 20\%$
2. Para $> 300 - 1500$ una $U_{rela}(\%) \leq 10\%$

3.2.3.2 Recursos

1. Equipos de laboratorio

- Espectrofotómetro UV-VIS Hach DR 6000
- Termorreactor DRB 200 Hach
- Termorreactor TR 300 Spectroquant
- Micropipeta de 1-10 mL sartorius
- Micropipeta de 100 a 1000 uL sartorius
- Plancha de agitación marca Joan Lab
- Termohigrómetro marca IsoLab.
- Autoclave marca Biobase
- Balanza analítica marca AND

2. Materiales de laboratorio

- Puntas esterilizadas para micropipeta de 10 mL sartorius y de 1000 uL.
- Matraces aforados de 50 marca pyrex, 100, 250, 1000 mL marca Brand
- Barras de agitación
- Vasos precipitados de 50 mL
- Espátula
- Gradillas
- Frascos de vidrio de 100, 500 y 1000 mL marca Youtility

3. Reactivos

- Patrón primario KHP con pureza del 99.95% marca Fisher chemical
- Patrón primario de NaCl 99.5% marca Loba chemie.
- Viales marca Hach rango alto para DQO
- MRC Demand – WP 142 \pm 4 mg/L

- Agua Tipo I

4. Soluciones

- 20, 50, 200, 300, 500, 750 y 1000 mg/L a partir de la solución stock de 1500 mg/L de DQO teórica.
- 300, 700 y 1500 mg/L a partir de la solución stock de 2000 mg/L de DQO teórica.
- 100 mg/L a partir de solución stock de 500 mg/L de DQO teórica.
- Solución stock de 10000 mg/L de cloruros.

5. Insumos

- Guantes de nitrilo
- Gafas de seguridad
- Mandil
- Cabina extractora

6. Software

- Excel

Preparación de soluciones patrón y MRC

La obtención de datos confiables requirió la preparación y el uso de estándares de referencia, entre los cuales se incluyeron

a) Preparación de la solución stock de 1500 mg/L de DQO: Previamente se seca una cantidad de KHP en la estufa a peso constante a 110°C, luego se pesa gravimétricamente en una balanza analítica 1.275 g, se disuelve con agua tipo I en un matraz clase A de volumen de aforo de 1 L, esta solución será usada para la construcción de la curva estándar.

- **Preparación de 20 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 666 uL y aforar en un volumen de 50 mL.
- **Preparación de 50 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 666 uL y aforar en un volumen de 50 mL.
- **Preparación de 200 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 666 uL y aforar en un volumen de 50 mL.
- **Preparación de 500 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 666 uL y aforar en un volumen de 50 mL.

- **Preparación de 750 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 666 uL y aforar en un volumen de 50 mL.
 - **Preparación de 1000 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 666 uL y aforar en un volumen de 50 mL.
- b) Preparación de la solución stock de 2000 mg/L de DQO:** Previamente se seca una cantidad de KHP en la estufa a peso constante a 110°C, luego se pesa gravimétricamente en una balanza analítica 1.70 g, se disuelve con agua tipo I en un matraz clase A de volumen de aforo de 1 L.
- **Preparación de 300 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 7,5 mL y aforar en un volumen de 50 mL.
 - **Preparación de 700 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 17,5 mL y aforar en un volumen de 50 mL.
 - **Preparación de 1500 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 37,5 mL y aforar en un volumen de 50 mL.
- c) Preparación de la solución stock de 500 mg/L de DQO:** Previamente se seca una cantidad de KHP en la estufa a peso constante a 110°C, luego se pesa gravimétricamente en una balanza analítica 425 mg, se disuelve con agua tipo I en un matraz clase A de volumen de aforo de 1 L.
- **Preparación de 100 mg/L:** Tomar una alícuota de la solución madre de 10 mL y aforar en un volumen de 50 mL.
- d) Preparación de la solución stock de 10000 mg/L de cloruros:** Previamente se seca una cantidad de NaCl grado reactivo en la estufa a peso constante a 140°C, luego se pesa gravimétricamente en una balanza analítica 1.648 g, se disuelve con agua tipo I en un matraz clase A de volumen de aforo de 100 mL.
- **Preparación de 500 mg/L Cl^{-1} :** Tomar una alícuota de la solución madre de 2,5 mL y aforar en un volumen de 50 mL.
 - **Preparación de 1000 mg/L Cl^{-1} :** Tomar una alícuota de la solución madre de 5 mL y aforar en un volumen de 50 mL.
 - **Preparación de 1500 mg/L Cl^{-1} :** Tomar una alícuota de la solución madre de 7,5 mL y aforar en un volumen de 50 mL.
 - **Preparación de 2000 mg/L Cl^{-1} :** Tomar una alícuota de la solución madre de 10 mL y aforar en un volumen de 50 mL.

e) **MRC de 142 ± 4 mg/L:** Para preparar la solución, se llenó parcialmente un matraz aforado de 1 L con agua de grado reactivo, de la ampolla QC1130-20 mL se transfirió 10 mL al matraz, luego se llenó el matraz aforado con agua de grado reactivo, se mezcló bien y finalmente la muestra ya estuvo lista para su análisis inmediato, si el ensayo no se dará dentro de 2 horas se deberá preservar una porción del MRC utilizando 0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado por cada 100 mL hasta llevarlo a un pH < 2. Esta alícuota debe almacenarse a 4 °C y analizarse dentro del tiempo máximo de conservación de 28 días.

3.2.4 Análisis estadístico.

El análisis estadístico aplicado en este estudio se diseñó para garantizar que los resultados obtenidos durante la verificación del método colorimétrico de DQO cumplan con los requisitos de validez metrológica exigidos por estándares internacionales como: Eurachem, ISO 5725, ISO 8466-1 y Standard Methods 5220D.

Para ello se emplearon técnicas de estadística descriptiva e inferencial, seleccionadas según la naturaleza de cada parámetro de desempeño evaluado.

3.2.4.1 Análisis descriptivo.

1. Medidas de tendencia central

- **Media aritmética (\bar{x})** para describir la señal analítica promedio de cada nivel evaluado.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3.11)$$

2. Medidas de dispersión

- **Desviación estándar muestral:** cuantifica la variabilidad de las mediciones bajo condiciones de repetibilidad e intermedia.

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})}{n - 1} \quad (3.12)$$

3. Representaciones gráficas

- **Diagramas de dispersión:** Representa gráficamente la relación entre una variable independiente y una variable de respuesta. Este gráfico permite una inspección visual preliminar para identificar

tendencias, patrones no lineales, valores atípicos y posibles relaciones funcionales antes de aplicar modelos estadísticos formales (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008)

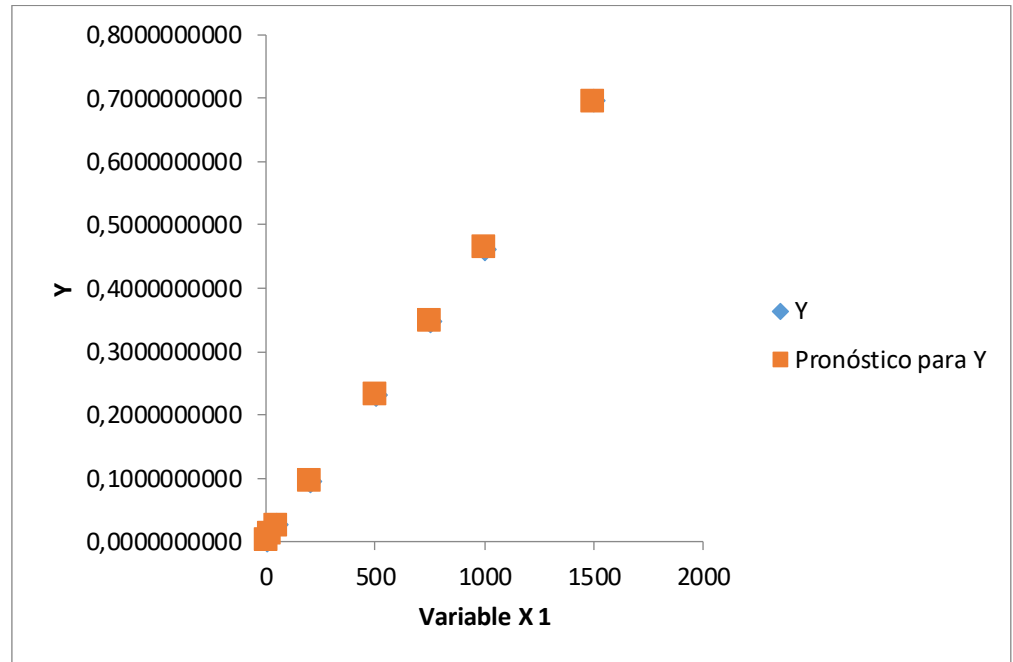


Figura 3.3 Diagrama de dispersión entre la variable independiente y la respuesta analítica

Interpretación

- Tendencia lineal implica relación proporcional.
 - Dispersión aleatoria es causada por ausencia de relación.
 - Curvaturas muestra la existencia de un posible modelo no lineal.
- **Gráficos de residuos:** Los gráficos de residuos muestran la diferencia entre los valores observados y los valores estimados por el modelo estadístico. Su análisis ayudará a validar los puestos de linealidad, homocedasticidad e independencia de los errores (Montgomery et al., 2006).

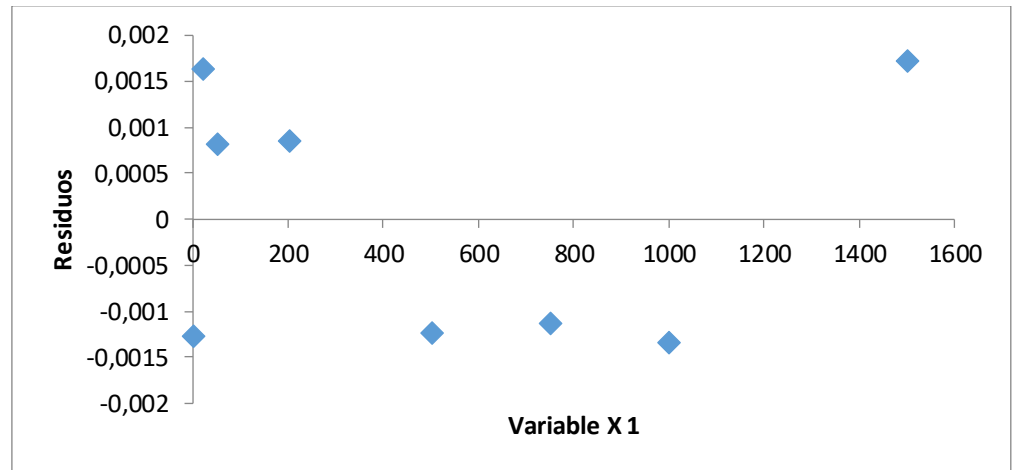


Figura 3.4. Gráfico de residuos del modelo de regresión lineal.

Interpretación

- Residuos aleatorios implica un modelo adecuado.
 - Forma de embudo muestra heterocedasticidad.
 - Patrones curvos es causa de un modelo incorrecto.
- **Gráficos de normalidad:** Los gráficos de normalidad, también conocidos como gráficos de probabilidad normal, permiten evaluar visualmente si los residuos del modelo siguen una distribución que es el supuesto clave para aplicar ANOVA y las pruebas de significancia conocidas. Si los puntos se alinean aproximadamente sobre una recta, se considera que la hipótesis de normalidad es razonable (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

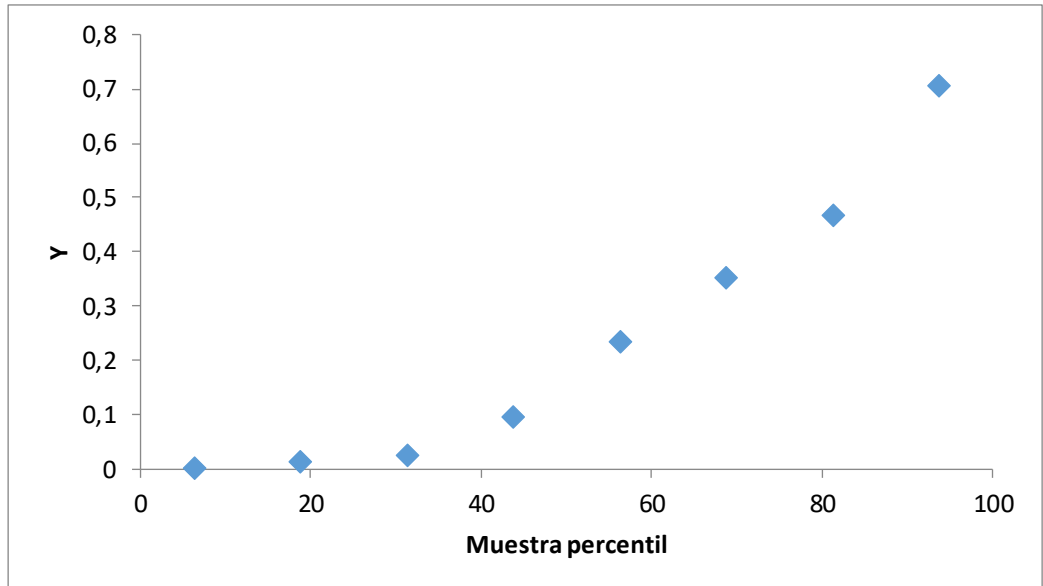


Figura 3.5. Gráfico de probabilidad normal de los residuos.

Interpretación

- Alineación recta expresa una normalidad aceptable.
 - Desviaciones sistemáticas implica una no normalidad.
- **Gráficos de interacción de factores:** Se utilizan en diseños factoriales para evaluar si el efecto de un factor depende del nivel de otro. Estas gráficas representan la respuesta promedio frente a un factor.

Las líneas paralelas indican ausencia de interacción; las líneas no paralelas o que se cruzan evidencia interacción significativa.

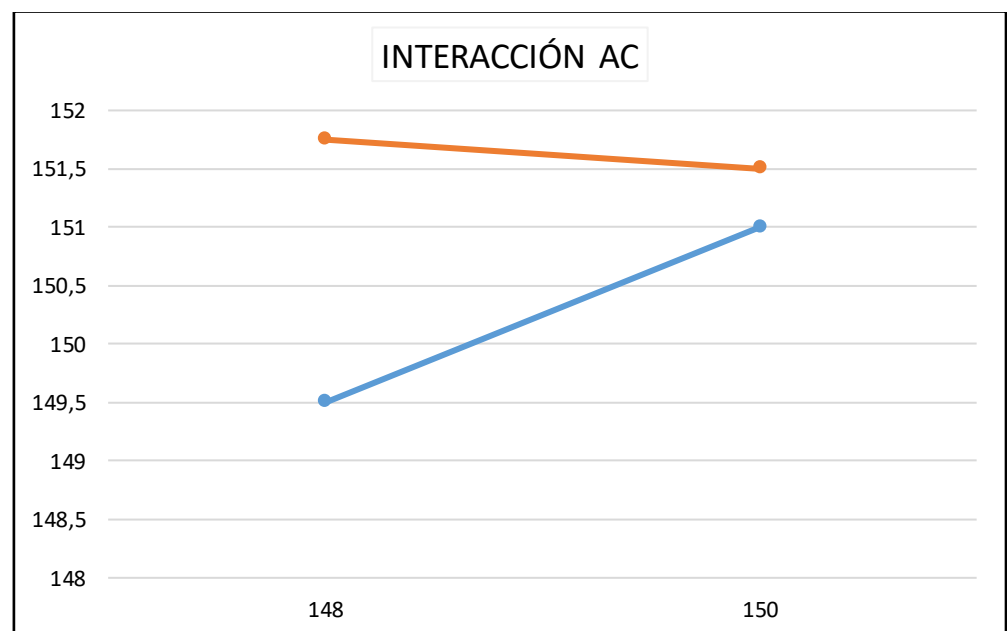


Figura 3.6. Gráfica de interacción entre los factores A y B.

3.2.4.2 Análisis inferencial

El análisis inferencial se aplicó para sustentar estadísticamente la validez del método de DQO y verificar que las diferencias observadas respondan a variabilidad experimental. En particular se emplearon pruebas orientadas a:

1. Evaluar la relación lineal entre respuesta e intensidad de señal (regresión),
2. Contrastar sesgo frente a un valor de referencia. (t de Student),
3. Comparar medias entre condiciones (ANOVA), y
4. Verificar supuestos del modelo mediante análisis de residuos, pruebas formales de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Regresión lineal simple (curva de calibración)

1. Modelo y estimación de parámetros

Se ajustó el modelo lineal

$$y_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_i \quad (3.13)$$

Donde y_i es la respuesta instrumental (absorbancia), x_i la concentración nominal, $\hat{\beta}_0$ estimador de la ordenada, $\hat{\beta}_1$ estimador de la pendiente.

Para calcular el estimador de la pendiente y ordenada usaremos la ecuación 3.14 y 3.15 respectivamente

$$\hat{\beta}_1 = \frac{S_{xy}}{S_{XX}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i) \sum_{i=1}^n y_i}{n}}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}} \quad (3.14)$$

$$\hat{\beta}_0 = \bar{y} - \hat{\beta}_1 \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} - \hat{\beta}_1 \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3.15)$$

2. Error estándar de estimación

Es el error que existe cuando se va a predecir y en función de x, primero se calculará la suma de cuadrados del error con la ecuación 3.15, luego el cuadrado medio del error con la ecuación 3.16 y finalmente con la expresión 3.18 el error estándar de estimación.

$$SC_E = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n ((y_i - [\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_i]))^2 \quad (3.16)$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{SC_E}{n-2} = CME \quad (3.17)$$

$$\hat{\sigma} = \sqrt{CME} \quad (3.18)$$

3. Prueba de hipótesis

Para verificar si la pendiente es significativamente diferente de cero se plantea la siguiente hipótesis nula y alternativa respectivamente: $H_0: \beta_1 = 0$ y $H_A: \beta_1 \neq 0$

Se rechaza H_0 si el valor absoluto del estadístico calculado $|t_0|$ es mayor que el correspondiente valor crítico obtenido en la tabla de distribución t-Student, es decir, se rechaza H_0 si:

$$|t_0| > t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n-2\right)} \quad (3.19)$$

O si el *valor - p* $< \alpha$ (*nivel de significancia*) (3.20)

Para verificar si la ordenada es diferente de cero se plantea la siguiente hipótesis nula y alternativa respectivamente: $H_0: \beta_0 = 0$ y $H_A: \beta_0 \neq 0$, el análisis estadístico es el mismo del párrafo anterior.

Tabla 3.1 Resumen de las pruebas de hipótesis sobre los estimadores de pendiente y ordenada

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico	Valor - p
Intercepción	$\hat{\beta}_0$	$\sqrt{CME\left[\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{S_{xx}}\right]}$	$\frac{\hat{\beta}_0}{\sqrt{CME\left[\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{S_{xx}}\right]}}$	$p(t_{cal} > t_0)$
Pendiente	$\hat{\beta}_1$	$\sqrt{\frac{CME}{S_{xx}}}$	$\frac{\hat{\beta}_1}{\sqrt{\frac{CME}{S_{xx}}}}$	$p(t_{cal} > t_0)$

Nota: Obtenido de (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008)

En regresión lineal aplicado a la verificación de métodos analíticos cuantitativos lo que importa es que los estimadores de pendiente y ordenada sean diferentes de 0 (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

4. Estimación del intervalo de confianza para los estimadores de la regresión lineal.

Se pueden estimar el intervalo para los estimadores con un nivel de confianza del 95% o nivel de significancia $\alpha = 0.05$, para $\hat{\beta}_1$ esta dado con la ecuación 3.17 y para $\hat{\beta}_0$ con la expresión 3.18 (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

$$\hat{\beta}_1 \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n-2\right)} \sqrt{\frac{CME}{S_{XX}}} \quad (3.21)$$

$$\hat{\beta}_0 \pm t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n-2\right)} \sqrt{CME \left[\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{S_{xx}} \right]} \quad (3.22)$$

5. Coeficiente de determinación, R^2

Evalúa la calidad del ajuste explicando la proporción de la variabilidad en los datos (Y) que es explicada por el modelo, su cálculo se muestra en la ecuación 3.23 (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

$$R^2 = \frac{SC_R}{S_{yy}} = \frac{\hat{\beta}_1 S_{xy}}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (3.23)$$

6. Coeficiente de correlación, r

Mide la intensidad de la relación lineal entre la variable de respuesta y la variable de entrada, es decir la señal del equipo y la concentración respectivamente. Se usa la expresión 3.24 para su cálculo (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx}S_{yy}}} \quad (3.24)$$

Prueba t de Student para un valor conocido.

Se utilizo para comparar la media experimental obtenida al analizar el MRC vs su valor certificado

Hipótesis evaluada H_0 : no existe sesgo significativo vs H_A : existe sesgo significativo.

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - \mu}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)} \quad (3.25)$$

La comparación se realizó considerando el valor crítico con el tabulado. El método se aceptó como no sesgado cuando $t_{cal} \leq t_{cri} \left(\frac{\alpha}{2}, n - 1\right) = 2,26$ o ($p > 0.05$) (Miller & Miller, 2010).

Análisis de Varianza

1. Detección de valores atípicos – Prueba de Grubbs

Antes de aplicar el análisis de varianza, se evaluó la posible existencia de valores atípicos en los datos experimentales, ya que estos pueden distorsionar significativamente las estimaciones de varianza y afectar la validez del ANOVA.

Para cada nivel de concentración y para cada día de análisis, se aplicó la prueba de Grubbs, bajo la hipótesis:

H_0 : no existen valores atípicos en el conjunto de datos,

H_A : existe al menos un valor atípico.

El estadístico de prueba se calculó como:

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (3.26)$$

Donde:

- x_i es el valor sospechoso,
- \bar{x} es la media muestral,
- s es la desviación estándar.

Se considera atípico un valor si $G > G_{crit}(\alpha = 0.05, n = 6) = 1.887$
O si el valor $p < \alpha = 0.05$.

En ausencia de valores atípicos, el conjunto de datos fue considerados aptos para el análisis de varianza posterior (Miller & Miller, 2010).

2. ANOVA de un factor

Para cada nivel de concentración, se aplicó un ANOVA de una vía donde:

- Factor: Día de análisis (3 niveles: Día 1, Día 2, Día 3),
- Variable de Respuesta: concentración medida de DQO (mg/L).

El modelo estadístico se expresa como:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad (3.27)$$

Donde:

- y_{ij} es la j-ésima medición en el i-ésimo día,
- μ es la media global,
- τ_i es el efecto del día i,
- ε_{ij} es el error aleatorio.

3. Hipótesis estadística.

Para cada nivel de concentración se constataron la hipótesis siguientes:

- $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (no existen diferencias significativas entre días),
- H_A : al menos una media difiere.

4. Descomposición de la variabilidad.

La variabilidad total se descompuso en:

$$SST = \sum_{I=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (3.28)$$

$$SS_{\text{día}} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2 \quad (3.29)$$

$$SSE = \sum_{I=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (3.30)$$

Cumpléndose la siguiente ecuación 3.31

$$SST = SS_{\text{día}} + SSE \quad (3.31)$$

5. Estadístico de prueba F de Fischer.

El estadístico de prueba se calcula como:

$$F_{\text{cal}} = \frac{MS_{\text{día}}}{MSE} \quad (3.32)$$

Donde:

$$MS_{\text{día}} = \frac{SS_{\text{día}}}{k - 1} \quad (3.33), \quad MSE = \frac{SSE}{N - K} \quad (3.34)$$

Con:

- k : 3 días,
- N : 18 observaciones por nivel.

Si $p(|F_{\text{cal}}| < F_{\text{crit}}) > 0.05$ se concluye que no existe diferencias estadísticamente significativas entre días, validando la precisión interdía del método para ese nivel de concentración. Dentro de la tabla 3.2 podemos ver el resumen de un ANOVA (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

Tabla 3.2 Tabla de ANOVA para un Diseño completamente aleatorizado

Fuente	Suma de cuadrados	GDL	MS	F	Valor-p
Tratamiento	$SS_{día}$	$k - 1$	$MS_{día}$	F_{cal}	$p(F_{cal} < F_{crit})$
Error	SSE	$N - K$	MSE		
Total	SST	$N - 1$			

Nota: Adaptado de Análisis y diseño de experimentos Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008

6. Normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk)

La Normalidad de los residuos del modelo se evaluó mediante la prueba estadística de Shapiro-Wilk, contrastando la siguientes hipótesis:

- H_0 : los residuos siguen una distribución normal,
- H_A : los residuos no siguen una distribución normal.

Para la prueba i) se ordenan los datos de menor a mayor. ii) del apéndice A se obtienen los coeficientes a_1, a_2, \dots, a_k donde $k \sim \frac{n}{2}$, iii) se calcula el estadístico W definido con la ecuación 3.35

$$W = \frac{1}{(n-1)S^2} \left[\sum_{i=1}^k a_i (X_{(n-i+1)} - X_{(i)}) \right]^2 \quad (3.35)$$

Donde S^2 es la varianza muestral y por último el valor calculado de W se compara con el valor crítico correspondiente o, de forma equivalente podemos evaluar el valor-p asociado.

- Si $p > 0.05$: no se rechaza H_0 , los datos tienen una distribución normal.
- Si $p \leq 0.05$: se rechaza H_0 , se evidencia una no normalidad.

7. Homogeneidad de Varianza – Prueba de Levene modificada (Brown & Forsythe)

En los modelos estadísticos paramétricos, particularmente en el ANOVA, uno de los supuestos estructurales es la homogeneidad de varianzas y homocedasticidad, la cual establece que las varianzas poblacionales asociadas a los distintos grupos o tratamientos evaluados deben ser estadísticamente iguales. El incumplimiento de este supuesto puede comprometer la validez del estadístico F , afectando el control del error

tipo I y, en consecuencia, la confiabilidad de las inferencias realizadas (Kutner et al., 2005).

Sea un conjunto de datos dividido en k grupos independientes, con tamaños muestrales n_1, n_2, \dots, n_k . La prueba de Levene (Brown – Forsythe) tiene el siguiente contraste estadístico:

$$\text{Hipótesis nula } H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2 \quad (3.36)$$

Es decir, las varianzas poblacionales de todos los grupos son iguales, por lo que se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas, versus la hipótesis alternativa

$$H_A: \exists i \neq j \text{ tal que } \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2 \quad (3.37)$$

Que indica que al menos una de las varianzas poblacionales difiere significativamente, indicando heterogeneidad de varianzas.

Construcción del estadístico de prueba

Sea Y_{ij} la j-ésima observación del grupo i, con:

$$i = 1, 2, \dots, k \quad j = 1, 2, \dots, n_i \quad (3.38)$$

En la modificación de Brown – Forsythe, cada observación se transforma mediante la desviación absoluta respecto a la mediana del grupo, Donde \tilde{Y}_i representa la mediana muestral del grupo i.

$$Z_{ij} = |Y_{ij} - \tilde{Y}_i| \quad (3.39)$$

Esta transformación elimina la dependencia directa de la distribución original de los datos y permite evaluar la dispersión relativa de cada grupo de manera robusta.

Estadístico F de Levene (Brown – Forsythe)

Una vez obtenidos los valores de Z_{ij} , se realiza un análisis de varianza de un factor sobre dichos valores. El estadístico de prueba se define como:

$$W = \frac{(N - k)}{(k - 1)} \cdot \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{Z}_i - \bar{Z} \dots)^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Z_{ij} - \bar{Z}_i)^2} \quad (3.40)$$

Donde:

- $N: \sum_{i=1}^k n_i$ es el número total de observaciones,
- \bar{Z}_i . Es la media de las observaciones absolutas del grupo i,

- \bar{Z} ... es la media global de las desviaciones absolutas.

Bajo la hipótesis nula, el estadístico W sigue una distribución F de Snedecor con los siguientes grados de libertad.

$$gl_1 = k - 1 \quad (3.37) \quad gl_2 = N - k \quad (3.41)$$

Con un nivel de significancia estadística $\alpha = 0,05$, que representa la probabilidad máxima aceptable de cometer un error tipo I, es decir, rechazar incorrectamente la hipótesis nula de igualdad de varianzas.

Tabla 3.3 Regla de decisión

Criterio	Decisión
$p \geq \alpha$	No existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que las varianzas poblacionales son diferentes.
$p < \alpha$	Existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que las varianzas poblacionales son diferentes.

Nota: Adoptado de Applied linear statistical models por Kutner et al., 2005

8. Prueba de White

La prueba de White es un contraste estadístico para detectar heterocedasticidad en un modelo de regresión.

- Heterocedasticidad: la varianza del error no es constante; cambia con el nivel de la variable independiente (en tu caso, la concentración).
- Homocedasticidad: la varianza del error es constante " $Var(\varepsilon_i|x_i) = \sigma^2$ "

Sea el modelo de regresión lineal simple:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i \quad (3.42)$$

donde:

- y_i es la variable respuesta,
- x_i es la variable independiente,
- β_0 y β_1 son los parámetros del modelo,
- ε_i es el término de error aleatorio.

Tras ajustar el modelo mediante mínimos cuadrados ordinarios, se obtienen los residuos estimados:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (3.43)$$

Hipótesis estadísticas

La prueba de White evalúa las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H_0): la varianza de los errores es constante (homocedasticidad).
- Hipótesis alternativa (H_1): la varianza de los errores no es constante (heterocedasticidad).

Procedimiento estadístico

El procedimiento de la prueba de White se basa en la construcción de una regresión auxiliar, en la cual el cuadrado de los residuos del modelo original se expresa como función de las variables explicativas originales y de sus transformaciones. Para un modelo de regresión lineal simple, la forma general de la regresión auxiliar es:

$$e_i^2 = \alpha_0 + \alpha_1 x_i + \alpha_2 x_i^2 + u_i \quad (3.44)$$

donde:

- e_i^2 representa el cuadrado del residuo,
- $\alpha_0, \alpha_1, \alpha_2$ son parámetros auxiliares,
- u_i es un término de error aleatorio.

La presencia de heterocedasticidad se evalúa analizando si los coeficientes asociados a las variables explicativas en la regresión auxiliar son conjuntamente significativos.

Estadísticos de contraste

La prueba de White puede evaluarse mediante dos estadísticos equivalentes:

a) Estadístico de Lagrange Multiplier (LM)

$$LM = n \cdot R_{\text{aux}}^2 \quad (3.45)$$

donde:

- n es el número de observaciones,
- R_{aux}^2 es el coeficiente de determinación de la regresión auxiliar.

Bajo la hipótesis nula de homocedasticidad, el estadístico LM sigue aproximadamente una distribución χ^2 con grados de libertad iguales al número de variables explicativas en la regresión auxiliar (excluyendo el intercepto).

b) Estadístico F

Como alternativa, especialmente útil en muestras pequeñas, se puede emplear un contraste basado en el estadístico F, el cual permite evaluar la significancia conjunta de los regresores en la ecuación auxiliar.

Criterio de decisión

El criterio de decisión se establece comparando el valor p asociado a los estadísticos LM o F con un nivel de significancia α , usualmente 0,05:

- Si $p > \alpha$: no se rechaza H_0 , concluyéndose homocedasticidad.
- Si $p \leq \alpha$: se rechaza H_0 , evidenciándose heterocedasticidad.

Ventajas de la prueba de White

La prueba de White presenta las siguientes ventajas relevantes en la validación de métodos analíticos:

- No requiere especificar una forma funcional particular de la heterocedasticidad.
- Es aplicable directamente a modelos de regresión.
- No depende de la agrupación de datos por niveles.
- Resulta adecuada para diseños experimentales con réplicas limitadas por nivel.

ANOVA factorial 2^3

Con el fin de evaluar simultáneamente el efecto de tres factores y sus posibles interacciones sobre la variable respuesta se empleó un diseño factorial 2^3 descrito en la sección 2.8.3.

Una vez definido el modelo estadístico de diseño, se procedió a la estimación de los efectos principales y de interacción mediante el método de contrastes como se indica a continuación.

$$\text{Contraste A} = [a + ab + ac + abc - (1) - b - c - bc] \quad (3.46)$$

$$\text{Contraste B} = [b + ab + bc + abc - (1) - a - c - ac] \quad (3.47)$$

$$\text{Contraste C} = [c + ac + bc + abc - (1) - a - b - ab] \quad (3.48)$$

$$\text{Contraste AB} = [ab - b - a + abc + (1) - bc - ac + c] \quad (3.49)$$

$$\text{Contraste AC} = [(1) - a + b - ab - c + ac - bc + abc] \quad (3.50)$$

$$\text{Contraste BC} = [(1) + a - b - ab - c - ac + bc + abc] \quad (3.51)$$

$$\text{Contraste ABC} = [abc - bc - ac + c - ab + b + a - (1)] \quad (3.52)$$

Donde A,B y C son los factores que están estudiando y sea a, b, ab, c, ac, bc y abc son los totales observados en cada uno de los tratamientos, como se logra apreciar en la siguiente tabla 3.4

Tabla 3.4 Tabla de signos del diseño factorial 2^3

Total	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-	-	-	+	+	+	
a	+	-	-	-	-	+	+
b	-	+	-	-	+	-	+
ab	+	+	-	+	-	-	-
c	-	-	+	+	-	-	+
ac	+	-	+	-	+	-	-
bc	-	+	+	-	-	+	-
abc	+	+	+	+	+	+	+

Nota: Adaptado de Análisis y Diseño de Experimentos por Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008

Si se hacen n réplicas de cada tratamiento, los efectos de un diseño 2^3 se estiman dividiendo los constantes entre $n2^{k-1}$ de acuerdo con la ecuación 3.53

$$\text{Efecto } i = \frac{\text{Contraste } i}{n2^{k-1}} \quad (3.53)$$

La suma de cuadrados se obtiene por la ecuación (3.54) y la suma total de cuadrados por la (3.55)

$$SC_{\text{efecto}} = \frac{(\text{Contraste}_{\text{efecto}})^2}{n2^k} \quad (3.54)$$

$$SC_T = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{l=1}^2 \sum_{m=1}^n y_{ijlm}^2 - \frac{Y^2 \dots}{n2^k} \quad (3.55)$$

Para finalizar la suma de cuadrados del error se calcula por diferencia entre la SC_T , los efectos individuales y los efectos de interacción dobles y triples (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

Con esta información se obtiene la tabla ANOVA descrita en la tabla 3.5 como se muestra a continuación.

Tabla 3.5 ANOVA para el diseño 2^3

FV	SC	GL	CM	F_0	Valor-p
A	SC_A	1	CM_A	CM_A/CM_E	$P(F > F_0)$
B	SC_B	1	CM_B	CM_B/CM_E	$P(F > F_0)$
C	SC_C	1	CM_C	CM_C/CM_E	$P(F > F_0)$
AB	SC_{AB}	1	CM_{AB}	CM_{AB}/CM_E	$P(F > F_0)$
AC	SC_{AC}	1	CM_{AC}	CM_{AC}/CM_E	$P(F > F_0)$
BC	SC_{BC}	1	CM_{BC}	CM_{BC}/CM_E	$P(F > F_0)$
ABC	SC_{ABC}	1	CM_{ABC}	CM_{ABC}/CM_E	$P(F > F_0)$
Error	SC_E	$2^3(n - 1)$	CM_E		
Total	SC_T	$n2^3 - 1$			

Nota: Adaptado de Análisis y Diseño de Experimentos por Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008

Finalmente, los factores cuyos valores de p son inferiores a $\alpha = 0,05$ se consideran estadísticamente significativos y, por tanto, deben ser analizados con mayor detalle para identificar las condiciones de operación que optimizan el desempeño del proceso y facilitan la selección del tratamiento más adecuado. Un menor valor de p indica que el efecto asociado ejerce una influencia más relevante sobre la variable de respuesta (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

Asimismo, es importante destacar que para estimar el cuadrado medio del error se requiere un mínimo de dos repeticiones ($n \geq 2$). En consecuencia, se recomienda ejecutar el diseño experimental con al menos dos réplicas, a fin de disponer de grados de libertad suficientes para la estimación adecuada del error experimental (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño del procedimiento específico de ensayo.

El procedimiento describe de manera detallada la secuencia de actividades necesarias para la ejecución del ensayo de DQO mediante el método colorimétrico, incorporando tanto las disposiciones establecidas en la norma de referencia como aquellas propias del laboratorio. El procedimiento completo se presenta en el Anexo A.

Asimismo, la descripción del método incluye las medidas de seguridad, los materiales, reactivos y equipos empleados en el ensayo, así como la preparación de reactivos, la elaboración de la curva de calibración, los cálculos correspondientes, el tratamiento de los resultados, los criterios de aceptación y rechazo, y las condiciones de almacenamiento y preservación de las muestras.

El procedimiento final, sustentado en los resultados de la validación del método, define el intervalo de trabajo y los criterios de aceptación y rechazo aplicables dentro del aseguramiento de la calidad de los resultados.

4.2 Evaluación de los criterios de calidad.

El parámetro DQO fue verificado por el método ASTM D1252-06 y Standard Methods 5220D, se evaluaron los parámetros de selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo de trabajo, veracidad, precisión, robustez y cálculo de la incertidumbre.

Los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño se encuentran a continuación:

4.2.1 Selectividad Cualitativa

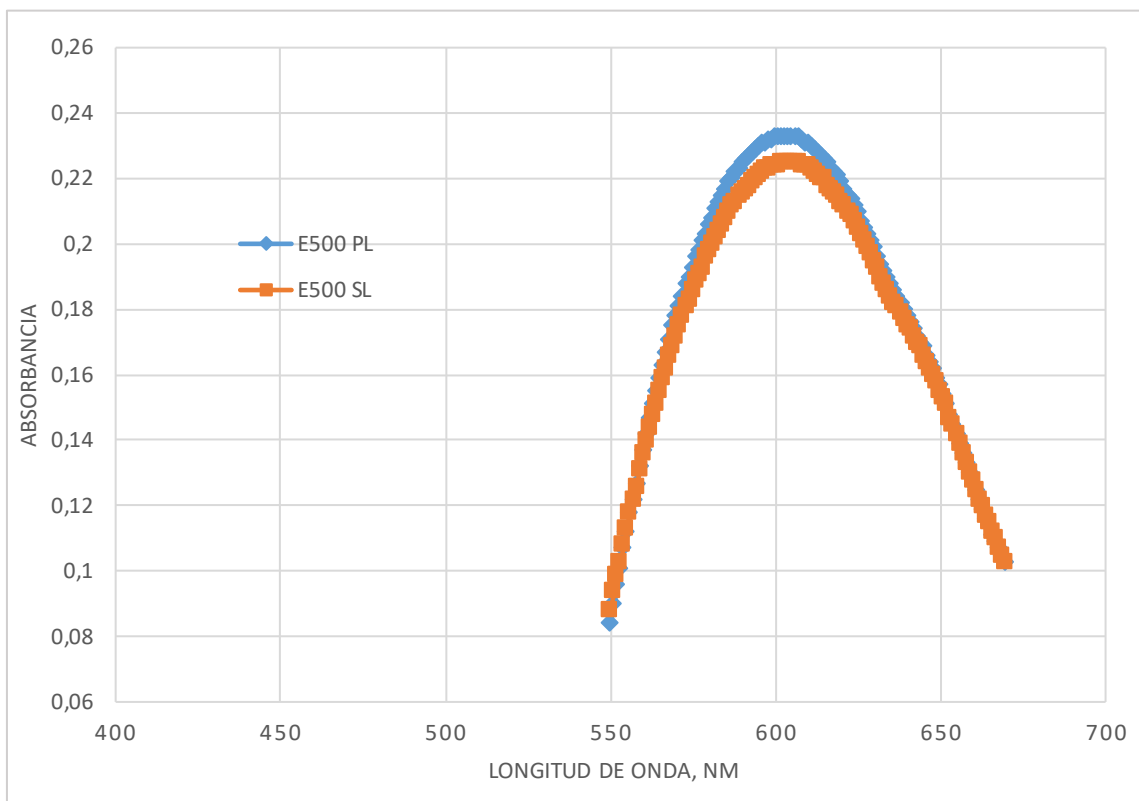


Figura 4.1 Espectro de absorción del estándar de 500 mg/L de DQO

En la Figura 4.1 se presentan los espectros de absorción correspondientes a una solución estándar de DQO de 500 mg/L, preparada a partir de ftalato ácido de potasio (KHP) como patrón primario, utilizando dos lotes distintos de reactivos digestores, identificados como PL y SL.

Los espectros obtenidos para ambos lotes muestran un comportamiento espectral similar, caracterizado por una banda de absorción bien definida en la región visible, con un máximo de absorción ubicado aproximadamente alrededor de 600 nm. La forma de los espectros es coincidente en todo el intervalo de longitudes de onda evaluado, sin evidenciar la presencia de picos adicionales, hombros o señales anómalas que pudieran asociarse a interferencias espectrales.

Se observa una ligera diferencia en la intensidad de la absorbancia máxima entre los lotes PL y SL; sin embargo, esta variación no afecta la posición del máximo de absorción ni la forma general del espectro. Dichas diferencias se consideran atribuibles a variaciones normales entre lotes de reactivos, propias del proceso de fabricación, y no a cambios en la respuesta analítica del método.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que el método produce una respuesta espectral consistente y específica para una concentración de 500 mg/L de DQO, independientemente del lote de reactivos empleado, confirmando la selectividad del método bajo las condiciones evaluadas.

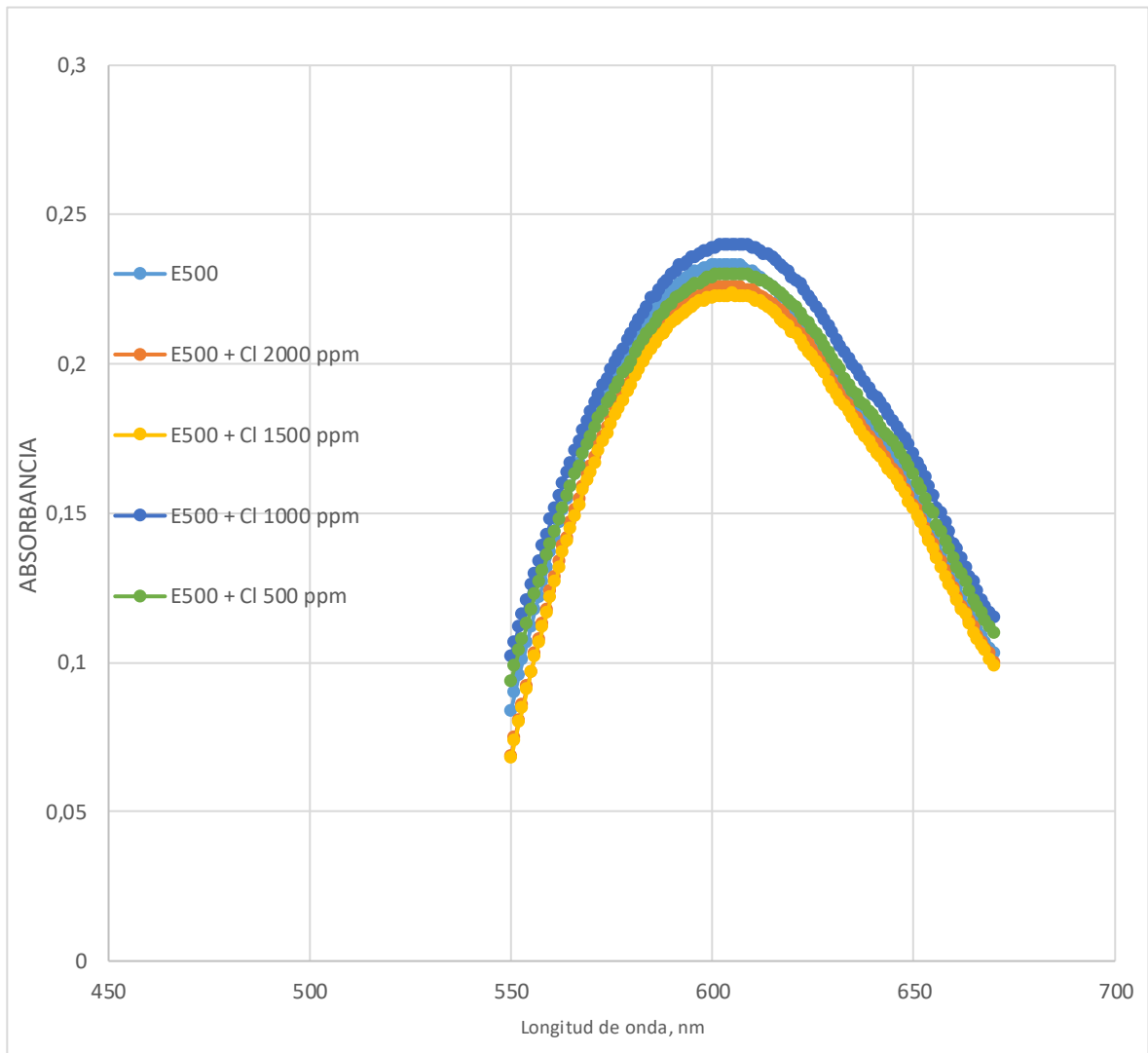


Figura 4.2 Comparación de espectros de absorción entre E500 y E500 con interferente de Cloruros

La selectividad del método fue evaluada mediante el análisis cualitativo de los espectros de absorción del sistema E500 en ausencia y en presencia de cloruros añadidos en concentraciones de 500, 1000, 1500 y 2000 mg/L.

Como se observa en la Figura 4.2, los espectros correspondientes al E500 sin interferente y a las soluciones enriquecidas con cloruros presentan perfiles espectrales altamente similares, caracterizados por un máximo de absorción ubicado aproximadamente en la misma región espectral (~600 nm), sin

desplazamientos significativos de longitud de onda ni aparición de nuevas bandas de absorción.

La forma general de las curvas se mantiene constante en todo el intervalo espectral evaluado, evidenciando que la presencia de cloruros no altera la señal espectral característica del analito. Las variaciones observadas se limitan a cambios leves en la intensidad de la absorbancia, atribuibles a efectos de matriz, sin afectar la identidad espectral del sistema de medición.

Estos resultados indican que, desde un punto de vista cualitativo, el método presenta una adecuada selectividad frente a la interferencia de cloruros en el rango de concentraciones estudiado.

En la tabla 4.1 se presentan los valores de similitud del coseno obtenidos al comparar el espectro del estándar de 500 mg/L de DQO denotado como E500 sin interferente con los espectros correspondientes a las soluciones enriquecidas con cloruros en concentraciones de 500, 1000, 1500 y 2000 mg/L.

Los valores de similitud del coseno obtenidos oscilaron entre 0,9996 y 0,9997, superando ampliamente el criterio de aceptación establecido ($\geq 0,95$) para todas las concentraciones evaluadas.

Estos resultados evidencian una elevada coincidencia espectral entre el sistema E500 y las soluciones con cloruros añadidos, lo que indica que la presencia de cloruros, incluso a concentraciones elevadas, no altera de manera significativa la forma ni la estructura espectral de la señal analítica. En consecuencia, se confirma que el método presenta una adecuada selectividad frente a la interferencia de cloruros en el rango estudiado.

Tabla 4.1 Similitud del coseno entre el espectro E500 y E500 con cloruros añadidos.

Condición evaluada	Concentración de Cl^- (mg/L)	Similitud de Coseno	Criterio (≥ 0.95)
E500 vs E500 - Cl^-	500	0,9997	Cumple
E500 vs E500 - Cl^-	1000	0,9996	Cumple
E500 vs E500 - Cl^-	1500	0,9997	Cumple
E500 vs E500 - Cl^-	2000	0,997	Cumple

Nota: Elaboración propia

En la Figura 4.3 se presentan los espectros de absorbancia correspondientes al estándar E500 mg/L DQO sin interferente y al E500 con la adición de 5 mg/L de sulfuros. Ambos espectros muestran perfiles altamente similares, con coincidencia en la posición del máximo de absorbancia y conservación de la forma espectral característica, sin desplazamientos apreciables de longitud de onda ni aparición de bandas adicionales.

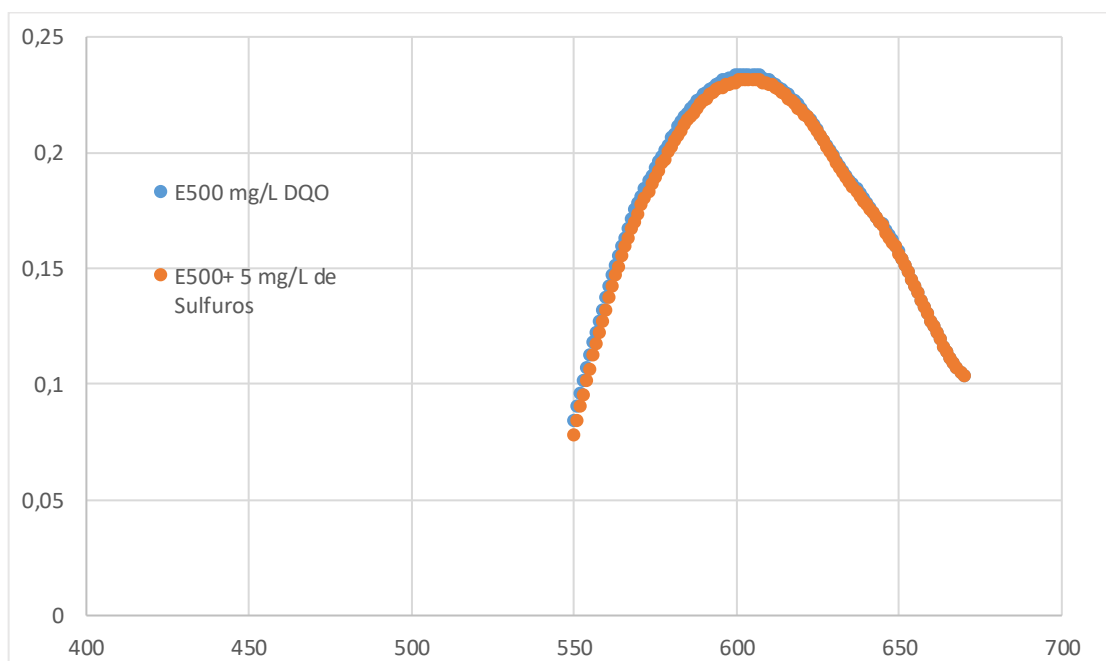


Figura 4.3 Comparación de espectros de absorción entre E500 y E500 con interferente de Sulfuros

Con el fin de complementar la evaluación cualitativa, se calculó la similitud del coseno entre ambos espectros, obteniéndose un valor de 0,99994, el cual supera ampliamente el criterio de aceptación establecido ($\geq 0,95$), como se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Similitud del coseno entre el espectro E500 y E500 con sulfuro añadido

Condición evaluada	Concentración de Cl^- (mg/L)	Similitud de Coseno	Criterio (≥ 0.95)
E500 vs E500 - S^{2-}	5	0,99994	Cumple

Nota: Elaboración propia

Este resultado indica una elevada coincidencia espectral entre el sistema E500 y la solución con sulfuro añadido, evidenciando que la presencia de sulfuros a la concentración evaluada no altera de manera significativa la estructura espectral de la señal analítica. En consecuencia, se confirma que el método es selectivo frente a la interferencia de sulfuros en las condiciones estudiadas.

Este comportamiento es consistente con lo reportado por Rodríguez & Zapata (2023), quienes demostraron que el método colorimétrico de reflujo cerrado mantiene adecuada selectividad frente a interferentes cuando las concentraciones de cloruros se mantienen dentro del rango operativo del método. Asimismo, coincide con lo descrito en American Public Health Association (APHA) (2023), donde se indica que el uso de sulfato de mercurio minimiza eficazmente la interferencia por cloruros.

No obstante, Gavi (2021) reportó interferencias significativas en matrices con elevada salinidad, lo cual no se observó en el presente estudio. Esta diferencia podría atribuirse a la concentración específica de interferente evaluada y al adecuado control del reactivo complejante empleado.

4.2.2 Selectividad Cuantitativa.

La selectividad cuantitativa del método frente a cloruros fue evaluada mediante ensayos de recuperación, enriqueciendo soluciones patrón de KHP equivalentes a 100, 500 y 1500 mg/L de DQO con concentraciones crecientes de cloruros (500, 1000, 1500 y 2000 mg/L), con el fin de evaluar el posible efecto de interferencia sobre la cuantificación del analito.

Tabla 4.3. Evaluación de la selectividad cuantitativa del método frente a cloruros mediante ensayos de recuperación

DQO nominal (KHP) (mg/L)	Cl ⁻¹ añadido (mg/L)	DQO experimental 2 (mg/L)	DQO experimental 1 (mg/L)	Recuperación Promedio (%)	C.V.(%)	Cumple
100	500	100	102	101,30	1,43	Cumple
	1000	150	148	149,04	0,99	No cumple
	1500	154	161	157,71	2,81	No cumple
	2000	261	265	262,95	1,14	No cumple
500	500	506	504	100,98	0,30	Cumple
	1000	484	484	96,85	0,00	Cumple
	1500	478	467	94,47	1,60	Cumple
	2000	480	480	95,99	0,00	Cumple
1500	500	1430	1432	95,43	0,11	Cumple
	1000	1432	1432	95,50	0,00	Cumple
	1500	1428	1430	95,28	0,11	Cumple
	2000	1437	1439	95,86	0,11	Cumple

Como se observa en la tabla 4.3, para el nivel bajo de concentración (100 mg/L de DQO), únicamente la condición enriquecida con 500 mg/L de cloruros presentó un porcentaje de recuperación dentro del intervalo de aceptación establecido (101,30 %). En las condiciones enriquecidas con 1000, 1500 y 2000 mg/L de cloruros, se obtuvieron recuperaciones superiores al límite superior del criterio definido (110 %), por lo que dichas condiciones no cumplieron con el criterio de selectividad cuantitativa, a pesar de presentar valores de C.V.(%) inferiores al 5 %.

Para el nivel medio de concentración (500 mg/L de DQO), todas las condiciones evaluadas cumplieron con los criterios de aceptación establecidos, con porcentajes de recuperación comprendidos entre 94,47 % y 100,98 %, y coeficientes de variación inferiores al 5 %.

De igual manera, en el nivel alto de concentración (1500 mg/L de DQO), los ensayos enriquecidos con cloruros mostraron porcentajes de recuperación entre 95,28 % y 95,86 %, así como valores de C.V.(%) iguales o inferiores al 0,11 %, cumpliendo con los criterios definidos para la evaluación de la selectividad cuantitativa.

En consecuencia, los resultados confirman que el método presenta selectividad adecuada bajo las condiciones del laboratorio.

4.2.3 Límite de Detección y de Cuantificación

4.2.3.1 Estudio de blanco

La Tabla 4.4 muestra los resultados del estudio del blanco. Todas las determinaciones se realizaron aplicando el procedimiento analítico completo, con el fin de capturar la variabilidad inherente al método en ausencia del analito.

Tabla 4.4 Estudio de blanco

Número	Día 1	Día 2	Día 3
	Abs	Abs	Abs
1	0,001	0,001	0,001
2	0,001	0,003	0,001
3	0,000	0,002	0,003
4	0,000	0,001	0,005
5	0,003	0,000	0,000
6	0,000	0,002	0,000
7	0,000	0,005	0,003
8	0,001	0,004	0,001
9	0,001	0,000	0,005
10	0,002	0,000	0,000

Nota: Elaboración propia

Con el propósito de evaluar la homogeneidad del blanco a lo largo de los días de medición, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, considerando como grupos los resultados obtenidos en cada día de análisis.

Como muestra la tabla 4.5 el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre los promedios diarios ($p > 0,05$), por lo que los resultados del blanco fueron considerados estadísticamente homogéneos y aptos para su tratamiento conjunto.

Tabla 4.5 ANOVA del estudio de blanco

Fuente	Suma de cuadrados	GDL	MS	<i>F</i>	Valor-p
Tratamiento	6,066e-06	2	3,033e-06	1,147	0,3325
Error	0,0000714	27	2,6444e-06		
Total	7,7466e-5	29			

Nota: Elaboración propia

4.2.3.2 Cálculo teórico del LOD y LOQ

El cálculo teórico del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ) se realizó a partir de los resultados obtenidos en el estudio del blanco descrito en la Sección 4.2.3.1, aplicando el enfoque basado en la desviación estándar del blanco recomendado por la Guía EURACHEM.

De acuerdo con el diagrama de decisión presentado en la figura 2.1 y utilizando la expresión correspondiente para la desviación estándar corregida del blanco (s'_0), se obtuvo el valor de s'_0 a partir de los datos experimentales del blanco de 0,00200172 unidades de abs.

La estimación teórica del LOD y del LOQ se efectuó aplicando las expresiones indicadas en la ecuación 2.4 y 2.5 respectivamente, empleando la pendiente de la curva de calibración general del método.

A partir de estos cálculos, se estimaron los siguientes límites teóricos del método:

- LOD teórico: 13 mg/L de DQO
- LOQ teórico: 43 mg/L de DQO

El límite de detección experimental obtenido fue de 13 mg/L y el límite de cuantificación de 43 mg/L, valores que se encuentran dentro del rango esperado para métodos colorimétricos de DQO de alta sensibilidad.

Estos resultados cumplen con el enfoque estadístico propuesto por EURACHEM (2014) y son comparables con los reportados por Jácome (2014), quien obtuvo un LOD cercano a 15 mg/L en un rango similar de trabajo. De igual manera, Zumba (2018) reportó valores de LOQ superiores a 40 mg/L en matrices de aguas residuales domésticas, lo que evidencia coherencia metodológica.

Desde el punto de vista metrológico, estos valores garantizan que el método posee sensibilidad suficiente para aplicaciones de monitoreo ambiental.

4.2.3.3 Comprobación experimental del LOD

La comprobación experimental del límite de detección se realizó mediante el análisis de blancos fortificados a una concentración cercana al valor teórico estimado (≈ 13 mg/L de DQO), efectuándose siete determinaciones independientes bajo condiciones de repetibilidad.

El valor medio experimental obtenido fue de 12,8 mg/L, con una desviación estándar de 1,06 mg/L y un coeficiente de variación de 8,27 %. La diferencia absoluta entre el valor medio experimental y el LOD teórico (13 mg/L) fue inferior a dos veces la desviación estándar del método, cumpliéndose el criterio de coherencia estadística establecido.

Asimismo, la repetibilidad obtenida en este nivel de concentración cumplió con el criterio definido para el LOD ($RSD \leq 20\%$), y las recuperaciones individuales se encontraron dentro del intervalo aceptable de 80 a 120 %, conforme a los criterios establecidos.

La evaluación conjunta de estos resultados, resumida en la Tabla 4.6, confirma que el valor de 13 mg/L de DQO cumple con los criterios de aceptación definidos y es representativo del límite de detección experimental del método.

Tabla 4.6 Comprobación experimental del límite de detección (LOD)

Criterio de aceptación	Condición establecida	Valor experimental	Criterio	Cumple
Coherencia estadística	$ \bar{x} - LOD_{teo} \leq 2S$	0.2	≤ 2.12	Cumple
Precisión en el nivel del LOD	$RSD \leq 20\%$	8,27%	$\leq 20\%$	Cumple
Recuperación aceptable	80-120%	86,55-103,24%	80-120%	Cumple

Nota: Los criterios de aceptación aplicados corresponden a los definidos en la Sección 3.5.2.2.2

4.2.3.4 Comprobación experimental del LOQ

La comprobación experimental del límite de cuantificación se realizó mediante el análisis de blancos fortificados a una concentración cercana al valor teórico estimado (43 mg/L de DQO), efectuándose siete determinaciones independientes bajo condiciones de repetibilidad y aplicando el procedimiento analítico completo.

El valor medio experimental obtenido fue de 42,9 mg/L, con una desviación estándar de 3,03 mg/L y un coeficiente de variación de 7,07 %, evidenciando una adecuada precisión del método en este nivel de concentración y cumpliendo con el criterio de aceptación establecido para el LOQ ($RSD \leq 20\%$).

Las recuperaciones individuales obtenidas se encontraron dentro del intervalo 91,8–106,9 %, cumpliendo con el rango de aceptación definido (80–120 %) para la evaluación de la exactitud en el nivel del límite de cuantificación.

Adicionalmente, el nivel evaluado (43 mg/L) cumple con la relación práctica establecida para el límite de cuantificación, al ser superior a tres veces el MDL previamente determinado ($3 \times MDL = 9,99$ mg/L), garantizando una cuantificación fiable y reproducible. Asimismo, se mantiene la consistencia con los valores teóricos del método, verificándose que el LOQ es superior al LOD previamente establecido (43 mg/L $>$ 13 mg/L).

La evaluación conjunta de los criterios de precisión, recuperación y confirmación de la relación práctica $LOQ \geq 3 \times MDL$, resumida en la Tabla 4.7, confirma que el valor de 43 mg/L de DQO cumple con los criterios de aceptación definidos y es representativo del límite de cuantificación experimental del método.

Tabla 4.7 Comprobación experimental del límite de cuantificación (LOQ)

Criterio de aceptación	Condición establecida	Valor experimental	Cumple
Precisión en el nivel del LOQ	$RSD \leq 20\%$	$RSD = 7,07$	Cumple
Recuperación aceptable	80-120%	91,8 – 106,9	Cumple
Confirmación de relación práctica $LOQ \geq 3 \times MDL$	$LOQ \geq 3 \times MDL$	43 mg/L \geq $9,99$ mg/L	Cumple
Consistencia con LOD y LOQ teóricos	$LOQ > LOD$	43 mg/L $>$ 13 mg/L	Cumple

Nota: Los criterios de aceptación aplicados corresponden a los definidos en la Sección 3.5.2.3.2

4.2.4 Linealidad: Estudio de curva por día

La linealidad del método fue evaluada mediante la construcción de curvas de calibración independientes en tres días distintos, utilizando soluciones patrón de KHP en el intervalo de 0 a 1500 mg/L de DQO. Para cada nivel de concentración se realizaron mediciones por duplicado y se ajustó un modelo de regresión lineal simple por mínimos cuadrados.

Para cada curva diaria se estimaron la pendiente, la ordenada al origen coeficiente de determinación (R^2), además de la evaluación de la significancia estadística de la pendiente y demás estadísticos.

4.2.4.1 Normalidad de los residuos: Prueba de Shapiro - Wilk

La normalidad de los residuos asociados a las curvas de calibración obtenidas en cada día de análisis fue evaluada mediante la prueba de Shapiro–Wilk. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.8

Tabla 4.8 Prueba de Shapiro-Wilk aplicada a los residuos

Día	W	p-valor	Decisión
1	0,9773	0,9384	Cumple
2	0,9418	0,3717	Cumple
3	0,9644	0,7410	Cumple

Para las curvas correspondientes a los Días 1, 2 y 3, los valores del estadístico W fueron de 0,9773, 0,9418 y 0,9644, respectivamente, con valores de $p = 0,9384$, 0,3717 y 0,7410. En todos los casos, los valores de p fueron superiores al nivel de significancia adoptado ($\alpha = 0,05$).

En consecuencia, no se rechaza la hipótesis nula de normalidad, concluyéndose que los residuos de los modelos de regresión lineal siguen una distribución aproximadamente normal en los tres días evaluados. Este resultado confirma el cumplimiento del supuesto de normalidad requerido para la aplicación de pruebas estadísticas paramétricas en la evaluación de la linealidad del método.

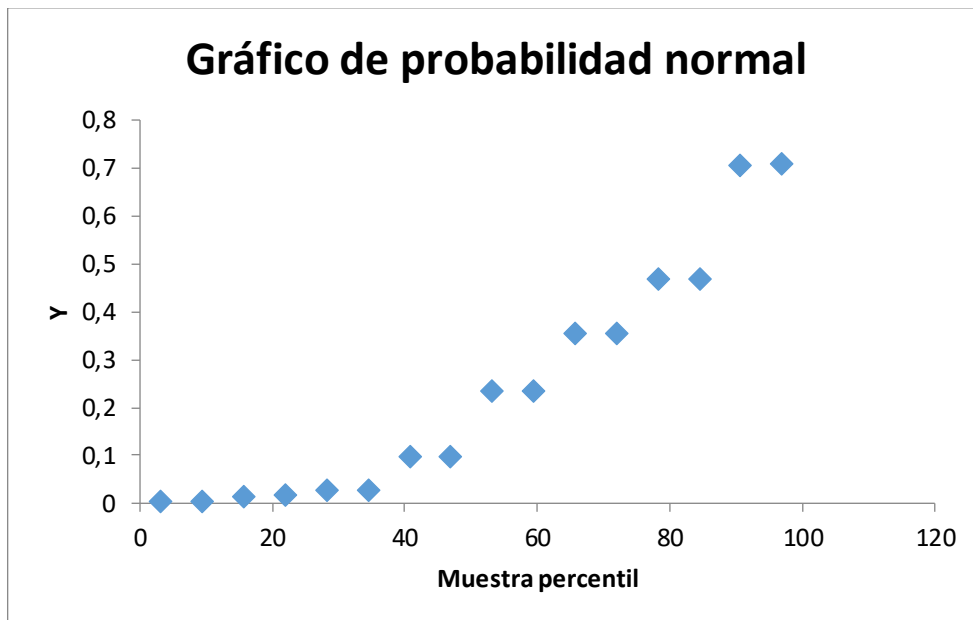


Figura 4.4 Gráfico Q-Q de los residuos - Curva Día 1

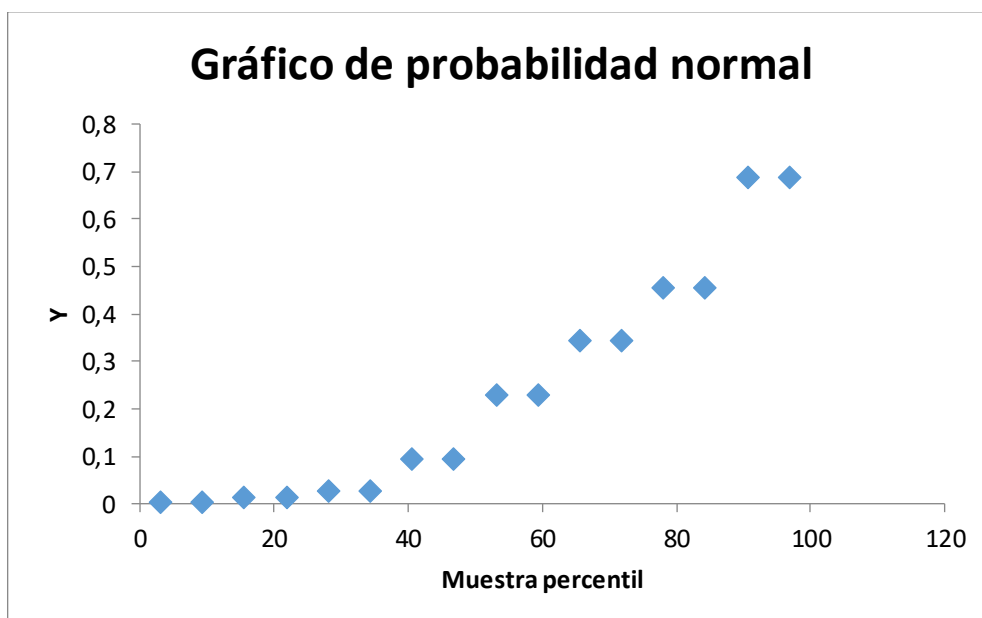


Figura 4.5 Gráfico Q-Q de los residuos - Curva Día 2

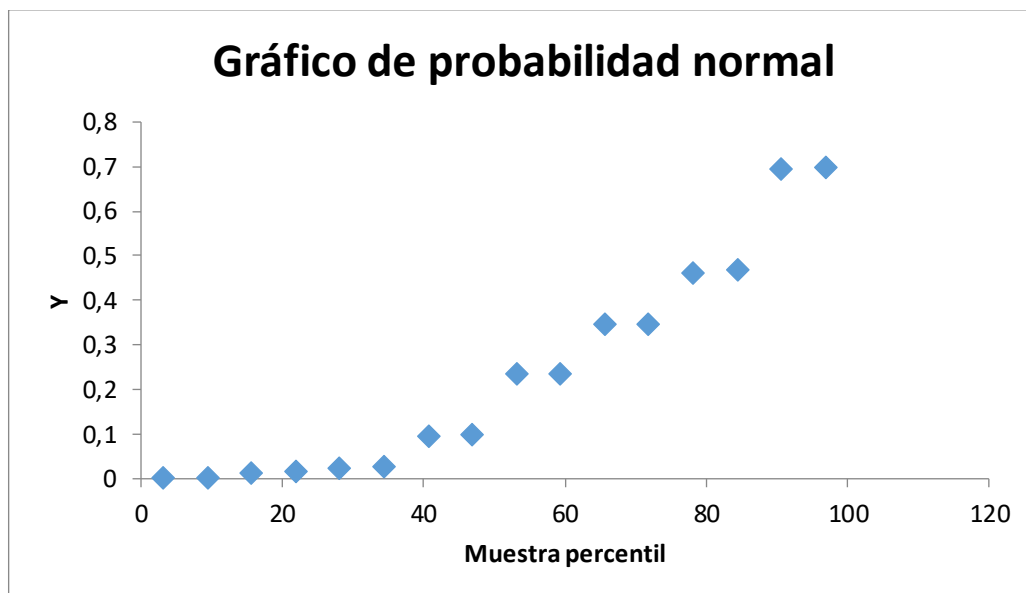


Figura 4.6 Gráfico Q-Q de los residuos - Curva Día 3

4.2.4.2 Homogeneidad de varianzas de los residuos – Prueba de White

La homogeneidad de varianzas de los residuos fue evaluada de forma independiente para cada curva de calibración diaria mediante la prueba de White. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9 Prueba de White aplicada a los residuos

Día	Estadístico $LM(X^2)$	Estadístico F	p-valor $LM(X^2)$	p-valor F	Decisión
1	4,6109	2,316	0,0997	0,1097	Cumple
2	5,8492	3,7455	0,0537	0,0519	Cumple
3	3,2107	1,6318	0,2008	0,2332	Cumple

Los resultados de la prueba de White aplicada a los residuos de las curvas de calibración correspondientes a los tres días de evaluación indican que no existe evidencia estadísticamente significativa de heterocedasticidad en ninguno de los casos analizados.

En particular, tanto el estadístico basado en la aproximación LM (χ^2) como el estadístico F presentan valores de p superiores al nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los tres días de análisis. Esto implica que no se rechaza la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas de los residuos.

En consecuencia, se concluye que los residuos de las regresiones lineales diarias presentan varianza constante a lo largo del intervalo de concentración evaluado, cumpliéndose el supuesto de homocedasticidad requerido para la aplicación válida del método de mínimos cuadrados ordinarios (OLS) en la estimación de los parámetros de calibración.

4.2.4.3 Análisis de residuales.

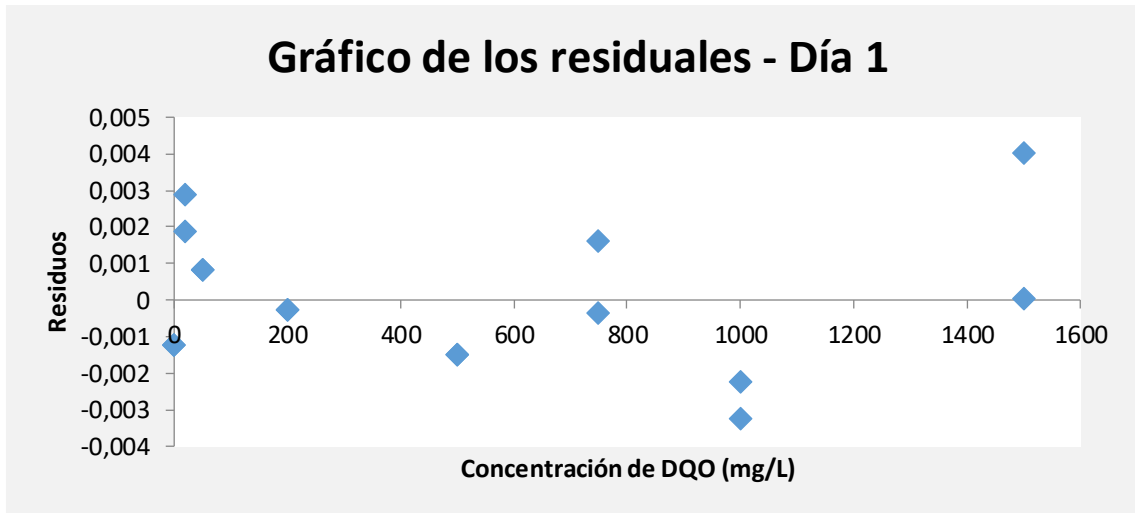


Figura 4.7 Gráfico de residuos de la curva de calibración - Día 1

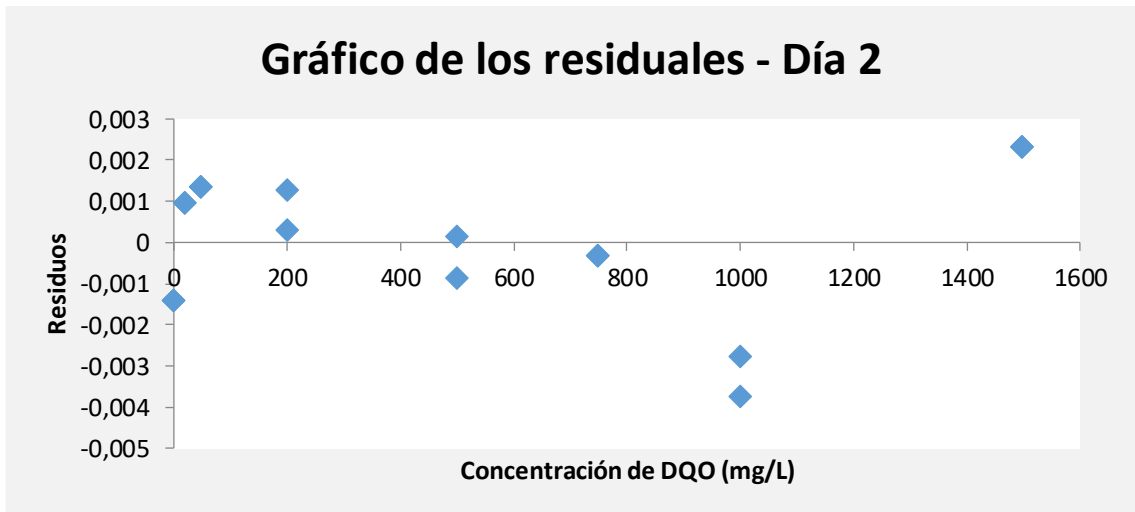


Figura 4.8 Gráfico de residuos de la curva de calibración - Día 2

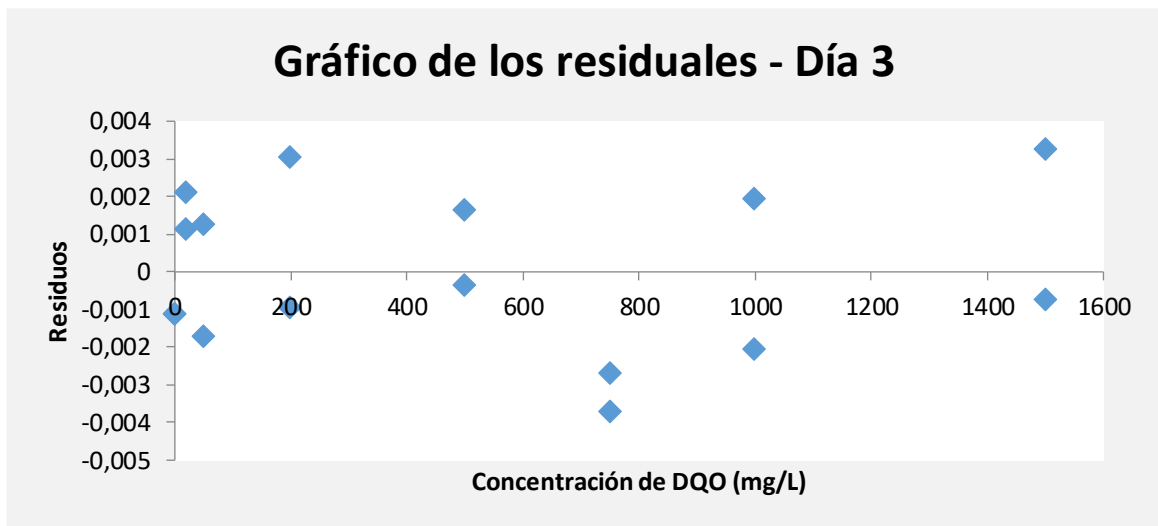


Figura 4.9 Gráfico de residuos de la curva de calibración - Día 3

Las Figuras 4.7 a 4.9 muestran los gráficos de residuos correspondientes a las curvas de calibración obtenidas en los días 1, 2 y 3, respectivamente. En los tres casos, los residuos se distribuyen de forma aleatoria alrededor del valor cero, sin evidenciar tendencias sistemáticas, estructuras definidas ni patrones de abanico a lo largo del intervalo de concentración evaluado.

Este comportamiento visual es consistente con los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas. En particular, la prueba de Shapiro–Wilk confirmó la normalidad de los residuos ($p > 0,05$), mientras que la prueba de White no evidenció heterocedasticidad significativa ($p > 0,05$) para ninguna de las curvas diarias.

En conjunto, el análisis gráfico y los contrastes estadísticos demuestran que los residuos cumplen los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia, validando la aplicación del modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados ordinarios (OLS) para la evaluación de la linealidad y el intervalo de trabajo del método.

4.2.4.4 Estadísticos de la regresión lineal simple por día

Los resultados de la regresión lineal obtenidos para las curvas de calibración construidas en los tres días de análisis se resumen en la Tabla 4.10. En todos los casos, se observó una relación lineal clara entre la absorbancia y la concentración de DQO dentro del intervalo evaluado.

Tabla 4.10 Parámetros de regresión de las curvas de calibración

Día	Pendiente (m)	Ordenada (b)	R^2
1	0,0004674	0,002792	0,99994
2	0,0004538	0,002959	0,99995
3	0,0004613	0,002654	0,99993

Los valores elevados del coeficiente de determinación ($R^2 \geq 0,9999$) indican que más del 99,9 % de la variabilidad de la señal es explicada por el modelo lineal.

Tabla 4.11 ANOVA sobre la pendiente - Curva día 1

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,91137992	0,91137992	229780,6238	6,52614E-31
Residuos	14	5,55283E-05	3,9663E-06		
Total	15	0,911435448			

Tabla 4.12 ANOVA sobre la pendiente - Curva día 2

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,85896596	0,858965956	267556,0675	2,2489E-31
Residuos	14	4,4946E-05	3,21041E-06		
Total	15	0,911435448			

Tabla 4.13 ANOVA sobre la pendiente - Curva día 3

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,887868338	0,887868338	188059,4183	2,65305E-30
Residuos	14	6,6097E-05	4,72121E-06		
Total	15	0,887934435			

Las pendientes obtenidas para los tres días fueron del mismo orden de magnitud y resultaron estadísticamente significativas ($F > F_{critico}$), confirmando que la señal

analítica responde de manera proporcional a la concentración del analito, no existe pérdida de sensibilidad entre días.

Tabla 4.14 Intervalos de confianza (95%) de los parámetros y la ordenada

Día	Parámetro	Estimación	IC 95% inferior	IC 95% superior
1	Pendiente (m)	0,0004674	0,0004654	0,0004696
	Ordenada (b)	0,002792	0,001294	0,004291
2	Pendiente (m)	0,0004538	0,0004519	0,0004557
	Ordenada (b)	0,002959	0,001612	0,004308
3	Pendiente (m)	0,0004613	0,0004591	0,0004637
	Ordenada (b)	0,002654	0,001020	0,004290

Los intervalos de confianza al 95 % para la pendiente y la ordenada al origen de las curvas de calibración obtenidas en los tres días de evaluación se presentan en la Tabla 4.11.

En todos los casos, los intervalos de confianza de la pendiente se encuentran completamente alejados del valor cero y presentan una amplitud reducida, lo que confirma que la relación entre la absorbancia y la concentración de DQO es estadísticamente significativa y estable en cada uno de los días analizados.

Asimismo, los valores estimados de la pendiente y sus respectivos intervalos de confianza muestran una alta concordancia entre días, evidenciando una adecuada reproducibilidad del comportamiento lineal del método.

Por su parte, los intervalos de confianza de la ordenada al origen son consistentes entre los tres días y abarcan valores próximos a cero, lo cual indica la ausencia de un sesgo sistemático significativo en la señal instrumental en ausencia de analito.

En conjunto, los resultados obtenidos confirman que los parámetros de calibración presentan estimaciones precisas y confiables, respaldando la robustez del modelo de regresión lineal aplicado y su idoneidad para la cuantificación de DQO dentro del intervalo de trabajo evaluado.

4.2.4.5 Representación gráfica de las curvas de calibración por día

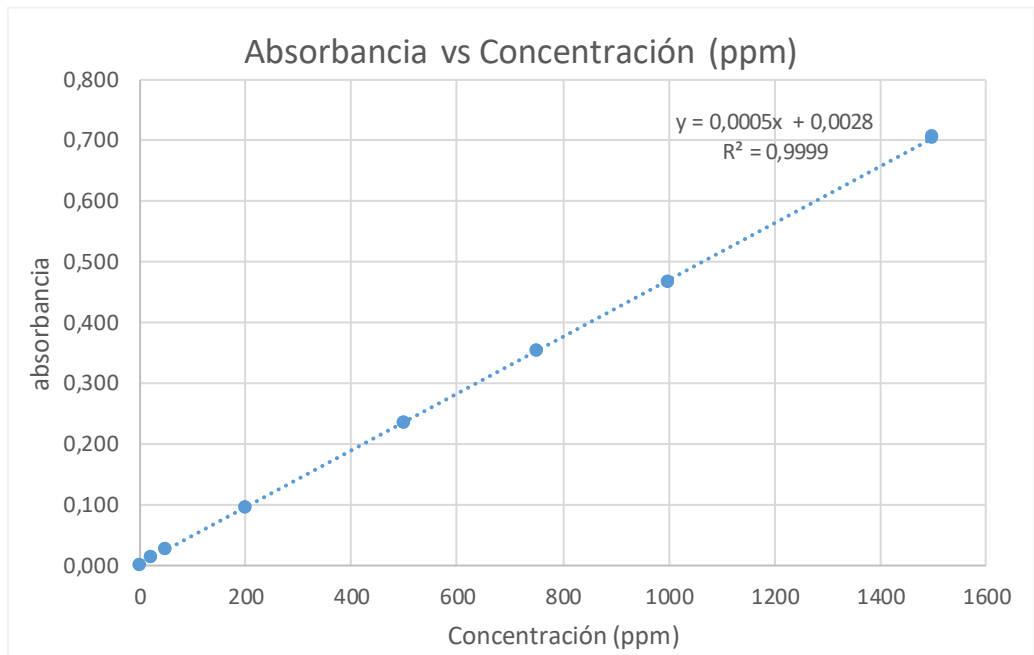


Figura 4.10 Curva de calibración del método - día 1

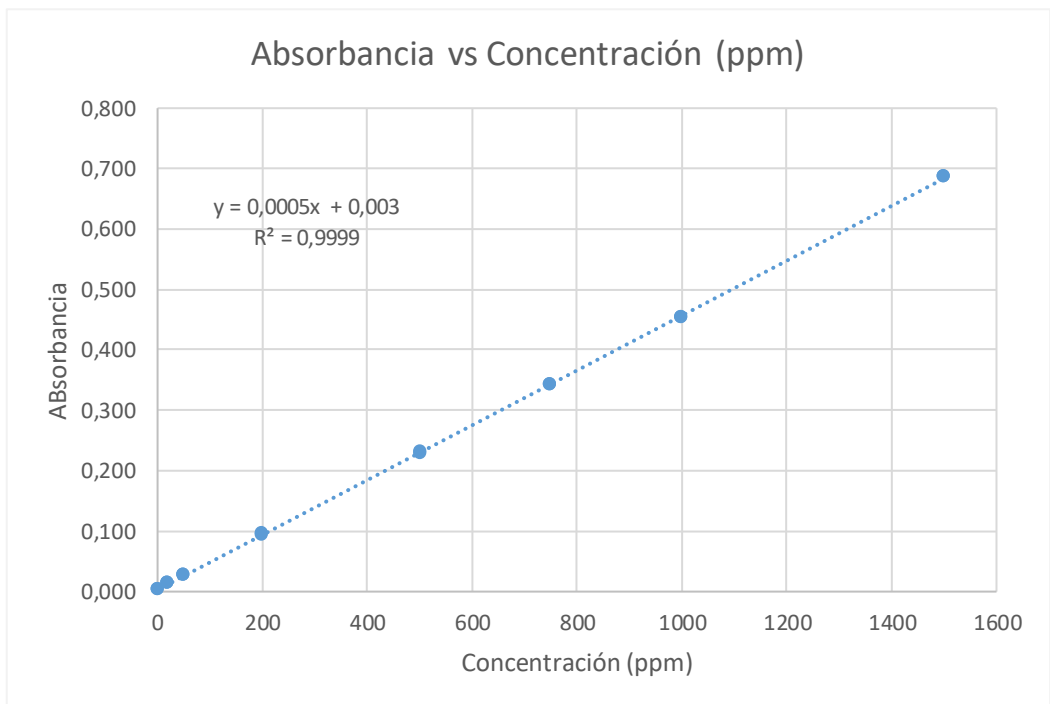


Figura 4.11 Curva de calibración del método - día 2

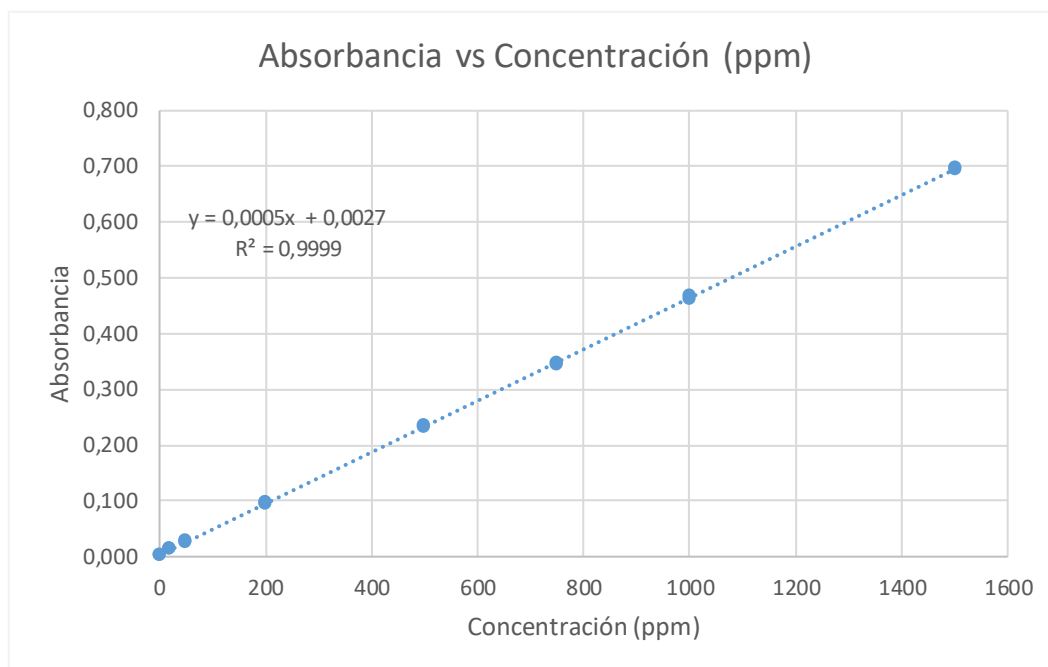


Figura 4.12 Curva de calibración del método - día 3

Las Figuras 4.10 a 4.12 muestran las curvas de calibración obtenidas para el método en los días 1, 2 y 3, respectivamente. En los tres casos se observa una relación lineal clara entre la absorbancia y la concentración de DQO a lo largo de todo el intervalo de trabajo evaluado.

Los puntos experimentales se distribuyen de forma uniforme alrededor de la recta de regresión, sin desviaciones sistemáticas ni curvaturas apreciables, lo que evidencia un comportamiento lineal consistente del sistema instrumental. Esta observación visual es coherente con los elevados valores del coeficiente de determinación obtenidos en cada día ($R^2 > 0,999$), lo que indica que el modelo lineal explica prácticamente la totalidad de la variabilidad observada en los datos.

Asimismo, la similitud en la pendiente y la ordenada entre las curvas diarias confirma la estabilidad del método y la reproducibilidad del ajuste lineal en el tiempo. En conjunto, el análisis gráfico respalda los resultados estadísticos previamente presentados, validando la linealidad del método dentro del intervalo de concentración estudiado.

4.2.5 Linealidad: Curva general

4.2.5.1 Normalidad de los residuos

La normalidad de los residuos del modelo de regresión global fue evaluada mediante la prueba de Shapiro–Wilk.

Tabla 4.15 Prueba de S-W para normalidad de residuos

W	p-valor	Decisión
0,9126	0,0402	No cumple

La normalidad de los residuos del modelo de regresión lineal correspondiente a la curva de calibración general fue evaluada mediante la prueba de Shapiro–Wilk. El estadístico obtenido fue $W = 0,9126$, con un p-valor de $0,0402$.

Dado que el p-valor es inferior al nivel de significancia de $0,05$, se rechaza la hipótesis nula de normalidad, concluyéndose que los residuos no siguen estrictamente una distribución normal cuando se consideran conjuntamente los datos de los tres días de evaluación.

No obstante, la desviación observada es leve y se atribuye principalmente a la ampliación del intervalo de concentración y a la incorporación de la variabilidad Inter diaria, sin comprometer la validez del ajuste lineal ni la interpretación analítica del modelo.

Cabe destacar que, para tamaños muestrales moderados y modelos de calibración analítica, el método de mínimos cuadrados ordinarios mantiene su robustez frente a desviaciones leves de la normalidad de los residuos, especialmente cuando se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas y no se evidencian patrones sistemáticos en el análisis gráfico de residuos.

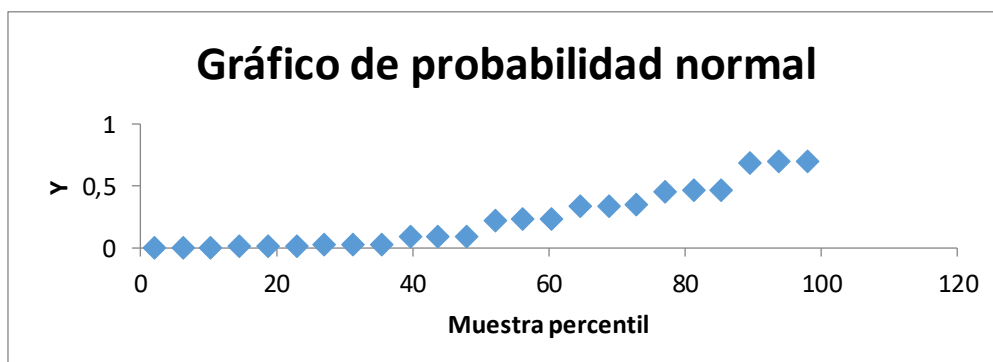


Figura 4.13 Gráfico de normalidad

4.2.5.2 Homogeneidad de varianzas

La homogeneidad de varianzas de los residuos del modelo de regresión lineal correspondiente a la curva de calibración general fue evaluada mediante la prueba de White, la cual permite detectar heterocedasticidad.

Tabla 4.16 Test de homocedasticidad

Estadístico $LM (X^2)$	Estadístico F	Grados de libertad	p-valor $LM (X^2)$	p-valor F	Decisión
4,873	0,956	5	0,430	0,456	Cumple

La homogeneidad de varianzas de los residuos del modelo de regresión lineal correspondiente a la curva de calibración general fue evaluada mediante la prueba de White. Los resultados obtenidos no evidenciaron heterocedasticidad estadísticamente significativa, tanto en el contraste LM como en el estadístico F ($p > 0,05$).

En consecuencia, se concluye que el supuesto de varianza constante de los errores se cumple para el modelo de calibración general, lo que respalda la validez del ajuste por mínimos cuadrados ordinarios dentro del intervalo de trabajo evaluado.

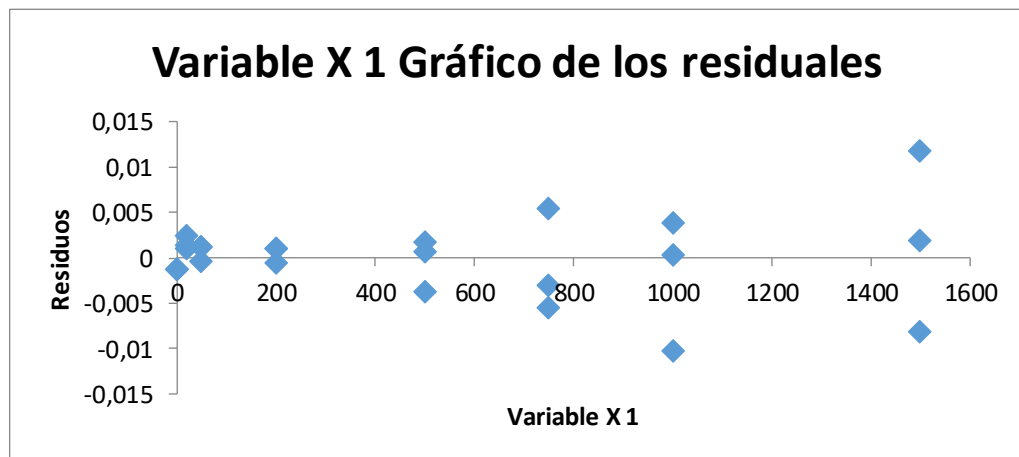


Figura 4.14 Gráfico de variabilidad de residuos

4.2.5.3 Estadísticos de la regresión lineal

Los estadísticos generales del modelo de regresión lineal ajustado a la curva de calibración general se presentan en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17 Estadísticos globales de la regresión lineal de la curva general

Estadístico	Valor
Coefficiente de correlación múltiple	0,9998
Coefficiente de determinación R^2	0,9996
R^2 ajustado	0,9996
Error típico	0,00444
Observaciones	24

El coeficiente de determinación obtenido ($R^2 = 0,9997$) indica que el 99,97 % de la variabilidad observada en la señal instrumental es explicada por el modelo lineal, lo que evidencia un ajuste excelente de los datos experimentales. La mínima diferencia entre R^2 y R^2 ajustado confirma que el modelo no presenta sobreajuste y que la inclusión de una única variable explicativa es adecuada.

El error típico del ajuste (0,00445 unidades de absorbancia) es bajo en relación con el rango total de señal, lo que refleja una dispersión residual reducida y una buena capacidad predictiva del modelo.

El análisis de varianza del modelo se presenta en la Tabla 4.18, con el objetivo de evaluar la significancia global de la regresión.

Tabla 4.18 ANOVA del modelo de regresión lineal

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1,328912305	1,328912305	67192,55109	7,76987E-40
Residuos	22	0,000435109	1,97777E-05		
Total	23	1,329347413			

El estadístico F obtenido es extremadamente elevado ($F = 67192,55$) y el p-valor asociado es mucho menor que 0,05, lo que conduce al rechazo de la hipótesis nula de ausencia de relación lineal. Este resultado confirma que el modelo de regresión es globalmente significativo y que la variación de la absorbancia está fuertemente asociada a la concentración de DQO.

Los coeficientes estimados del modelo, junto con sus errores estándar e intervalos de confianza al 95 %, se presentan en la Tabla 4.19.

Tabla 4.19 Coeficientes de la regresión lineal de la curva general

Parámetro	Estimación	Error típico	IC 95% inferior	IC 95% superior
Pendiente (m)	0,00046089	$1,78 \times 10^{-6}$	0,00045720	0,00046458
Ordenada (b)	0,002802	0,00127371	0,00016085	0,00544388

La pendiente del modelo presenta un intervalo de confianza estrecho y completamente alejado del valor cero, lo que confirma una sensibilidad analítica significativa y estable del método. El bajo error estándar asociado a la pendiente evidencia una estimación precisa de este parámetro.

Por su parte, la ordenada al origen presenta un intervalo de confianza que incluye valores próximos a cero, lo que indica la ausencia de un sesgo sistemático significativo en la señal instrumental en ausencia de analito.

4.2.5.4 Representación gráfica de la curva

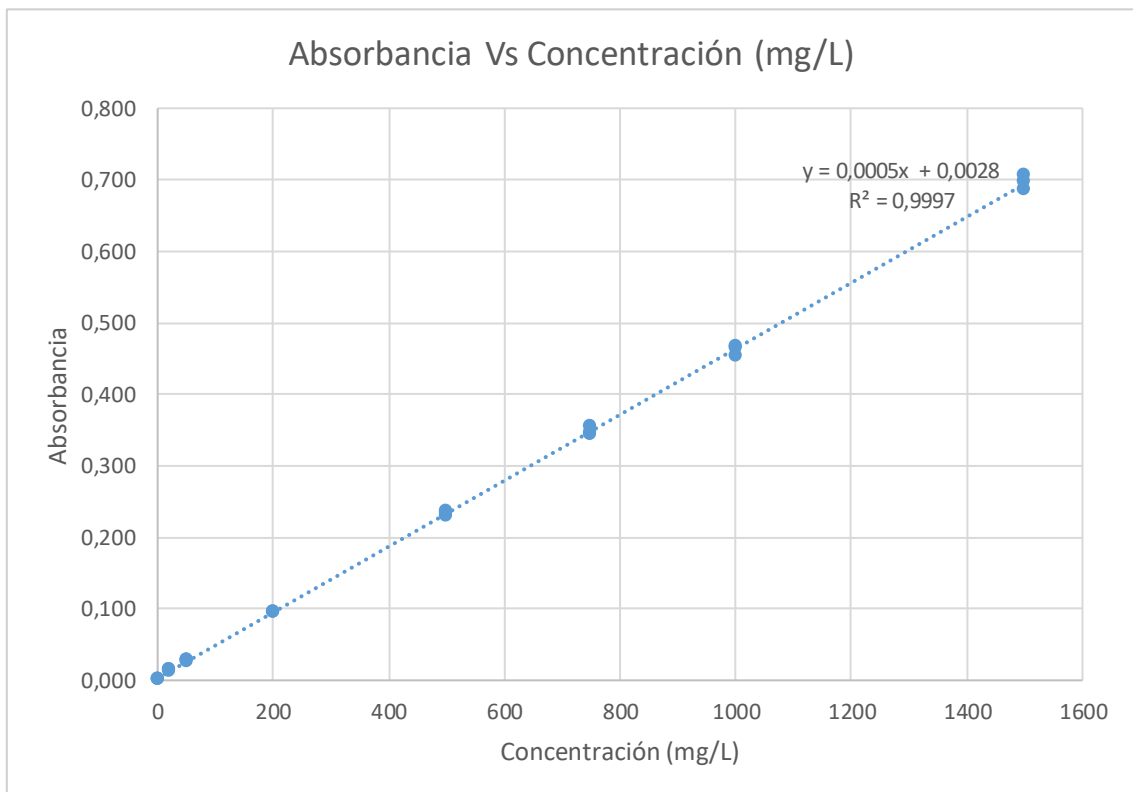


Figura 4.15 Curva de calibración general para la determinación de DQO

La Figura 4.15 muestra la representación gráfica de la curva de calibración general obtenida a partir de la integración de los datos experimentales de los tres días de análisis. Se observa una relación lineal clara entre la absorbancia y la concentración de DQO a lo largo de todo el intervalo de trabajo evaluado.

Los puntos experimentales se distribuyen de manera uniforme alrededor de la recta de regresión, sin evidenciar curvaturas. El coeficiente de determinación obtenido para la curva general fue superior a 0.995, cumpliendo el criterio recomendado por EURACHEM (2014) para métodos cuantitativos.

Este comportamiento lineal es consistente con lo reportado por Zumba (2018), quien obtuvo $R^2 = 0.997$ en el mismo intervalo de concentración (100–1500 mg/L). Asimismo, Paucar (2022) reportó coeficientes superiores a 0.996 para el método HACH 8000.

La ausencia de patrones sistemáticos en los gráficos de residuos y el cumplimiento de homocedasticidad refuerzan la validez del modelo lineal. En términos prácticos, la linealidad confirmada asegura trazabilidad en la cuantificación de muestras reales.

4.2.6 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del método se evaluó a partir de la pendiente de la curva de calibración general, obtenida mediante regresión lineal de la absorbancia en función de la concentración de DQO dentro del intervalo de trabajo estudiado.

La pendiente estimada fue de $0,0004609 \text{ Abs}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$, lo que indica que el método presenta una respuesta instrumental claramente diferenciable frente a variaciones en la concentración del analito. Este valor refleja una adecuada capacidad del método para detectar cambios pequeños en la concentración de DQO de manera proporcional y reproducible.

4.2.7 Efecto matriz

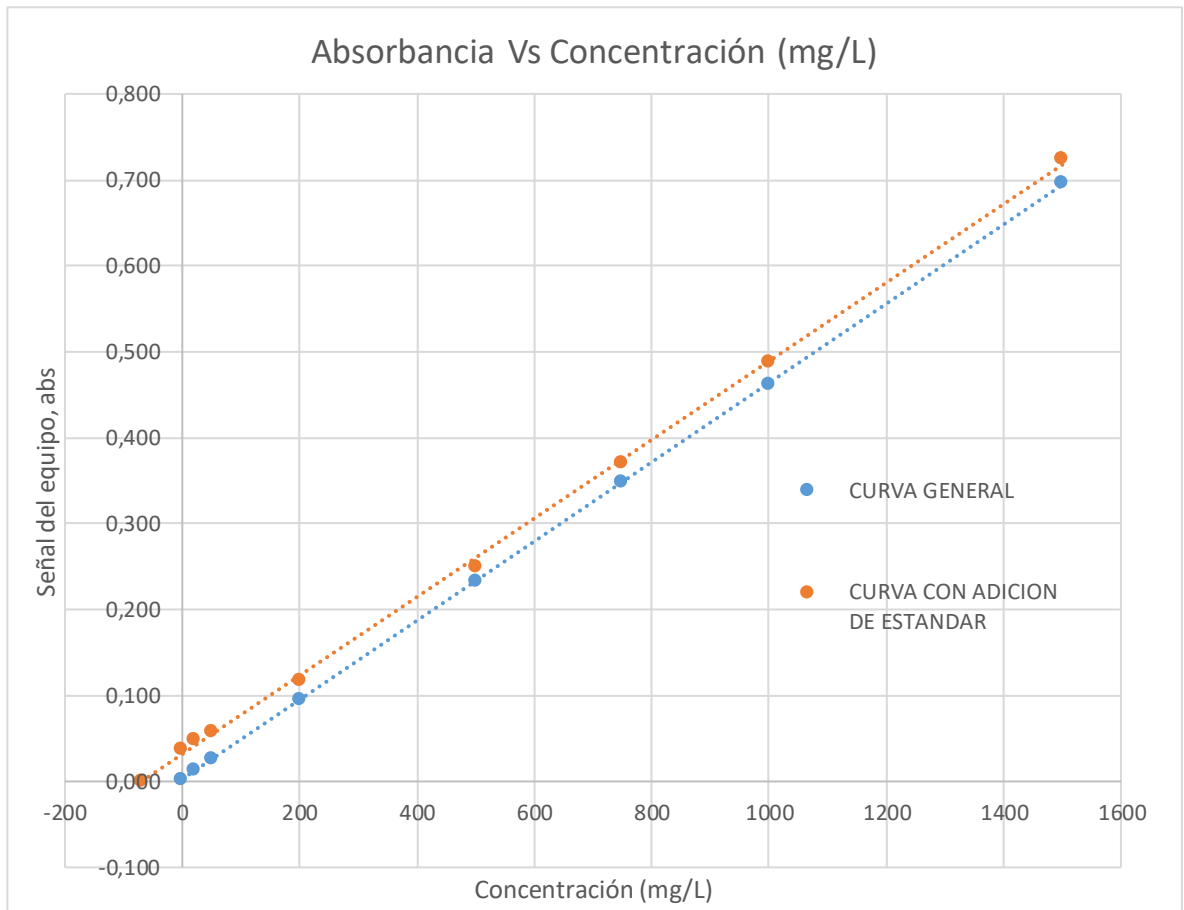


Figura 4.16 Curvas de calibración obtenidas por calibración externa y por adición estándar

La figura 4.16 muestra la comparación entre la curva de calibración general y la curva obtenida mediante adición estándar. Visualmente, ambas curvas presentan un comportamiento lineal y pendientes similares a lo largo del intervalo de concentración evaluado, sin evidenciar diferencias marcadas en la respuesta instrumental atribuibles a la matriz.

Tabla 4.20 Parámetros de regresión lineal obtenidos para la curva general y la curva con adición estándar

Tipo de curva	Pendiente (m)	Error estándar de la pendiente	Ordenada	R^2
Calibración externa	0,000460891	$1,03065 \times 10^{-6}$	0,002802	0,99967
Adición estándar	0,000457108	$4,7727 \times 10^{-6}$	0,03180	0,99934

Tabla 4.21 Evaluación del efecto matriz mediante el intervalo de confianza del 90% del cociente de pendientes

Parámetro	Valor
Pendiente curva general	0,0004609
Pendiente curva con adición estándar	0,0004571
Cociente de pendientes, R	0,992
Error estándar de ln (R)	0,011
IC 90% inferior	0,972
IC 90% superior	1,012
Margen de aceptación	0,90-1,10
Decisión	Cumple

Nota: IC₉₀ calculado según Eurachem para comparación de pendientes.

La tabla 4.21 presenta la evaluación del efecto matriz mediante la comparación estadística de las pendientes obtenidas por calibración externa y por adición estándar. El cociente de pendientes fue de 0,992 y su intervalo de confianza al 90 % se encontró completamente contenido dentro del margen de aceptación técnica establecido (0,90–1,10). Estos resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes, evidenciando la ausencia de efecto matriz significativo en el intervalo de concentración evaluado.

4.3 Estudio de Exactitud

4.3.1 Veracidad: evaluación de sesgo

La veracidad del método se evaluó mediante el análisis de un material de referencia certificado (MRC) para DQO. El MRC presentó un valor certificado de 142 mg/L con una incertidumbre expandida de ± 4 mg/L ($k = 2$), lo que define un intervalo certificado de 138–146 mg/L. El certificado de análisis del MRC se incluye en el Anexo C

Tabla 4.22 Evaluación de la veracidad del método mediante material de referencia certificado (MRC)

Réplica	Resultado (mg/L)	Recuperación (%)	Cumple Intervalo Declarado	Cumple %Recuperación
1	145	102,1	Cumple	Cumple
2	142	100,0	Cumple	Cumple
3	141	99,3	Cumple	Cumple
4	145	102,1	Cumple	Cumple
5	141	99,3	Cumple	Cumple
6	145	102,1	Cumple	Cumple
7	138	97,2	Cumple	Cumple
8	141	99,3	Cumple	Cumple
9	146	102,8	Cumple	Cumple
10	146	102,8	Cumple	Cumple

Los resultados experimentales obtenidos para $n = 10$ réplicas del MRC se muestran en la tabla 4.22 En todas las réplicas, los valores medidos se ubicaron dentro del intervalo certificado (138–146 mg/L).

La recuperación individual osciló entre 97,2 % y 102,8 %, mientras que la recuperación promedio fue de 100,7 %, cumpliendo el criterio de aceptación establecido para el estudio (por ejemplo, 90–110 %). Estos resultados evidencian una adecuada concordancia entre el valor experimental y el valor certificado del MRC.

Tabla 4.23 Resumen estadístico de la evaluación del sesgo

Parámetro	Valor
Valor del MRC declarado (mg/L)	142
Incertidumbre Expandida declarada (mg/L)	4
Intervalo Declarado, (mg/L)	138 - 146
Factor de cobertura, k	2
Promedio, mg/L	143,00
Desviación estándar , mg/L	3
C.V variación, %	2
Sesgo, b, mg/L	1
Sesgo, b (%), relativo	0,7
R(%)	100,7
n	10
t experimental	1,15
t crítico (alfa=0,05; n-1 gdl)	2,26
¿Existe o no un sesgo significativo?	No existe

Nota: El certificado de análisis del MRC se presenta en el Anexo

Se muestran en la tabla 4.23 que el promedio experimental fue de 143 mg/L, por lo que el sesgo absoluto fue $b = 1$ mg/L respecto al valor certificado (142 mg/L), equivalente a un sesgo relativo de 0,7 %. La dispersión de los resultados fue baja, con una desviación estándar de 3 mg/L y un CV de 2,0 %.

La significancia del sesgo se evaluó mediante una prueba t de Student, obteniéndose un valor de $t_{exp} = 1,15$, inferior al valor crítico $t_{crit} = 2,26$ ($\alpha = 0,05$; gdl = 9). Por tanto, no se evidenció sesgo estadísticamente significativo en el nivel evaluado.

La recuperación promedio obtenida se encontró dentro del rango 90–110 %, criterio ampliamente aceptado para métodos ambientales.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Rodríguez & Zapata (2023), quienes obtuvieron recuperaciones entre 95 % y 102 % en aguas residuales domésticas. De igual manera, Jácome (2014) reportó sesgos inferiores al 5 % para niveles medios de concentración.

4.3.2 Precisión: repetibilidad y precisión intermedia

4.3.2.1 Estudio estadístico de la muestra cruda

4.3.2.1.1 Resultados

Tabla 4.24 Resultados de DQO muestra cruda por día

Réplica	Muestra cruda		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	53	54	58
2	53	60	56
3	56	55	53
4	50	53	47
5	50	50	48
6	48	52	56
promedio	52	54	53
desviación estándar	2,8751	3,4058	4,5607
C.V %	5,5648	3,1091	4,1633

Nota: Elaboración propia

Con el fin de evaluar la estabilidad de la muestra cruda a lo largo de los días de análisis. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.24, donde se observa que los valores promedio de DQO fueron 52 mg/L, 54 mg/L y 53 mg/L para los días 1, 2 y 3, respectivamente, con coeficientes de variación inferiores al 6 % en todos los casos.

Previo a la comparación estadística entre días, se evaluó la presencia de valores anómalos en los resultados de la muestra cruda mediante la prueba de Grubbs, aplicada de forma independiente a cada día de análisis, conforme a las recomendaciones de guías (International Organization for Standardization, 2019).

Tabla 4.25 Prueba de Grubbs para detección de valores atípicos en la muestra cruda

Día	Estadístico G	G crítico ($\alpha = 0,05$)	p-valor	Decisión
1	1,5072	1,8871	0,1421	No se detectan valores atípicos
2	1,7617	1,8871	0,0627	No se detectan valores atípicos
3	1,3156	1,8871	0,2193	No se detectan valores atípicos

En los tres días evaluados, el estadístico de Grubbs calculado fue inferior al valor crítico correspondiente y los valores de p fueron mayores a 0,05, por lo que no se detectaron valores anómalos en ninguno de los conjuntos de datos.

4.3.2.1.2 Análisis de varianza (ANOVA) de la muestra cruda

La comparación de los resultados de DQO de la muestra cruda obtenidos en los tres días de análisis se realizó mediante un ANOVA de un factor, considerando como factor el día de medición.

Tabla 4.26 Análisis de varianza (ANOVA) de la muestra cruda

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Decisión
Entre grupos	16,4444	2	8,2222	0,6065	0,5580	3,6823	No significativo
Dentro de los grupos	203,3333	15	13,5556				
Total	219,7778	17					

El análisis de varianza no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de DQO de la muestra cruda obtenidos en los tres días de análisis ($F = 0,6065$; $p = 0,5580 > 0,05$).

Dado que el estadístico F calculado fue inferior al valor crítico y el valor de p fue mayor que el nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$), no se rechaza la hipótesis nula, concluyéndose que los promedios diarios son estadísticamente equivalentes.

En consecuencia, los resultados de DQO de la muestra cruda pueden considerarse homogéneos entre días, lo que justifica el uso de un valor promedio global de la

muestra cruda como referencia para la posterior evaluación de la recuperación en la muestra fortificada a 100 mg/L.

4.3.2.1.3 Normalidad de los residuos – Prueba de Shapiro - Wilk

La normalidad fue evaluada sobre los residuos del modelo ANOVA aplicado a los resultados de DQO de la muestra cruda en los tres días de análisis.

Tabla 4.27 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk - muestra cruda

N	W	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
18	0,964	0,62	0,05	Cumple

El estadístico obtenido fue $W = 0,964$, con un p-valor de 0,62, superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$). En consecuencia, no se rechaza la hipótesis nula de normalidad, indicando que los residuos presentan una distribución compatible con la normal. Gráficamente podemos verlos en la figura 4.17

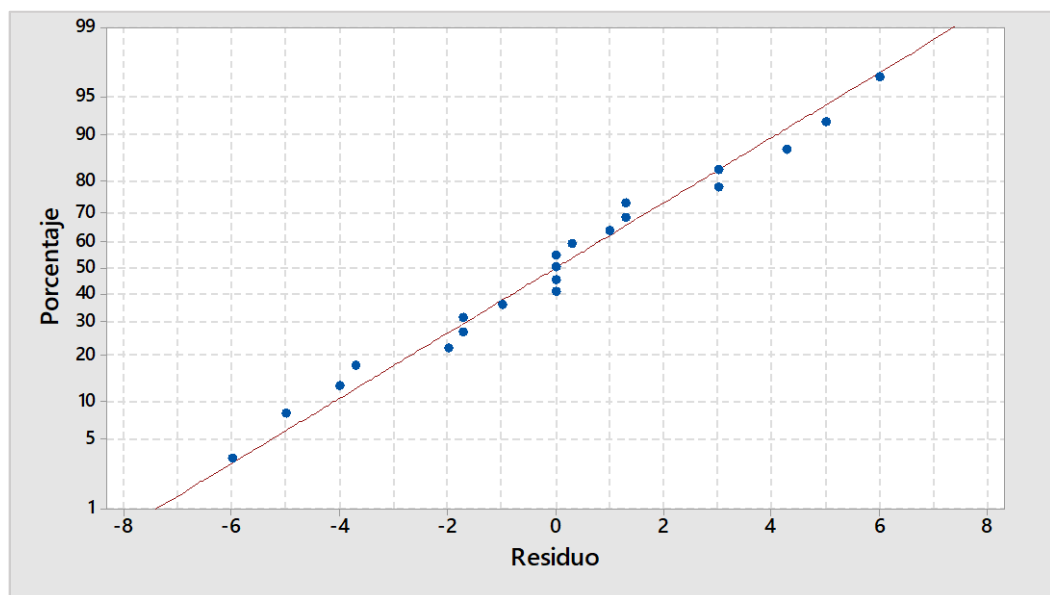


Figura 4.17 Gráfico de probabilidad normal – muestra cruda

4.3.2.1.4 Homogeneidad de Varianzas – Prueba de Brown-Forsythe

La homogeneidad de varianzas fue evaluada sobre los residuos del modelo ANOVA correspondiente a los resultados de DQO de la muestra cruda analizada en los tres días.

Tabla 4.28 Prueba de Brown-Forsythe – Muestra cruda

Número de grupos	Estadístico F	Grados de libertad (numerador)	Grados de libertad (denominador)	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
3	0,61	2	15	0,56	0,05	Cumple

La homogeneidad de varianzas de los residuos del modelo ANOVA fue evaluada mediante la prueba de Brown-Forsythe. El estadístico obtenido fue $F = 0,61$, con un p-valor de 0,56, superior al nivel de significancia adoptado ($\alpha = 0,05$). En consecuencia, no se rechaza la hipótesis nula de igualdad de varianzas, indicando que la variabilidad de los residuos es estadísticamente equivalente entre los tres días de análisis.

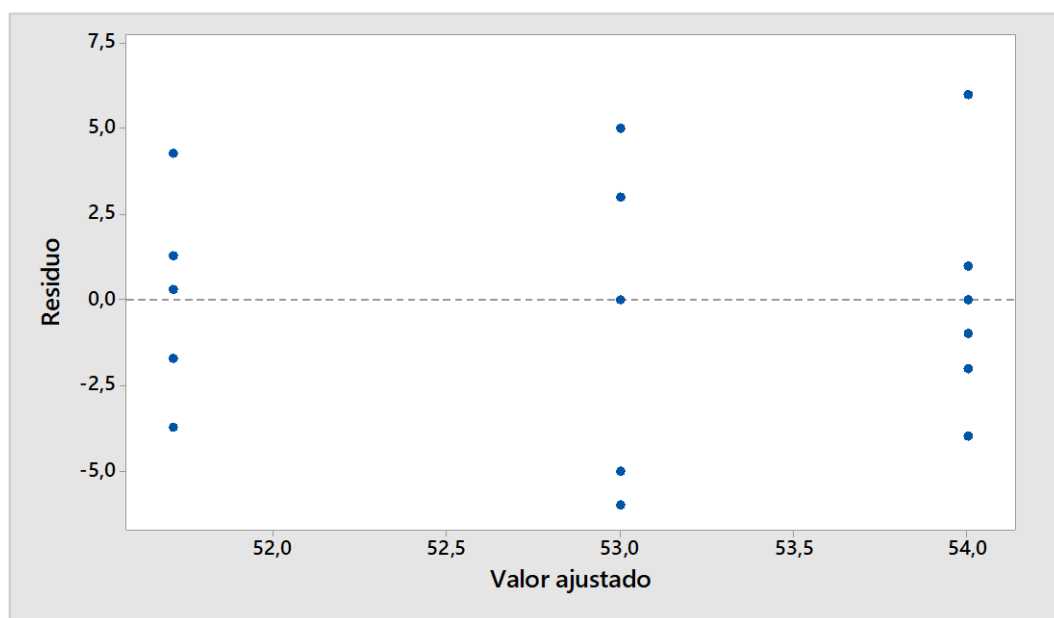


Figura 4.18 Evaluación de los residuales en la matriz cruda

El gráfico de residuos en función de los valores ajustados muestra una dispersión aleatoria alrededor de la línea cero, sin evidencia de patrones sistemáticos ni tendencias dependientes del nivel de respuesta.

4.3.2.2 Nivel de 100 mg/L

4.3.2.2.1 Resultados

En la Tabla 4.29 se presentan los resultados obtenidos para la muestra de agua residual fortificada a un nivel bajo de 100 mg/L de DQO.

Los valores promedio diarios obtenidos fueron 138,17 mg/L (Día 1), 140,17 mg/L (Día 2) y 141,33 mg/L (Día 3). Los coeficientes de variación (%RSD) se situaron entre 1,23 % y 2,18 %, lo que evidencia una adecuada precisión intradía del método en este nivel de concentración.

Tabla 4.29 Resultados de DQO de la muestra de agua residual fortificada 100 mg/L

Rango bajo (mg/L)	100		
Réplica	Muestra + KHP		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	137	143	142
2	137	140	144
3	140	139	138
4	141	141	144
5	138	138	143
6	137	140	137
promedio	138,17	140,17	141,33
desviación estándar	1,9407	1,7224	3,0767
C.V % o %RSD	1,4046	1,2288	2,1769

La recuperación fue calculada de forma adimensional para cada réplica, considerando la diferencia entre la muestra fortificada y la muestra cruda, en relación con la concentración añadida (100 mg/L).

Los valores promedio de recuperación obtenidos mostrados en la tabla 4.30 fueron 0,87 para el Día 1; 0,87 para el Día 2 y 0,88 para el Día 3. Todas las recuperaciones individuales se encuentran dentro del intervalo de aceptación establecido por el criterio de Horwitz para este nivel de concentración de acuerdo con la tabla 4.30

Los resultados obtenidos indican que el método presenta una recuperación adecuada, consistente y reproducible para el nivel bajo de 100 mg/L.

Tabla 4.30 Recuperación adimensional de DQO en muestra fortificada 100 mg/L

Rango bajo (% Recuperación)	100		
Réplica	Muestra + KHP		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	0,84	0,90	0,89
2	0,84	0,87	0,91
3	0,87	0,86	0,85
4	0,88	0,88	0,91
5	0,85	0,85	0,90
6	0,84	0,87	0,84
promedio	0,85	0,87	0,88

4.3.2.2.2 Análisis de varianza (ANOVA)

En la tabla 4.31 se muestra que el estadístico F calculado ($F = 2,48$) fue inferior al valor crítico de F ($F_{\text{crítico}} = 3,68$) y el valor de probabilidad asociado ($p = 0,117$) resultó mayor que el nivel de significancia $\alpha = 0,05$. Mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias diarias

Tabla 4.31 ANOVA sobre las recuperaciones de la fortificación 100 mg/L

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Decisión
Entre grupos	0,002564	2	0,001282	2,4814	0,1172	3,6823	No significativo
Dentro de los grupos	0,00775	15	0,000516				
Total	0,01031	17					

4.3.2.2.3 Normalidad de los residuos – Prueba de Shapiro-Wilk

La normalidad fue evaluada sobre los residuos del modelo ANOVA aplicado a los resultados de DQO de la muestra fortificada en los tres días de análisis.

Tabla 4.32 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk – 100 mg/L

W	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
0,964	0,61	0,05	Cumple

El estadístico obtenido fue $W = 0,964$, con un p-valor de 0,61, superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$). En consecuencia, no se rechaza la hipótesis

nula de normalidad, indicando que los residuos presentan una distribución compatible con la normal. Gráficamente podemos verlos en la figura 4.19

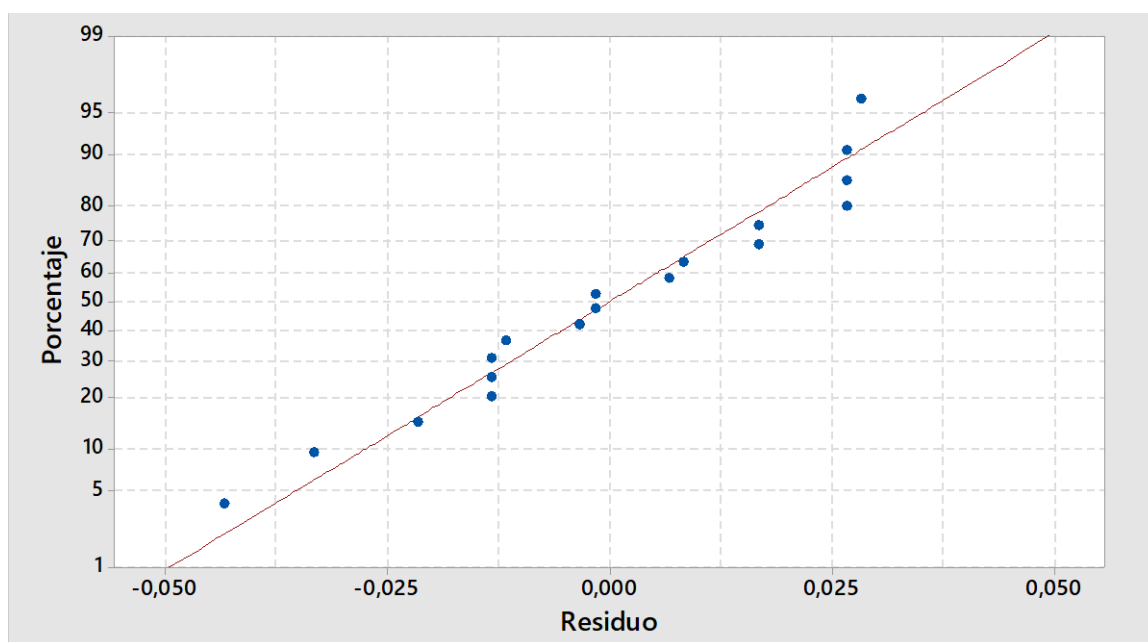


Figura 4.19 Gráfico de probabilidad Normal – matriz fortificada de 100 mg/L

4.3.2.2.4 Homogeneidad de Varianzas – Prueba de Brown-Forsythe

La homogeneidad de varianzas fue evaluada sobre los residuos del modelo ANOVA correspondiente a los resultados de DQO de la muestra cruda analizada en los tres días.

Tabla 4.33 Prueba de Brown-Forsythe– 100 mg/L

Estadístico F	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
0,84	0,45	0,05	Cumple

Dado que el valor de p obtenido ($p = 0,45$) es mayor que el nivel de significancia ($\alpha = 0,05$), no se detectan diferencias significativas entre las varianzas. Se cumple el supuesto de homocedasticidad de los residuos para el nivel de 100 mg/L.

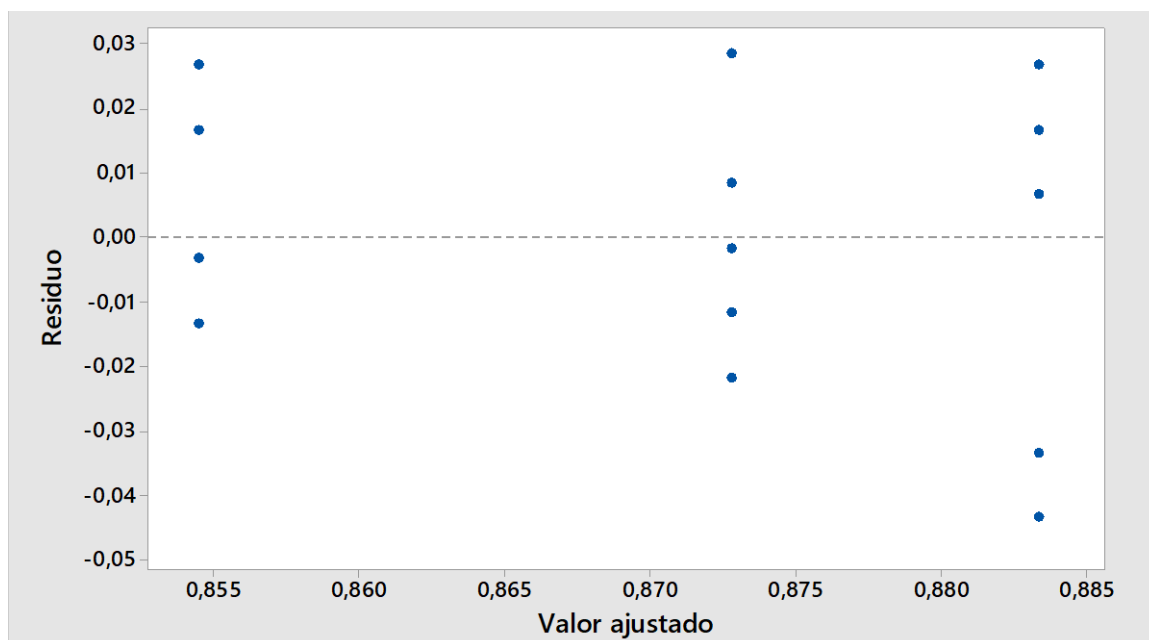


Figura 4.20 Evaluación de los residuales en la matriz fortificada de 100 mg/L

4.3.2.2.5 Evaluación de la precisión

La precisión del método en el nivel de 100 mg/L de DQO fue evaluada mediante los coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia (Tabla 4.34). Se obtuvieron valores de $CV_r = 2,61\%$ y $CV_R = 3,37\%$, ambos inferiores a los criterios de aceptación establecidos (4 % y 8 %, respectivamente), por lo que el método cumple los requisitos de precisión en este nivel.

Tabla 4.34 Evaluación de la precisión en el nivel 100 mg/L

Parámetro estadístico	Símbolo	Objetivo (%)	Experimental (%)	Decisión
Coefficiente de variación (repetibilidad)	CV_r	4	2,61	Cumple
Coefficiente de variación (precisión intermedia)	CV_R	8	3,37	Cumple

Los parámetros derivados de precisión se presentan en la Tabla 4.35, donde la gran media fue $\bar{y} = 0,8702$, con desviaciones estándar de repetibilidad $S_r = 0,0227$, intralaboratorio $S_L = 0,0185$ y reproducibilidad $S_R = 0,0293$. El límite de repetibilidad

obtenido fue $r = 6,36 \text{ mg/L}$ (7,31 %), confirmando una variabilidad adecuada bajo condiciones de repetibilidad.

Tabla 4.35 Parámetros derivados de precisión en el nivel de 100 mg/L

Parámetro	Valor
Gran media, \bar{y}	0,8702
Desviación estándar de repetibilidad, S_r	0,0227
Desviación estándar de intra-laboratorio, S_L	0,0185
Desviación estándar de reproducibilidad, S_R	0,0293
Límite de repetibilidad, r (mg/L)	6,36
Límite de repetibilidad relativo, $r(\%)$	7,31

4.3.2.3 Nivel de 300 mg/L

4.3.2.3.1 Resultados

En la tabla 4.36 se presentan los resultados obtenidos para la muestra de agua residual fortificada a un nivel bajo de 300 mg/L de DQO.

Tabla 4.36 Resultados de DQO de la muestra de agua residual fortificada 300 mg/L

Rango medio (mg/L)	300		
	Muestra + KHP		
Réplica	Día 1	Día 2	Día 3
1	402	400	421
2	410	401	412
3	400	400	398
4	402	397	411
5	398	398	413
6	399	400	395
promedio	401,83	399,33	408,33
desviación estándar	4,3089	1,5055	9,8725
C.V % o %RSD	1,0723	0,3770	2,4177

Las recuperaciones adimensionales obtenidas oscilaron entre 0,94 y 1,03, con valores promedio diarios de 0,962 (Día 1), 0,954 (Día 2) y 0,984 (Día 3) como se muestran en la tabla 4.37, encontrándose todas las réplicas dentro del intervalo de aceptación establecido por el criterio de Horwitz modificado (89,8–110,2 %) para este nivel de concentración.

Tabla 4.37 Recuperación adimensional de DQO en muestra fortificada 300 mg/L

Rango medio (% Recuperación)	300		
Réplica	Muestra + KHP		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	0,96	0,96	1,03
2	0,99	0,96	1,00
3	0,96	0,96	0,95
4	0,96	0,95	0,99
5	0,95	0,95	1,00
6	0,95	0,96	0,94
promedio	0,96	0,95	0,99

4.3.2.3.2 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza de un factor aplicado a los resultados experimentales mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios diarios ($F = 1,973$; $p = 0,173 > 0,05$), como se presenta en la Tabla 4.38.

Tabla 4.38 ANOVA sobre las recuperaciones de la fortificación 300 mg/L

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Decisión
Entre grupos	0,00012716	2	6,35802E-05	1,9731	0,1734	3,6823	No significativo
Dentro de los grupos	0,000483333	15	3,22222E-05				
Total	0,000610494	17					

4.3.2.3.3 Normalidad de los residuos – Prueba de Shapiro – Wilk

La normalidad de los residuos del modelo ANOVA aplicado a los resultados de DQO en el nivel de 300 mg/L fue evaluada mediante la prueba de Shapiro–Wilk, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$

Tabla 4.39 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk – 300 mg/L

W	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
0,958	0,43	0,05	Cumple

El estadístico obtenido fue $W = 0,958$, con un p-valor de 0,43, superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$). En consecuencia, no se rechaza la hipótesis

nula de normalidad, indicando que los residuos presentan una distribución compatible con la normal. Gráficamente podemos verlos en la figura 4.21

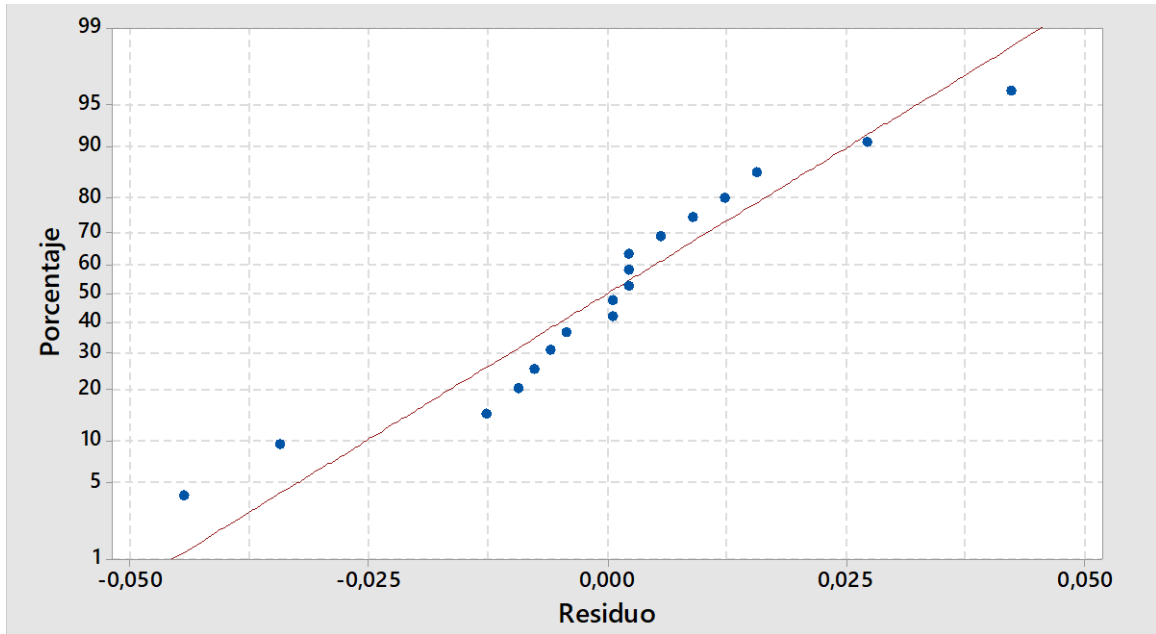


Figura 4.21 Gráfico de probabilidad Normal - matriz fortificada de 300 mg/L

4.3.2.3.4 Homogeneidad de varianzas – Prueba de Brown – Forsythe

La homogeneidad de varianzas de los residuos correspondientes a la matriz fortificada a 300 mg/L fue evaluada mediante la prueba de Brown–Forsythe. Como se muestra en la Tabla 4.40, el estadístico F obtenido fue 1,32, con un p-valor de 0,29, superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$).

Tabla 4.40 Prueba de Brown-Forsythe – 300 mg/L

Estadístico F	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
1,32	0,29	0,05	Cumple

En consecuencia, no se rechaza la hipótesis nula de igualdad de varianzas, confirmándose la homocedasticidad de los residuos entre los días de análisis.

Este resultado es coherente con la Figura 4.22, donde los residuos se distribuyen de manera aleatoria alrededor de cero y presentan una dispersión comparable a lo largo del rango de valores ajustados, sin evidenciar patrones sistemáticos ni incremento de la variabilidad.

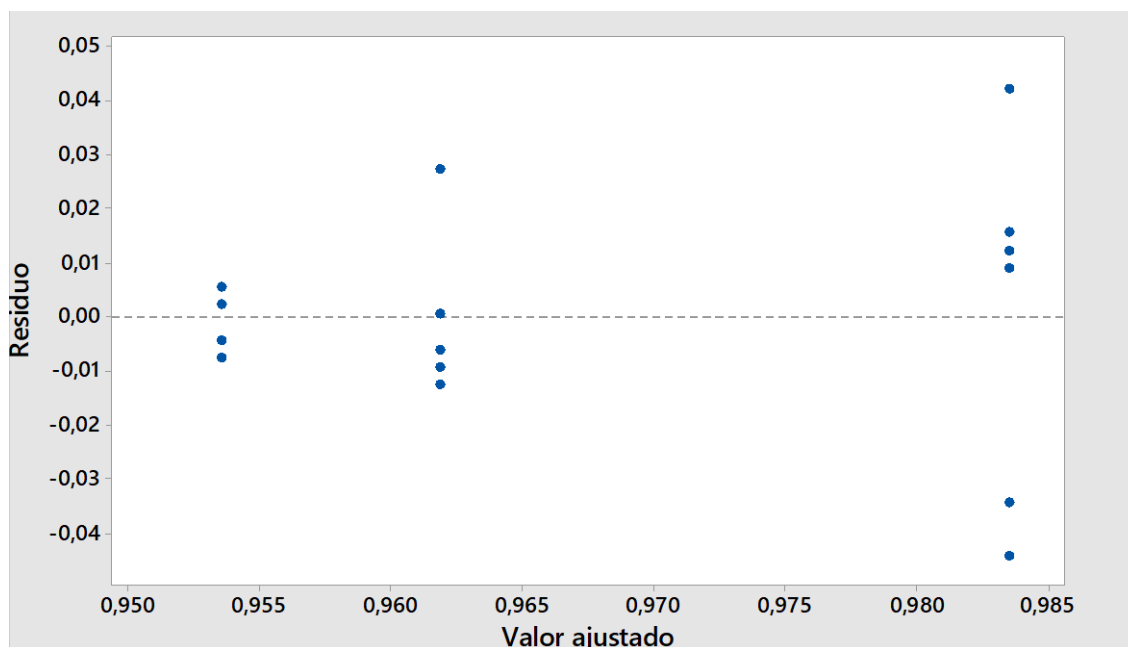


Figura 4.22 Evaluación de los residuales en la matriz fortificada de 300 mg/L

4.3.2.3.5 Evaluación de la precisión

La precisión del método en el nivel de 300 mg/L de DQO fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia, de acuerdo con los criterios establecidos. Como se presenta en la tabla 4.41, el coeficiente de variación experimental bajo condiciones de repetibilidad ($CV_r = 2,17\%$) resultó inferior al valor objetivo (3,39%), mientras que el coeficiente de variación de precisión intermedia ($CV_R = 2,55\%$) también fue menor al criterio establecido (6,78%). En ambos casos, los resultados cumplen los criterios de aceptación.

Tabla 4.41 Evaluación de la precisión en el nivel 300 mg/L

Parámetro estadístico	Símbolo	Objetivo (%)	Experimental (%)	Decisión
Coeficiente de variación (repetibilidad)	CV_r	3,39	2,17	Cumple
Coeficiente de variación (precisión intermedia)	CV_R	6,78	2,55	Cumple

Los parámetros derivados de precisión se resumen en la Tabla 4.42, donde se obtuvo una gran media adimensional de 0,9663, una desviación estándar de repetibilidad (S_r) de 0,02093 y una desviación estándar de reproducibilidad (S^R) de

0,02459. El límite de repetibilidad calculado fue de 17,58 mg/L, correspondiente a un límite relativo de 6,06 % para el nivel evaluado.

Tabla 4.42 Parámetros derivados de precisión en el nivel de 300 mg/L

Parámetro	Valor
Gran media, \bar{y}	0,9663
Desviación estándar de repetibilidad, S_r	0,02093
Desviación estándar de intra-laboratorio, S_L	0,01291
Desviación estándar de reproducibilidad, S_R	0,02459
Límite de repetibilidad, r (mg/L)	17,5828
Límite de repetibilidad relativo, $r(\%)$	6,06

4.3.2.4 Nivel de 700 mg/L

4.3.2.4.1 Resultados

En la Tabla 4.43 se presentan los resultados de DQO obtenidos para la muestra de agua residual fortificada a un nivel nominal de 700 mg/L, evaluada durante tres días consecutivos con seis réplicas por día. Los valores promedio diarios obtenidos fueron 815,00 mg/L (día 1), 816,33 mg/L (día 2) y 803,50 mg/L (día 3), con coeficientes de variación inferiores al 3 % en todos los casos, lo que evidencia una adecuada dispersión de los datos.

Tabla 4.43 Resultados de DQO de la muestra de agua residual fortificada 700 mg/L

Rango medio (mg/L)	700		
	Muestra + KHP		
	Día 1	Día 2	Día 3
Réplica			
1	785	822	813
2	795	813	812
3	827	824	801
4	833	816	801
5	824	812	791
6	826	811	803
promedio	815,00	816,33	803,50
desviación estándar	19,8494	5,4650	8,1424
C.V % o %RSD	2,4355	0,6694	1,0133

La Tabla 4.44 muestra la recuperación adimensional correspondiente al nivel de 700 mg/L. Las recuperaciones promedio diarias fueron 1,002, 1,004 y 0,986, respectivamente. Todos los valores individuales de recuperación se encuentran

dentro del intervalo de aceptación establecido por el criterio de Horwitz modificado (91,0–109,0 %) para este nivel de concentración, cumpliendo con los requisitos de veracidad.

Tabla 4.44 Recuperación adimensional de DQO en muestra fortificada 700 mg/L

Rango medio (% Recuperación)	700		
Réplica	Muestra + KHP		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	0,96	1,01	1,00
2	0,97	1,00	1,00
3	1,02	1,02	0,98
4	1,03	1,00	0,98
5	1,02	1,00	0,97
6	1,02	1,00	0,99
promedio	1,002	1,004	0,986

4.3.2.4.2 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a las recuperaciones adimensionales de la fortificación a 700 mg/L mostró un valor del estadístico $F = 1,83$, con un p-valor = 0,1947, superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$), tal como se presenta en la Tabla 4.45. concluyéndose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de recuperación obtenidas en los distintos días de análisis.

Tabla 4.45 ANOVA sobre las recuperaciones de la fortificación 700 mg/L

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Decisión
Entre grupos	0,001219	2	0,0006096	1,8282	0,1947	3,6823	No significativo
Dentro de los grupos	0,005001	15	0,0003334				
Total	0,006220	17					

4.3.2.4.3 Normalidad de los residuos – Prueba de Shapiro –

Wilk

El estadístico obtenido fue $W = 0,96$, con un p-valor = 0,41, superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$).

En consecuencia, no se rechaza la hipótesis nula de normalidad, indicando que los residuos del modelo presentan un comportamiento compatible con una distribución normal para el nivel evaluado.

Tabla 4.46 Prueba de normalidad de Shapiro - Wilk - 700 mg/L

W	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
0,96	0,41	0,05	Cumple

Este comportamiento es coherente con la gráfica de probabilidad normal mostrada en la figura 4.23, donde los residuos se distribuyen de manera aproximadamente lineal alrededor de la recta teórica, sin desviaciones sistemáticas ni colas pronunciadas.

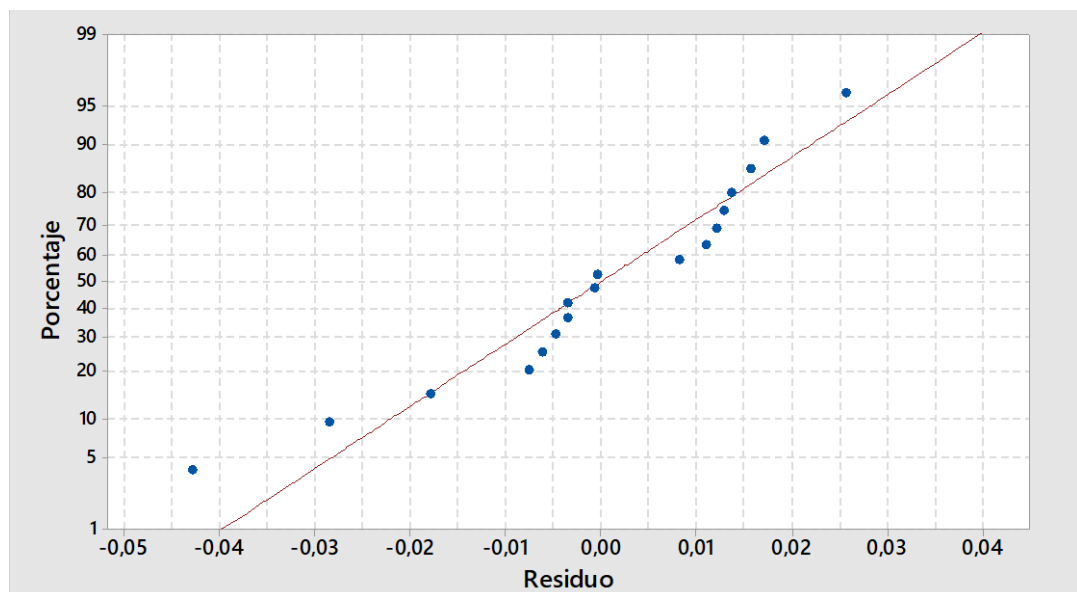


Figura 4.23 Gráfico de probabilidad Normal - matriz fortificada de 700 mg/L

4.3.2.4.4 Homogeneidad de varianzas – Prueba de Brown – Forsythe

El estadístico $F = 1,83$, con un $p\text{-valor} = 0,19$, valor superior al nivel de significancia ($\alpha = 0,05$). Por lo tanto, no se detectan diferencias significativas entre las varianzas, confirmando el cumplimiento del supuesto de homocedasticidad para este nivel de concentración.

Tabla 4.47 Prueba de Brown - Forsythe - 700 mg/L

Estadístico F	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
1,83	0,19	0,05	Cumple

Adicionalmente, el gráfico de residuos frente a los valores ajustados no evidencia patrones de apertura, cierre ni dependencia de la dispersión con el nivel de respuesta, lo que respalda visualmente el cumplimiento del supuesto de homocedasticidad.

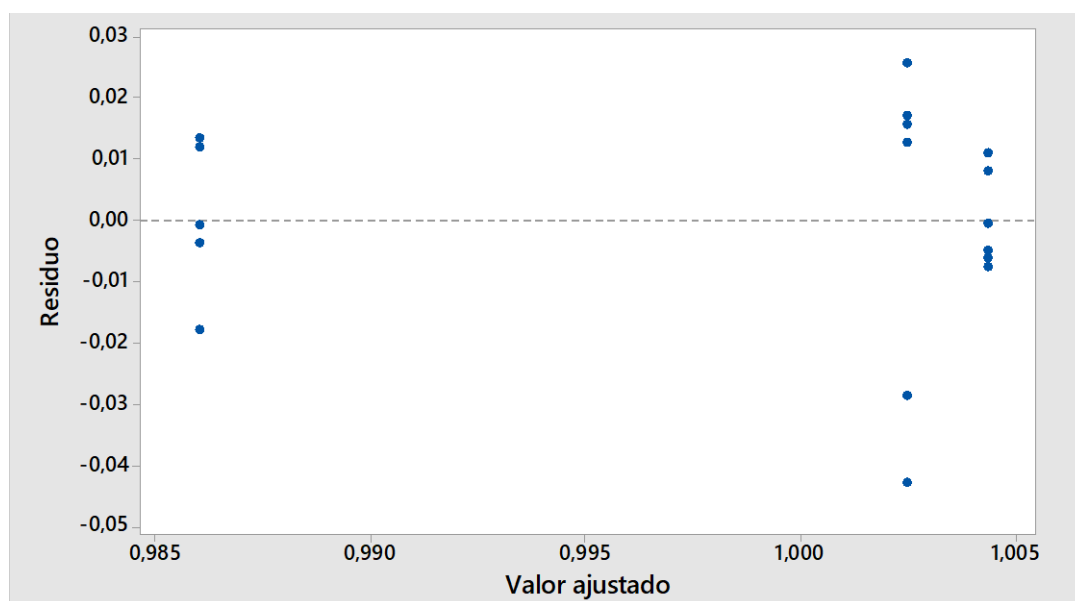


Figura 4.24 Evaluación de los residuales en la matriz fortificada de 700 mg/L

4.3.2.4.5 Evaluación de la precisión

La precisión del método en el nivel de 700 mg/L de DQO fue evaluada mediante el coeficiente de variación bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. El coeficiente de variación de repetibilidad (CV_r) obtenido fue 1,83 %, inferior al criterio objetivo de 2,98 %, mientras que el coeficiente de variación de precisión intermedia (CV_R) fue 1,95 %, cumpliendo el límite establecido de 5,97 % (Tabla 4.48).

Tabla 4.48 Evaluación de la precisión en el nivel 700 mg/L

Parámetro estadístico	Símbolo	Objetivo (%)	Experimental (%)	Decisión
Coeficiente de variación (repetibilidad)	CV_r	2,98	1,83	Cumple
Coeficiente de variación (precisión intermedia)	CV_R	5,97	1,95	Cumple

Los parámetros derivados de precisión muestran una gran media adimensional de 0,9976, con una desviación estándar de repetibilidad (S_r) de 0,01826 y una desviación estándar de reproducibilidad (S_R) de 0,01948 (Tabla 4.49). El límite de repetibilidad absoluto fue de 35,79 mg/L, correspondiente a un límite relativo de 5,13 %, valores consistentes con la variabilidad observada a este nivel de concentración.

Tabla 4.49 Parámetros derivados de precisión en el nivel de 700 mg/L

Parámetro	Valor
Gran media, \bar{y}	0,9976
Desviación estándar de repetibilidad, S_r	0,01826
Desviación estándar de intra-laboratorio, S_L	0,006784
Desviación estándar de reproducibilidad, S_R	0,01948
Límite de repetibilidad, r (mg/L)	35,79
Límite de repetibilidad relativo, $r(\%)$	5,13

4.3.2.5 Nivel de 1500 mg/L

4.3.2.5.1 Resultados

Los resultados obtenidos para la muestra de agua residual fortificada a 1500 mg/L de DQO se presentan en la Tabla 4.50. Los resultados obtenidos para la muestra de agua residual fortificada a 1500 mg/L de DQO se presentan en la Tabla 4.50

Tabla 4.50 Resultados de DQO de la muestra de agua residual fortificada 1500 mg/L

Rango medio (mg/L)	1500		
Réplica	Muestra + KHP		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	1614	1615	1592
2	1647	1632	1660
3	1608	1621	1569
4	1641	1659	1603
5	1598	1619	1595
6	1620	1652	1606
promedio	1621,33	1633,00	1604,17
desviación estándar	19,0962	18,4499	30,3012
C.V % o %RSD	1,1778	1,1298	1,8889

La recuperación adimensional correspondiente a la fortificación de 1500 mg/L se resume en la Tabla 4.51. Los resultados indican que el método presenta buena exactitud y estabilidad en el nivel alto de 1500 mg/L, con recuperaciones consistentes y una variabilidad controlada entre días.

Tabla 4.51 Recuperación adimensional de DQO en muestra fortificada 1500 mg/L

Rango medio (% Recuperación)	1500		
Réplica	Muestra + KHP		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	1,00	1,00	0,99
2	1,02	1,01	1,03
3	1,00	1,01	0,97
4	1,02	1,03	0,99
5	0,99	1,00	0,99
6	1,00	1,03	1,00
promedio	1,005	1,013	0,994

4.3.2.5.2 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza aplicado a las recuperaciones adimensionales obtenidas en la fortificación a 1500 mg/L de DQO (Tabla 4.52) no evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los días de análisis. Estos resultados confirman la estabilidad intermedia del método y la consistencia de las recuperaciones en el nivel alto de concentración evaluado.

Tabla 4.52 ANOVA sobre las recuperaciones de la fortificación 1500 mg/L

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	Decisión
Entre grupos	0,001121	2	0,0005609	2,3326	0,1312	3,6823	No significativo
Dentro de los grupos	0,003607	15	0,0002404				
Total	0,004729	17					

4.3.2.5.3 Normalidad de los residuos – Prueba de Shapiro – Wilk

Los resultados del contraste estadístico se presentan en la tabla 4.53. De acuerdo con el valor del estadístico W y su respectivo p-valor, no se rechaza la hipótesis nula de normalidad para un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, por lo que se concluye que los residuos siguen una distribución aproximadamente normal.

Tabla 4.53 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk – 1500 mg/L

W	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
0,95	0,311	0,05	Cumple

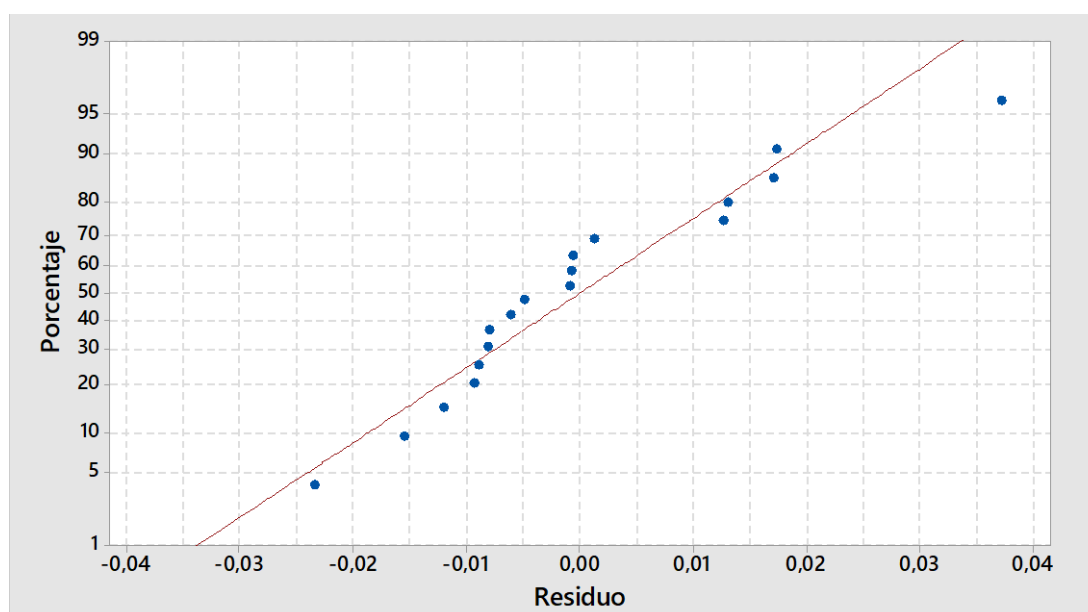


Figura 4.25 Gráfico de probabilidad Normal - matriz fortificada de 1500 mg/L

4.3.2.5.4 Homogeneidad de varianzas – Prueba de Brown – Forsythe

Los resultados del contraste se presentan en la tabla 4.55. El valor del estadístico $F = 1,84$, junto con un $p\text{-valor} = 0,19$, superior al nivel de significancia adoptado ($\alpha = 0,05$), indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los residuos, por lo que no se rechaza la hipótesis nula de homocedasticidad.

Tabla 4.54 Prueba de Brown-Forsythe – 1500 mg/L

Estadístico F	p-valor	Nivel de significancia (α)	Decisión
1,84	0,19	0,05	Cumple

Este resultado se ve respaldado por la Figura 4.26, en la cual los residuos se distribuyen de manera aleatoria alrededor del valor cero y presentan una dispersión comparable a lo largo del rango de valores ajustados, sin evidenciar patrones sistemáticos ni incremento de la variabilidad.

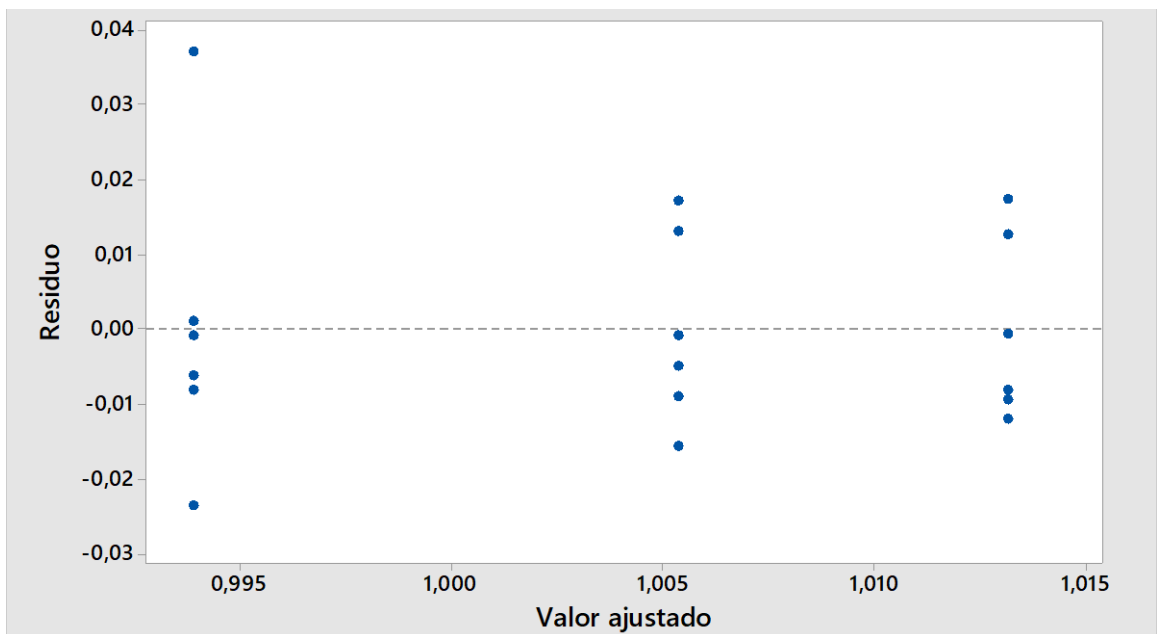


Figura 4.26 Evaluación de los residuales en la matriz fortificada de 1500 mg/L

4.3.2.5.5 Evaluación de la precisión

La precisión del método en el nivel de 1500 mg/L de DQO se evaluó mediante los coeficientes de variación de repetibilidad y precisión intermedia (Tabla 4.56). El coeficiente de variación de repetibilidad fue $CV_r = 1,54 \%$, inferior al valor objetivo (2,66 %), mientras que el coeficiente de variación de precisión intermedia fue $CV_R = 1,71 \%$, también menor al criterio de aceptación (5,32 %). Ambos parámetros cumplen los criterios establecidos.

Tabla 4.55 Evaluación de la precisión en el nivel 1500 mg/L

Parámetro estadístico	Símbolo	Objetivo (%)	Experimental (%)	Decisión
Coeficiente de variación (repetibilidad)	CV_r	2,66	1,54	Cumple
Coeficiente de variación (precisión intermedia)	CV_R	5,32	1,71	Cumple

El coeficiente de variación de repetibilidad obtenido fue $CV_r = 1,54 \%$, valor inferior al objetivo establecido (2,66 %), mientras que el coeficiente de variación de precisión intermedia fue $CV_R = 1,71 \%$, también menor al criterio de aceptación definido (5,32 %). En ambos casos, los resultados cumplen los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 4.56 Parámetros derivados de precisión en el nivel de 1500 mg/L

Parámetro	Valor
Gran media, \bar{y}	1,0041
Desviación estándar de repetibilidad, S_r	0,01550
Desviación estándar de intralaboratorio, S_L	0,007308
Desviación estándar de reproducibilidad, S_R	0,01714
Límite de repetibilidad, r (mg/L)	65,1310
Límite de repetibilidad relativo, $r(\%)$	4,3241

Los valores de RSD obtenidos fueron inferiores al 5 %, cumpliendo los criterios de repetibilidad establecidos por EURACHEM (2014). Este comportamiento es comparable con los resultados de Zumba (2018), quien reportó coeficientes de variación menores al 4 % para niveles medios y altos de DQO.

Asimismo, Gavi (2021) estableció como criterio aceptable $RSD \leq 5 \%$ para métodos de DQO en matrices complejas. Las diferencias mínimas entre días sugieren adecuada estabilidad operacional del método y control instrumental.

Por tanto, la precisión observada confirma la confiabilidad del procedimiento bajo condiciones rutinarias de laboratorio.

4.4 Estimación de la Incertidumbre

4.4.1 Nivel de 100 mg/L

La tabla 4.57 presenta el resumen del presupuesto de incertidumbre asociado a la determinación de DQO en el nivel nominal de 100 mg/L, calculado conforme a los lineamientos de la ISO/IEC Guide 98-3 (GUM).

Tabla 4.57 Resumen del presupuesto de incertidumbre para DQO - Nivel 100 mg/L

Fuente de incertidumbre	Tipo	u_i (adimensional)	u_i^2 (adimensional)	Contribución (%)
Micropipeta	B	0,00177	0,0000032	0,15
Termo reactor	B	0,00384	0,0000148	0,72
Preparación patrón KHP	B	0,00290	0,00000841	0,41
Curva de calibración	A	0,03430	0,001176	57,26
Precisión Intermedia	A	0,02448	0,000599	29,17
Veracidad (sesgo)	A	0,01589	0,000252	12,28
Total			0,002054	100,00

El análisis de contribuciones individuales se muestra en la tabla 4.57 que indica que la incertidumbre debida a la curva de calibración constituye la principal fuente, aportando aproximadamente 57 % de la incertidumbre total combinada. Las contribuciones asociadas a los equipos de medición y a la preparación del patrón resultaron significativamente menores, representando en conjunto menos < 2 % del total.

Tabla 4.58 Incertidumbre combinada y expandida en el nivel de 100 mg/L

u^2	u_c , combinada	Factor de cobertura, k	U expandida, (%)	$\pm U$ expandida (mg/L)
0,002054	0,04532	2	9	9

En la tabla 4.58 se muestra la obtención de una incertidumbre expandida relativa de 9 %, equivalente a una incertidumbre expandida absoluta de ± 9 mg/L para el nivel evaluado.

4.4.2 Nivel de 300 mg/L

La tabla 4.59 presenta el resumen del presupuesto de incertidumbre asociado a la determinación de DQO en el nivel nominal de 300 mg/L, calculado conforme a los lineamientos de la ISO/IEC Guide 98-3 (GUM).

Tabla 4.59 Resumen del presupuesto de incertidumbre para DQO - Nivel 300 mg/L

Fuente de incertidumbre	Tipo	u_i (adimensional)	u_i^2 (adimensional)	Contribución (%)
Micropipeta	B	0,001778	0,000003160	0,41
Termo reactor	B	0,003849	0,000003160	1,93
Preparación patrón KHP	B	0,000406	0,00001481	0,021
Curva de calibración	A	0,0105	0,0000001647	14,38
Precisión Intermedia	A	0,01964	0,0003859	50,33
Veracidad (sesgo)	A	0,015886	0,0002524	32,92
Total			0,0007666	100,00

El análisis de contribuciones individuales se muestra en la tabla 4.59, evidencia que la precisión intermedia constituye la principal fuente de incertidumbre, aportando aproximadamente el 50 % de la incertidumbre total combinada, seguida por la veracidad (sesgo) con un 33 % y la curva de calibración con un 14 %. Las contribuciones asociadas a los equipos de medición y a la preparación del patrón resultaron marginales, representando en conjunto menos del 3 % del total.

Tabla 4.60 Incertidumbre combinada y expandida en el nivel de 300 mg/L

u^2	u_c , combinada	Factor de cobertura, k	U expandida, (%)	$\pm U$ expandida (mg/L)
0,0007666	0,02768	2	6	17

En la tabla 4.60 se muestra la obtención de una incertidumbre expandida relativa de 6 %, equivalente a una incertidumbre expandida absoluta de ± 17 mg/L para el nivel evaluado.

4.4.3 Nivel de 700 mg/L

La tabla 4.61 presenta el resumen del presupuesto de incertidumbre asociado a la determinación de DQO en el nivel nominal de 700 mg/L, calculado conforme a los lineamientos de la ISO/IEC Guide 98-3 (GUM).

Tabla 4.61 Resumen del presupuesto de incertidumbre para DQO - Nivel 700 mg/L

Fuente de incertidumbre	Tipo	u_i (adimensional)	u_i^2 (adimensional)	Contribución (%)
Micropipeta	B	0,00178	0,00000316	0,45
Termo reactor	B	0,00385	0,00001483	2,13
Preparación patrón KHP	B	0,00041	0,00000017	0,023
Curva de calibración	A	0,00450	0,000002025	2,92
Precisión Intermedia	A	0,02006	0,00040249	58,05
Veracidad (sesgo)	A	0,01589	0,00025240	36,40
Total			0,00069330	100,0

El análisis de contribuciones individuales, presentado en la Tabla 4.61, evidencia que la precisión intermedia constituye la principal fuente de incertidumbre, aportando aproximadamente 58 % de la incertidumbre total combinada, seguida de la veracidad (sesgo) con una contribución cercana al 36 %. La incertidumbre asociada a la curva de calibración representa alrededor del 3 %, mientras que las contribuciones asociadas a los equipos de medición y a la preparación del patrón primario resultaron marginales, representando en conjunto menos del 3 % del total.

Tabla 4.62 Incertidumbre combinada y expandida en el nivel de 700 mg/L

u^2	u_c , combinada	Factor de cobertura, k	U expandida, (%)	$\pm U$ expandida (mg/L)
0,000693	0,02635	2	5	37

En la tabla 4.62 se muestra la obtención de una incertidumbre expandida relativa de 5 %, equivalente a una incertidumbre expandida absoluta de ± 37 mg/L para el nivel evaluado.

4.4.4 Nivel de 1500 mg/L

La tabla 4.63 presenta el resumen del presupuesto de incertidumbre asociado a la determinación de DQO en el nivel nominal de 1500 mg/L, calculado conforme a los lineamientos de la ISO/IEC Guide 98-3 (GUM).

Tabla 4.63 Resumen del presupuesto de incertidumbre para DQO - Nivel 1500 mg/L

Fuente de incertidumbre	Tipo	u_i (adimensional)	u_i^2 (adimensional)	Contribución (%)
Micropipeta	B	0,00178	0,00000316	0,69
Termo reactor	B	0,00385	0,00001483	3,26
Preparación patrón KHP	B	0,00041	0,00000017	0,02
Curva de calibración	A	0,00330	0,00001090	2,39
Precisión Intermedia	A	0,01318	0,00017370	38,16
Veracidad (sesgo)	A	0,01589	0,00025240	55,46
Total			0,000454	100,00

El análisis de contribuciones individuales, presentado en la Tabla 4.63, evidencia que la veracidad (sesgo) constituye la principal fuente de incertidumbre, aportando aproximadamente 55 % de la incertidumbre total combinada, seguida de la precisión intermedia, con una contribución cercana al 38 %. Las contribuciones asociadas a la curva de calibración, al termo reactor y a los equipos volumétricos resultaron significativamente menores, representando en conjunto menos del 7 % del total.

Tabla 4.64 Incertidumbre combinada y expandida en el nivel de 1500 mg/L

u^2	u_c , combinada	Factor de cobertura, k	U expandida, (%)	$\pm U$ expandida (mg/L)
0,000454	0,02133	2	4	64

En la tabla 4.64 se muestra la obtención de una incertidumbre expandida relativa de 4 %, equivalente a una incertidumbre expandida absoluta de ± 64 mg/L para el nivel evaluado.

La incertidumbre expandida obtenida para los diferentes niveles de concentración fue inferior al 20 %, valor máximo recomendado para métodos ambientales según Gavi (2021) y lineamientos generales de EURACHEM (2014).

Jácome (2014) reportó incertidumbres cercanas al 9 % en rangos similares, resultado comparable con los obtenidos en este estudio para concentraciones medias.

Las diferencias pueden explicarse por la inclusión de componentes adicionales en el presupuesto de incertidumbre, como contribuciones de la curva de calibración y variabilidad intermedia. Desde el punto de vista metrológico, la magnitud de incertidumbre estimada es compatible con el uso previsto del método en monitoreo ambiental.

4.5 Robustez

La robustez del método para la determinación de DQO fue evaluada mediante un diseño factorial completo 2^3 , considerando variaciones deliberadas en la temperatura de digestión (A), el equipo de digestión (B) y el tiempo de digestión (C), en el nivel de concentración evaluado. Los niveles experimentales considerados se presentan en la tabla 4.65.

Tabla 4.65 Diseño experimental y niveles

Factor	-1	+1
A: Temperatura (°C)	148	150
B: Equipo	Hach	Merck
C: Tiempo (min)	105	135

El análisis de varianza factorial (tabla 4.66) indica que el factor B (equipo de digestión) presenta un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta de DQO ($p < 0,05$), mientras que los factores A (temperatura) y C (tiempo), así como todas las interacciones dobles y la interacción triple $A \times B \times C$, no resultaron significativas ($p > 0,05$).

Tabla 4.66 ANOVA factorial

Fuente	F calculada	p - value	Decisión
A	0,3246	0,5844	Cumple
B	9,4675	0,01518	No Cumple
C	1,5714	0,2453	Cumple
AB	0,3246	0,5844	Cumple
AC	0,6363	0,4480	Cumple
BC	1,0519	0,3350	Cumple
ABC	2,9220	0,1257	Cumple

El resumen de efectos principales (tabla 4.67) confirma que el cambio de equipo de digestión genera el mayor efecto estimado sobre la DQO ($\beta = -1,6875$), evidenciando una disminución sistemática de la respuesta al cambiar de equipo. En contraste, los efectos asociados a la temperatura ($\beta = +0,3125$) y al tiempo de digestión ($\beta = +0,6875$) fueron de menor magnitud y no significativos.

Tabla 4.67 Resumen de efectos principales del estudio de robustez (2^3)

Factor	Efecto estimado (β)	Significativo
A – temperatura	+0,3125	No
B – Equipo	-1,6875	Sí
C - Tiempo	+0,6875	No

El análisis factorial 2^3 mostró que la temperatura y el tiempo de digestión no tuvieron efectos estadísticamente significativos sobre la respuesta de DQO ($p > 0.05$), lo que indica estabilidad del método frente a pequeñas variaciones en estos factores. Este comportamiento es coherente con lo establecido en American Public Health Association (APHA) (2023) y con los criterios de robustez descritos por EURACHEM (2014).

En contraste, el equipo de digestión presentó un efecto significativo ($p < 0.05$), con un efecto estimado de $\beta = -1.6875$ mg/L. Aunque la diferencia es estadísticamente detectable, su magnitud es pequeña respecto al nivel de concentración evaluado, por lo que su impacto práctico resulta limitado dentro del rango operativo del método.

En consecuencia, el método puede considerarse robusto frente a variaciones en temperatura y tiempo, pero sensible al cambio de equipo, recomendándose mantener el mismo digestor durante la calibración y análisis rutinario para asegurar consistencia metrológica

4.6 Declaración del método verificado

Luego de los ensayos y pruebas estadísticas realizadas se da por declarado el método como verificado como se muestra en el Anexo B

4.7 Aplicación de los resultados de la verificación en el monitoreo del Afluyente de una planta de tratamiento.

Durante el periodo de monitoreo del afluyente de la planta de tratamiento, la calidad analítica del método de determinación de DQO fue verificada de forma continua mediante el análisis de blancos, estándares de control y muestras en duplicado.

Los resultados de blancos analíticos se mantuvieron consistentemente por debajo del límite de detección del método ($< \text{LOD}$), lo que confirma la ausencia de contaminación y sesgos sistemáticos asociados a reactivos o al procedimiento analítico (Tabla 4.68).

Tabla 4.68 Resultados de blancos analíticos

Parámetro	Resultado
Blanco analítico	$< \text{LOD}$

El desempeño del método fue adicionalmente evaluado mediante estándares de control de calidad a concentraciones nominales de 200, 500 y 800 mg/L de DQO. Los resultados obtenidos presentaron recuperaciones comprendidas entre 101 % y 103 %, cumpliendo los criterios de aceptación establecidos para métodos colorimétricos de reflujo cerrado (Tabla 4.69). Estos valores se encuentran dentro de los rangos recomendados por Standard Methods 5220D y la literatura internacional para la verificación de exactitud en análisis de aguas residuales, confirmando la validez del método en el intervalo operativo de interés.

Tabla 4.69 Control de calidad con estándares de DQO

Nivel nominal (mg/L)	Resultado medio (mg/L)	Recuperación (%)	Criterio
200	206	103	Cumple
500	507	101	Cumple
800	807	101	Cumple

Los resultados del monitoreo del afluyente, realizados en duplicado para cada evento de muestreo, se presentan en la Tabla 4.70. Los valores de DQO obtenidos oscilaron entre 326 y 550 mg/L, reflejando la variabilidad típica de un afluyente de aguas residuales domésticas. En todos los casos, el porcentaje de diferencia relativa entre duplicados (RPD) fue inferior al límite de repetibilidad establecido durante la verificación del método (7%), lo que confirma que la precisión bajo

condiciones rutinarias de operación es consistente con la precisión experimental obtenida en laboratorio.

El cumplimiento sistemático del criterio de RPD demuestra que la repetibilidad del método es adecuada para el control operativo del proceso, en concordancia con los lineamientos de ISO 5725-2 y con las recomendaciones para el control interno de calidad en laboratorios de ensayo acreditados.

Tabla 4.70 Resultados de DQO del punto de monitoreo

Fecha	Muestra	DQO Rep. 1 (mg/L)	DQO Rep. 2 (mg/L)	Promedio (mg/L)	RPD (%)	Criterio
6/11/2025	ENT-AF-05112025	378	367	372	2,95	Cumple
7/11/2025	ENT-AF-06112025	551	548	550	0,5	Cumple
11/11/2025	ENT-AF-10112025	395	383	389	3,1	Cumple
14/11/2025	ENT-AF-13112025	344	349	347	1,4	Cumple
20/11/2025	ENT-AF-18112025	328	331	330	0,91	Cumple
20/11/2025	ENT-AF-19112025	429	433	431	0,92	Cumple
27/11/2025	ENT-AF-25112025	329	322	326	2,15	Cumple
27/11/2025	ENT-AF-26112025	406	400	403	1,5	Cumple

Nota: El RPD se compara contra el límite de repetibilidad que se obtuvo en la verificación

Con base en los resultados del periodo de monitoreo, se calculó la DQO promedio del afluente, obteniéndose un valor de 393 mg/L. Para la expresión del resultado reportable, se adoptó una incertidumbre expandida relativa del 9%, Los valores obtenidos en el monitoreo del afluente se encuentran dentro del rango típico reportado para aguas residuales domésticas (Metcalf & Eddy et al., 2003).

De este modo, el resultado reportado del afluente se expresa como:

$$DQO = 393 \pm 35 \text{ mg/L (k = 2, aproximadamente 95 \% de confianza)}$$

Este enfoque garantiza que el resultado informado incorpora de manera explícita las principales fuentes de variabilidad asociadas al método, incluyendo precisión intermedia, sesgo y contribuciones instrumentales, proporcionando un valor técnicamente defendible para la toma de decisiones operativas y regulatorias.

Tabla 4.71 Resultado reportado de DQO en afluente

Parámetro	Valor
DQO promedio del período de monitoreo, mg/L	393
Incertidumbre expandida, $\pm U$, %	9
Resultado reportado, mg/L	393 ± 35

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Se establecieron condiciones operativas óptimas para la determinación de la DQO mediante el método colorimétrico de reflujó cerrado conforme a ASTM D1252-06 y Standard Methods 5220D, definiéndose como adecuadas la digestión a $150 \pm 2^\circ\text{C}$, 2 h de digestión, el uso del termo reactor Hach DRB 200 Merck, y el espectrómetro HACH UV-VIS DR 6000.
2. El método demostró adecuada selectividad, sensibilidad analítica y linealidad dentro del intervalo de trabajo evaluado, con blancos analíticos consistentemente inferiores al LOD, y una respuesta lineal satisfactoria para estándares de control entre 200, 500 y 800 mg/L, cumpliendo los requisitos establecidos por el SAE para métodos de ensayo acreditables.
3. La veracidad y precisión del método fueron confirmadas mediante estudios de recuperación y repetibilidad, obteniéndose recuperaciones comprendidas entre 101–103 % y valores de RPD inferiores al límite de repetibilidad, en concordancia con los criterios de aceptación establecidos en la guía EURACHEM, evidenciando un desempeño analítico confiable.
4. La incertidumbre de medición asociada a la determinación de DQO fue estimada conforme a la ISO/IEC Guide 98-3 (GUM), identificándose como principales contribuyentes la precisión intermedia y la curva de calibración; se estableció una incertidumbre expandida relativa conservadora del 9 %, garantizando la trazabilidad y confiabilidad metrológica de los resultados reportados.
5. El estudio de robustez basado en un diseño factorial 2^3 evidenció que el método es robusto frente a pequeñas variaciones en temperatura de digestión, tiempo de reacción y tipo de equipo, identificándose únicamente el factor equipo como estadísticamente significativo, sin comprometer la validez del método dentro de las condiciones normales de operación.
6. Los indicadores de desempeño aplicados durante el monitoreo del afluente de la planta de tratamiento confirmaron la aplicabilidad del método verificado

en condiciones reales, permitiendo reportar resultados de DQO con control de calidad continuo, cumplimiento de criterios de repetibilidad y un resultado final expresado como 393 ± 35 mg/L, adecuado para la toma de decisiones operativas.

5.2 Recomendaciones

1. Optimización de la curva de calibración

Se recomienda evaluar el ajuste y la distribución de puntos de la curva de calibración, especialmente en los niveles bajos e intermedios, mediante el aumento del número de réplicas o puntos de calibración, con el fin de reducir la incertidumbre asociada a la calibración, identificada como una de las principales fuentes de contribución a la incertidumbre total del método.

2. Evaluación específica del efecto de cloruros

Se recomienda realizar estudios adicionales del efecto de los cloruros para concentraciones de DQO comprendidas entre 100 y 500 mg/L, empleando diferentes niveles de cloruros, a fin de cuantificar su influencia sobre la exactitud del método en matrices reales de aguas residuales domésticas.

3. Optimización del uso del inhibidor de cloruros

Revisar y optimizar la concentración de sulfato de mercurio u otros agentes inhibidores permitidos por la normativa, particularmente en muestras con alto contenido de cloruros, con el fin de minimizar interferencias y mejorar la veracidad de los resultados, conforme a lo indicado en ASTM D1252 y Standard Methods 5220D.

4. Fortalecimiento del control de calidad interno

Mantener el uso sistemático de estándares de control de calidad intermedios (por ejemplo, 200, 500 y 800 mg/L), así como el seguimiento del RPD y cartas de control, para asegurar la detección temprana de desviaciones y garantizar la confiabilidad de los resultados reportados.

5. Extensión del método a otras matrices

Como trabajo futuro, se recomienda evaluar la aplicabilidad del método verificado a otras matrices de interés, tales como aguas industriales o efluentes con alta carga salina, ajustando el diseño experimental y la estimación de incertidumbre según la complejidad de la matriz.

6. Incluir la incertidumbre de Muestreo

En el estudio presente no se consideró la incertidumbre debida al muestreo solo la analítica, y para tener una descripción completa del rendimiento del método sería beneficioso si se realiza la actividad de muestreo, realizar el diseño experimental y agregar la incertidumbre asociada al muestreo.

6. Referencias

- American Public Health Association (APHA). (2023). SM 5220 D. Closed Reflux, Colorimetric Method. En *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (24a ed.). APHA Press.
- ASTM International. (2020). *ASTM D1252-06: Standard test methods for chemical oxygen demand (dichromate oxygen demand) of water*.
- Centro Español de Metrología. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)* (3a ed.). CEM.
- EURACHEM. (2014). *The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics* (Cantwell, Ed.; 1a ed.). EURACHEM. <https://www.eurachem.org/>
- EURACHEM/CITAC. (2012). *Quantifying uncertainty in analytical measurement* (3a ed.). CEM. <https://www.eurachem.org>
- Gavi, J. (2021). *Validación de métodos de ensayo para determinar DBO5, DQO, oxígeno disuelto, sulfatos, plomo y cadmio en agua y suelo*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Gutiérrez Pulido, H., & de la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda). www.FreeLibros.org
- Horwitz, W., & Albert, R. (2006). The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *AOAC INTERNATIONAL*, 89(4), 1095–1109.
- International Organization for Standardization. (2019). ISO 5725-2:2019 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. En *ISO* (2a ed.). ISO. <https://www.iso.org/standard/69419.html>
- International Organization for Standardization. (2021). *ISO 8466-1:2021 Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods - Part 1: Linear calibration function* (2a ed.). ISP. <https://www.iso.org/standard/77139.html>
- Jácome, J. (2014). *VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (RANGO BAJO, RANGO MEDIO, RANGO ALTO), SÓLIDOS TOTALES*

DISUELTOS Y SÓLIDOS TOTALES SUSPENDIDOS EN MATRICES DE AGUA CLARA Y RESIDUAL EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y CONTROL AMBIENTAL "CICAM". UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.

- Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J., & Li, W. (2005). *Applied linear statistical models* (5a ed.). McGraw-Hill Irwin.
- Metcalf & Eddy, Inc., Tchobanogloues, G., Burton, F. L., & Stensel, H. D. (2003). *Ingeniería de aguas residuales: Tratamiento, vertido y reutilización* (3a ed., Vol. 1). McGraw Hill.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (6a ed.). Pearson Education.
- Montgomery, D. C., Peck, E. A., & Vining, G. G. (2006). *Introducción al Análisis de Regresión* (CECSA, Ed.; 3a ed.). CECSA.
- Paucar, G. (2022). *RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA CARRERA QUÍMICA AMBIENTAL. RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA CARRERA QUÍMICA AMBIENTAL.*
- R. R. Jairo. (2010). *Tratamiento de Aguas Residuales Teoría y Principios de Diseño* (Escuela Colombiana de Ingeniería, Ed.; 3a ed.).
- Ramalho, R. S. (1983). *Tratamiento de Aguas Residuales*. Editorial Reverté.
- Rodríguez, Y., & Zapata, A. (2023). *Validación y Estimación de la Incertidumbre de una Metodología Analítica para Determinar la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en Aguas Residuales por el Método Colorimétrico de Reflujo Cerrado, Laboratorio Ambiental PRONIC de Nicaragua, Febrero – Noviembre 2022. RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA CARRERA QUÍMICA AMBIENTAL.*
- Servicio de Acreditación Ecuatoriano. (2021). *CR-GA01-R07 Criterios-Generales-Acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según NTE-INEN ISO/IEC 17025-2018*. www.acreditacion.gob.ec

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2016). Ultraviolet–Visible Absorption Spectroscopy. En *Principios de análisis instrumental* (7a ed.). Cengage Learning.

Zumba, J. (2018). *Validación de métodos de ensayo para DQO, tensoactivos; y aceites y grasas en aguas, en el Laboratorio Ambiental y Consultoría Environovalab Cía. Ltda.* UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA.

Apéndices y anexos

Anexo A. Procedimiento Estandarizado para la determinación del ensayo DQO

1. Preámbulo

1.1. Actualización

#	Sección	Índole de la corrección	Fecha	Autorización

1.2. Revisión

Fecha de revisión	Resultado de la revisión	Fecha de la próxima revisión	Autorización
12/2/2026	Conforme	12/8/2026	Jefatura de laboratorio

2. Título

Determinación de DQO en aguas residuales domesticas utilizando el método colorimétrico por digestión de reflujo cerrado

3. Precauciones

El procedimiento involucra reactivos altamente corrosivos y tóxicos (ácido sulfúrico concentrado, dicromato de potasio y sulfato de mercurio). Se deberán cumplir las siguientes medidas:

- Uso obligatorio de bata, guantes resistentes a ácidos, gafas de seguridad y protección facial.
- Manipulación de reactivos bajo campana extractora.
- Precaución durante la digestión térmica por generación de presión en viales sellados.
- Gestión de residuos que contienen cromo y mercurio conforme a la normativa ambiental vigente.

4. Alcance

Este procedimiento describe la determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en muestras de aguas residuales mediante el método colorimétrico de reflujo cerrado, basado en la oxidación de la materia orgánica con dicromato de potasio en medio ácido.

El método es aplicable a muestras de aguas residuales domésticas, dentro del intervalo de trabajo operativo de 100 a 1500 mg/L definido durante la verificación del método, conforme a lo establecido en Standard Methods 5220 D y ASTM D1252 .

5. Referencias

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Método 5220 D: Closed Reflux, Colorimetric Method.
- ASTM D1252-06 (re aprobada 2020): Standard Test Methods for Chemical Oxygen Demand (Dichromate Oxygen Demand) of Water.

6. Definiciones

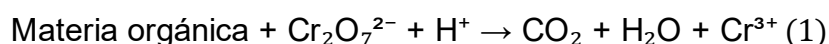
- **DQO (Demanda Química de Oxígeno):** Cantidad de oxígeno, expresada en mg/L, consumida durante la oxidación química de la materia orgánica e inorgánica oxidable presente en una muestra de agua.
- **mg/L:** Miligramos por litro.
- **H₂SO₄:** Ácido sulfúrico.
- **HgSO₄:** Sulfato de mercurio.
- **KHC₈H₄O₄ (KHP):** Ftalato ácido de potasio (patrón primario).
- **EPP:** Equipos de Protección Personal.
- **LOD:** Límite de detección (13 mg/L).
- **LOQ:** Límite de cuantificación (43 mg/L).
- **%RPD:** Diferencia porcentual relativa entre duplicados.

7. Principio

La muestra es oxidada en medio fuertemente ácido con dicromato de potasio en presencia de sulfato de plata como catalizador. Durante la digestión térmica (150 °C, 2 h), el Cr^{+6} se reduce a Cr^{+3} . La concentración de Cr^{3+} formada (o dicromato remanente) se determina fotométricamente alrededor de 600 nm. La concentración de DQO se obtiene mediante comparación con una curva de calibración construida con ftalato ácido de potasio (KHP).

8. Reacciones

Oxidación general:



Relación estequiométrica: 1 mol K₂Cr₂O₇ \equiv 1,5 mol O₂

Nota: Los cloruros se enmascaran mediante HgSO₄ para evitar interferencias.

9. Reactivos y materiales

- Solución de digestión de DQO rango alto: Para el desarrollo de los análisis, se está utilizando soluciones de digestión para DQO preparadas comercialmente de la marca HACH.
- Ftalato ácido de potasio (KHP) patrón primario: Aplastar ligeramente y luego secar el KHP hasta peso constante a 110°C. Disolver 425 mg en agua destilada y diluir hasta 1,000 mL. El KHP tiene una DQO teórica de 1.176 mg O₂/mg y esta solución tiene una DQO teórica de 500 µg O₂/mL. Esta solución es estable cuando se refrigera, pero no indefinidamente. Estar atento al desarrollo de un crecimiento biológico visible. Si es posible, preparar y transferir la solución en condiciones estériles.
- Agua desionizada.
- Ácido sulfúrico concentrado (98%) para preservación.
- Combicheck 20 (material de referencia).

Materiales

- Puntas para micropipeta de 5000 uL
- Gradilla

10. Aparatos

- Termo reactor Hach DRB 200
- Espectrofotómetro Hach DR 6000
- Micropipetas automáticas de 5000 uL

11. Toma de muestra

- Frascos plásticos o vidrio (≥ 100 mL).
- Preservación: H_2SO_4 hasta $\text{pH} < 2$.
- Refrigeración a 4 ± 2 °C.
- Tiempo máximo conservación: 28 días.

12. Procedimiento

A viales individuales con solución de digestión para rango alto, transferir 2 mL de agua de grado reactivo para el cero, 2 mL de estándar combicheck y 2 mL de la(s) muestra(s) sin filtrar o una dilución(es) de la(s) misma(s). Digestar los viales en el termoreactor a una temperatura 150°C por 2 horas.

Enfriar la muestra lentamente a temperatura ambiente para evitar la formación de precipitados. Una vez que las muestras se hayan enfriado, ventilar si es necesario para aliviar cualquier presión generada durante la digestión. Mezclar el contenido de los recipientes de reacción para combinar el agua condensada y desalojar la materia insoluble. Dejar que la materia suspendida se asiente y asegurarse que el camino óptico para la medición esté despejado. Encerar el equipo, medir el estándar y cada muestra en el programa de DQO HR

13. Cálculos

Con la medida de la absorbancia de cada muestra, se calcula el valor de la concentración de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$DQO \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{Abs - int.}{pend.} (2)$$

Donde:

Abs: absorbancia medida de la muestra/estándar,

int. : intercepto de la curva,

pend. : pendiente de la curva.

14. Precisión

Repetibilidad

Por cada lote de muestras se realizará un duplicado de cualquier muestra y se calculará el %RPD, se lo calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%RPD = \frac{(\text{resultado muestra} - \text{resultado duplicado})}{(\text{resultado muestra} + \text{resultado duplicado})/2} \times 100\%$$

El valor obtenido de %RPD deberá ser menor al límite de repetibilidad (%) de acuerdo con el criterio de aceptación adoptado especificado a continuación en la siguiente tabla correspondiente al rango evaluado experimentalmente (300–1500 mg/L), donde el método mostró un comportamiento estable.

Rango de DQO (mg/L)	Límite de Repetibilidad (%)
100 - 1500 mg/L	7,5

Cuando no cumplan las especificaciones anteriores se repetirá el análisis con una nueva alícuota, si los resultados no son satisfactorios, se comunicará al JLAB, para las medidas pertinentes.

Exactitud

Por cada lote de muestra se leerá un estándar primario de Phthalato Hidrogenado de potasio, por cada lote realizado, en concentraciones de 300 mg/L , o con un material de referencia marca Merck - combicheck de valores 750 ± 75 dos veces por mes.

Se aceptarán resultados que estén dentro de las 2 DS y solo dos valores dentro de las 3 DS por mes, no se aceptará cualquier punto fuera del límite de control, si los estándares no cumplen con los rangos permitidos, se preparará un nuevo estándar, si los resultados no son satisfactorios, se comunicará al jefe de laboratorio, para las medidas pertinentes.

Incertidumbre

La siguiente tabla presenta el valor de incertidumbre relativa expandida obtenido en el rango de verificación.

Nivel de DQO (mg/L)	$U_{rel}(\%)$
100 - 1500 mg/L	10,5

Anexo B. Declaración del método verificado

METODO ANALITICO						
CUANTITATIVO <input checked="" type="checkbox"/> X CUALITATIVO <input type="checkbox"/> DE IDENTIFICACIÓN <input type="checkbox"/>			Analito: DQO Unidades: mg/L Matriz: Aguas residuales			
FUNCIÓN DE RESPUESTA						
m = 0,000460891	Sm = 1,77e-6		a = 0,002802	Sa = 0,001273		
PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Nivel (mg/L)	Repetibilidad		Precisión Intermedia		Veracid ad	U expandida
	Sr	% RSD _{ir}	Si	% RSD _{ii}	Sesgo relativo (%)	U %(k= 2)
100	0,022	2,61	0,029	3,37	0,7	9
300	0,020	2,17	0,024	2,55		6
700	0,018	1,83	0,019	1,95		5
1500	0,015	1,54	0,017	1,71		4
LÍMITE DE DETECCIÓN (L,D,)				13 mg/L		
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (L,C,)				43 mg/L		
INTERVALO DE TRABAJO				43 a 1500 mg/L		
LÍMITE DE REPETIBILIDAD, %				7		
CONTROL INTERNO				Construir una carta de control con un valor medio de 300 mg/L ± 10%		
INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO, U (%)				9		

Declaración de Aptitud del Método Verificado

Método de Análisis: Demanda química de oxígeno

CONFORMIDAD: Conforme, con los objetivos planteados,

Declarándose: VÁLIDO para el uso previsto,

Fecha: 15-01-2026

Elaborado por: Ing. Anthony Freire Castro

Anexo C. Material de Referencia Certificado



www.sigmaaldrich.com

Document 20550009 Version 2.0

Certificate of Analysis - Certified Reference Material

Demand-WP

Product no.: QC1130-20ML
Lot no.: LRAD9575
Expiry Date: July 2027
Manufacturing Date: July 2024
Storage: ROOM TEMPERATURE (2 °C to 30 °C)
Solvent/Matrix: DI WATER
Certificate version: LRAD9575.01 (Note: Certificates may be updated due to the availability of new data. Check our website at: www.sigma-aldrich.com for the most current version.)

Certified Values:

Analyte	Units	Certified Value
Biochemical oxygen demand	mg/L	88.1 ± 3.3
Carbonaceous BOD (CBOD)	mg/L	75.8 ± 3.8
Chemical oxygen demand (COD)	mg/L	142 ± 4
Total organic carbon (TOC)	mg/L	56.1 ± 0.9

Informational Values:

Analyte	Units	Suggested Acceptance Windows	Standard Deviation
Biochemical oxygen demand	mg/L	46.9 to 129	13.7
Carbonaceous BOD (CBOD)	mg/L	34.0 to 118	13.9
Chemical oxygen demand (COD)	mg/L	121 to 163	6.91
Total organic carbon (TOC)	mg/L	46.9 to 65.3	3.05

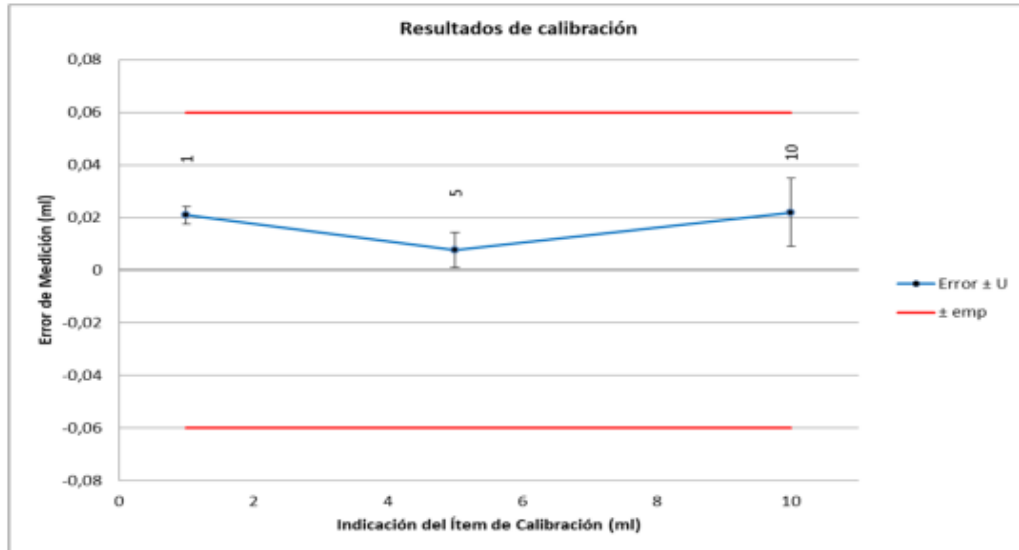
Additional Information: DESCRIPTION
 The solvent for this sample is water.
 This sample is packaged as a 20 mL concentrate.
 The sample has been autoclaved for preservation.

Anexo D. Certificados de Calibración Micropipeta

Resultados de la Calibración

Calibration Results

Valor de Prueba <i>Test Value</i>	Volumen Medido <i>Measured Volume</i>	Error de Medición (e) <i>Measurement Error (e)</i>	Incertidumbre (U) <i>Uncertainty (U)</i>	Factor de Cobertura (k) <i>Coverage factor</i>	Temperatura ^(a) <i>Temperature</i>	E.M.P. <i>M.P.E.</i>	Cumplimiento <i>Compliance</i>
ml	ml	ml	ml		°C	ml	
10	10,022	0,022	0,013	2,00	20,9	0,06	Cumple
5	5,0077	0,0077	0,0067	2,00	20,9	0,06	Cumple
1	1,0209	0,0209	0,0033	2,00	20,9	0,06	Cumple



Notas

Notes

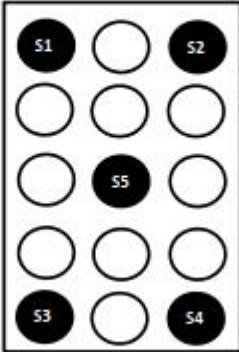

- Temperatura de Referencia: 20 °C
- El error de medición (mejor estimación del valor verdadero) se muestran con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).
- Se ha realizado diez mediciones por cada valor de prueba.

- Reference Temperature: 20 °C

- The measurement error (best estimate of the true value) are shown to the same number of digits as the reported uncertainty (see GUM 7.2.6).

- Ten measurements have been performed for each test value.

Anexo E. Certificado de Calibración Termo reactor

Resultados del Ensayo <i>Test Results</i>																																																																
<p style="text-align: center;">Posición de los Sensores de Referencia <i>Reference Sensors Position</i></p> <div style="text-align: center;">  </div>	<p style="text-align: center;">Fotografía de los Sensores de Referencia <i>Reference Sensors Photography</i></p> <div style="text-align: center;">  </div>																																																															
Resultados de Ensayo <i>Test Results</i>																																																																
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;"></th> <th style="width: 10%;">Valor de Prueba <i>Test Value</i></th> <th style="width: 15%;">Valor programado en el controlador del equipo bajo prueba <i>Value programmed in the controller of the equipment under test</i></th> <th style="width: 15%;">Temperatura media en el indicador del equipo bajo prueba <i>Mean temperature of the indicator of the equipment under test</i></th> <th style="width: 15%;">Temperatura media del sensor de referencia <i>Mean temperature of the reference sensor</i></th> <th style="width: 10%;">Corrección de la indicación <i>Indication Correction</i></th> <th style="width: 10%;">Inestabilidad Temporal <i>Temporal Instability</i></th> <th style="width: 10%;">Incertidumbre Expandida de Medición (U) <i>Expanded Measurement Uncertainty (U)</i></th> <th style="width: 15%;">Cumplimiento <i>Compliance</i></th> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">°C</td> <td style="text-align: center;">°C</td> <td style="text-align: center;">°C</td> <td style="text-align: center;">°C</td> <td style="text-align: center;">°C</td> <td style="text-align: center;">°C</td> <td style="text-align: center;">°C</td> <td></td> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Locación 1 <i>Location 1</i></td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150,00</td> <td style="text-align: center;">150,45</td> <td style="text-align: center;">0,45</td> <td style="text-align: center;">0,26</td> <td style="text-align: center;">0,99</td> <td style="text-align: center;">Cumple</td> </tr> <tr> <td>Locación 2 <i>Location 2</i></td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150,0</td> <td style="text-align: center;">150,5</td> <td style="text-align: center;">0,5</td> <td style="text-align: center;">0,3</td> <td style="text-align: center;">1,0</td> <td style="text-align: center;">Cumple</td> </tr> <tr> <td>Locación 3 <i>Location 3</i></td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150,0</td> <td style="text-align: center;">150,7</td> <td style="text-align: center;">0,7</td> <td style="text-align: center;">0,4</td> <td style="text-align: center;">1,0</td> <td style="text-align: center;">Cumple</td> </tr> <tr> <td>Locación 4 <i>Location 4</i></td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150,00</td> <td style="text-align: center;">150,43</td> <td style="text-align: center;">0,43</td> <td style="text-align: center;">0,18</td> <td style="text-align: center;">0,96</td> <td style="text-align: center;">Cumple</td> </tr> <tr> <td>Locación 5 <i>Location 5</i></td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150</td> <td style="text-align: center;">150,0</td> <td style="text-align: center;">150,5</td> <td style="text-align: center;">0,5</td> <td style="text-align: center;">0,3</td> <td style="text-align: center;">1,0</td> <td style="text-align: center;">Cumple</td> </tr> </tbody> </table>		Valor de Prueba <i>Test Value</i>	Valor programado en el controlador del equipo bajo prueba <i>Value programmed in the controller of the equipment under test</i>	Temperatura media en el indicador del equipo bajo prueba <i>Mean temperature of the indicator of the equipment under test</i>	Temperatura media del sensor de referencia <i>Mean temperature of the reference sensor</i>	Corrección de la indicación <i>Indication Correction</i>	Inestabilidad Temporal <i>Temporal Instability</i>	Incertidumbre Expandida de Medición (U) <i>Expanded Measurement Uncertainty (U)</i>	Cumplimiento <i>Compliance</i>		°C	°C	°C	°C	°C	°C	°C		Locación 1 <i>Location 1</i>	150	150	150,00	150,45	0,45	0,26	0,99	Cumple	Locación 2 <i>Location 2</i>	150	150	150,0	150,5	0,5	0,3	1,0	Cumple	Locación 3 <i>Location 3</i>	150	150	150,0	150,7	0,7	0,4	1,0	Cumple	Locación 4 <i>Location 4</i>	150	150	150,00	150,43	0,43	0,18	0,96	Cumple	Locación 5 <i>Location 5</i>	150	150	150,0	150,5	0,5	0,3	1,0	Cumple
	Valor de Prueba <i>Test Value</i>	Valor programado en el controlador del equipo bajo prueba <i>Value programmed in the controller of the equipment under test</i>	Temperatura media en el indicador del equipo bajo prueba <i>Mean temperature of the indicator of the equipment under test</i>	Temperatura media del sensor de referencia <i>Mean temperature of the reference sensor</i>	Corrección de la indicación <i>Indication Correction</i>	Inestabilidad Temporal <i>Temporal Instability</i>	Incertidumbre Expandida de Medición (U) <i>Expanded Measurement Uncertainty (U)</i>	Cumplimiento <i>Compliance</i>																																																								
	°C	°C	°C	°C	°C	°C	°C																																																									
Locación 1 <i>Location 1</i>	150	150	150,00	150,45	0,45	0,26	0,99	Cumple																																																								
Locación 2 <i>Location 2</i>	150	150	150,0	150,5	0,5	0,3	1,0	Cumple																																																								
Locación 3 <i>Location 3</i>	150	150	150,0	150,7	0,7	0,4	1,0	Cumple																																																								
Locación 4 <i>Location 4</i>	150	150	150,00	150,43	0,43	0,18	0,96	Cumple																																																								
Locación 5 <i>Location 5</i>	150	150	150,0	150,5	0,5	0,3	1,0	Cumple																																																								
Tolerancia (proporcionada por el cliente): <i>Tolerance (provided by the customer)</i>							± 2 °C																																																									

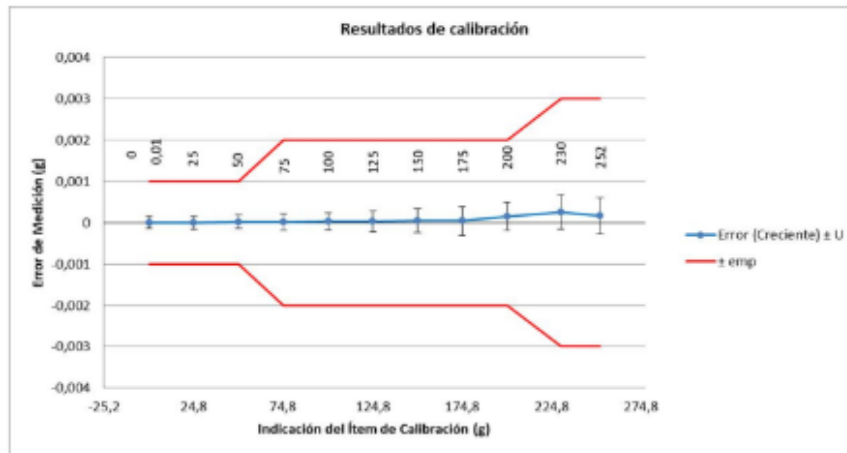
Anexo F. Certificado d calibración balanza analítica

Ensayo de Errores de Indicación

Test for errors of indication

Valor Patrón Standard Value	Creciente Increasing	
	Indicación ítem Item Reading	Error de Medición (e) Measurement Error
g	g	g
0,00000	0,0000	0,00000
0,01000	0,0100	0,00000
25,00000	25,0000	0,00000
49,99999	50,0000	0,00001
74,99999	75,0000	0,00001
99,99997	100,0000	0,00003
124,99997	125,0000	0,00003
149,99996	150,0000	0,00005
174,99996	175,0000	0,00004
199,99995	200,0001	0,00015
229,99996	230,0002	0,00025
252,00004	252,0002	0,00016

Incertidumbre (U) Uncertainty	Factor de Cobertura Coverage factor	E.M.P. M.P.E.	Cumplimiento Compliance
g	k	g	
—	—	—	—
0,00014	2,23	± 0,0010	Cumple
0,00015	2,12	± 0,0010	Cumple
0,00016	2,09	± 0,0010	Cumple
0,00021	2,03	± 0,0020	Cumple
0,00021	2,03	± 0,0020	Cumple
0,00026	2,01	± 0,0020	Cumple
0,00029	2,01	± 0,0020	Cumple
0,00035	2,00	± 0,0020	Cumple
0,00034	2,00	± 0,0020	Cumple
0,00042	2,00	± 0,0030	Cumple
0,00044	2,00	± 0,0030	Cumple



Errores Máximos Permitidos Maximum Permissible Errors	
Para cargas de prueba, m: For test loads, m:	emp mpe
g	g
m ≤ 50	0,001
50 < m ≤ 200	0,002
m > 200	0,003

Anexo G. Certificado de análisis del Cloruro de Sodio

LOBA
Chemie
LABORATORY REAGENTS
& FINE CHEMICALS

ISO 9001-2015 CERTIFIED

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name : SODIUM CHLORIDE 99.5% AR/ACS	
Lot No. : B365992105	Analyzed On : 14-May-2021
Mol. Formula : NaCl	Mol. Weight : 58.44
Code No. : 05820	CAS No. : 7647-14-5
Mfg. Date : May-2021	Exp. Date : Apr-2026
HAZ. / P.G. : -	UN No. : -

Sr.	Tests	Specifications	Results
1	Appearance	White crystalline powder	White crystalline powder
2	Assay (after ignition)	99.5-100.5%	99.98%
3	Identity	Passes test	Passes test
4	Appearance of solution	Passes test	Passes test
5	Acidity or alkalinity	Passes test	Passes test
6	pH (5 % solution)	5.0 - 8.0	7.15
7	Insoluble matter	Max 0.005%	<0.005%
8	Bromide (Br)	Max 0.005%	0.005%
9	Iodide (I)	Max 0.001%	<0.001%
10	Ferrocyanide [(Fe(CN) ₆] ⁴⁻	Max 0.0001%	<0.0001%
11	Chlorate and nitrate (NO ₃)	Max 0.003%	0.003%
12	Nitrite (NO ₂)	Passes test	Passes test
13	Phosphate (PO ₄)	Max 0.0005%	0.0004%
14	Sulphate (SO ₄)	Max 0.001%	0.001%
15	Total nitrogen (N)	Max 0.0005%	<0.0005%
16	Heavy metals (by ICP-OES)	Max 0.0005%	0.000052%
17	Arsenic (As)	Max 0.00004%	<0.00004%
18	Barium (Ba)	Max 0.001%(passes test)	0.00014%
19	Calcium (Ca)	Max 0.002%	0.00049%
20	Copper (Cu)	Max 0.0002%	0.00019%
21	Iron (Fe)	Max 0.0002%	0.000064%
22	Magnesium (Mg)	Max 0.001%	0.00014%
23	Magnesium and alkali earth metals	Max 0.01%	0.01%
24	Potassium (K)	Max 0.005%	0.005%

Anexo H. Certificado de analisis del Ftalato acido de potasio



Certificate of Analysis

1 Reagent Lane

Fair Lawn, NJ 07410
 201.796.7100 tel
 201.796.1329 fax

Thermo Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System
 Standard ISO9001:2015 by SAI Global Certificate Number CERT – 0120632

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Thermo Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Products are for research use or further manufacturing. Not for direct administration to humans or animals. It is the responsibility of the final formulator and end user to determine suitability based upon the intended use of the end product. Products are tested to meet the analytical requirements of the noted grade. The following information is the actual analytical results obtained.

Catalog Number	P243	Quality Test / Release Date	11/24/2021
Lot Number	212998		
Description	POTASSIUM HYDROGEN PHTHALATE, CERTIFIED, A.C.S.		
Country of Origin	Spain	Suggested Retest Date	May/2026
Chemical Origin	Organic - non animal		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

N/A			
Result Name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	WHITE POWDER OR CRYSTALS
ASSAY POTASSIUM HYDROGEN PHTHALATE	%	Inclusive Between 99.95 - 100.05	100.03
CHLORINE COMPOUNDS	%	<= 0.003	<0.003
HEAVY METALS BY ICP-OES	ppm	<= 5	<5
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.005	<0.005
IRON (Fe)	ppm	<= 5	<5
PH OF 0.05M SOLUTION		Inclusive Between 4.00 - 4.02	4.00
SODIUM (Na)	%	<= 0.005	0.002
SULFUR COMPOUNDS	%	<= 0.002	<0.0020

Julian Burton

Julian Burton - Quality Control Manager – Fair Lawn