

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO
ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS DE
DETERMINACIÓN DE CROMO HEXAVALENTE EN
AGUAS NATURALES Y RESIDUALES**

POR: KARINA HUAYHUA LLUSCO

TUTOR: PhD. RIGOBERTO CHOQUE

CO-TUTOR: PhD. MAURICIO ORMACHEA

LA PAZ – BOLIVIA

Diciembre, 2019

El presente trabajo es dedicado con mucho cariño y amor a mis queridos hermanitos: Juanjo y Aleyda. Espero pueda servirles en un futuro.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Primitivo y Francisca quienes siempre hicieron el esfuerzo para darme todo lo que ellos no pudieron tener, hermanos, quienes siempre me alentaron a salir adelante y estuvieron presentes en cada momento siempre pendientes de mi bienestar. Muchas gracias por llenarme de tanto amor.

Al Laboratorio de Química Ambiental de la CCQ-UMSA, por permitirme desarrollar mi proyecto y brindarme todo el apoyo necesario.

A mis tutores: Dr Rigoberto Choque y Dr Mauricio Ormachea, por su gran apoyo, paciencia, enseñanza, consejos y asesoramiento que me brindaron durante todo el desarrollo del proyecto de grado. A mi tribunal Dr. Rómulo Gemio, por la paciencia y su tiempo dado para la mejora de este proyecto.

A la Unidad de análisis de Calidad Ambiental del que fue el Instituto de Investigación Nuclear (IBTEN), por permitirme realizar mis prácticas profesionales, al Ing. Jorge Chungara, por su gran paciencia, apoyo y enseñanza que me brindo, a la Lic. Rocío Choque por la disciplina de trabajo que me transmitió.

A Franz Candia por ser parte de mi vida, por apoyarme incondicionalmente, darme aliento, fuerza para poder realizar cada etapa del proyecto y sobre todo por su gran amor.

Muchas gracias!!!!

INDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO I..... | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1. ANTECEDENTES..... | 4 |
| 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 5 |
| 1.3. OBJETIVOS | 6 |
| 1.3.1. OBJETIVO GENERAL | 6 |
| 1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS | 6 |
| 1.4. JUSTIFICACIÓN | 7 |
| CAPÍTULO II..... | 8 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 8 |
| 2.1. GENERALIDADES DEL CROMO..... | 8 |
| 2.2. FUENTES DE CROMO EN AGUA | 8 |
| 2.3. QUÍMICA DEL CROMO EN AGUA..... | 9 |
| 2.4. CROMO EN EL PROCESO INDUSTRIAL DE CURTIEMBRES | 11 |
| 2.5. TOXICIDAD DEL CROMO | 12 |
| 2.6. ESPECTROSCOPIA UV-VIS..... | 13 |
| 2.6.1. LEY DE LAMBERT-BEER | 14 |
| 2.6.2. DESVIACIONES REALES..... | 15 |
| 2.6.3. DESVIACIONES INSTRUMENTALES | 15 |
| 2.6.4. DESVIACIONES QUÍMICAS | 16 |
| 2.6.5. COMPONENTES DE UN ESPECTROFOTÓMETRO..... | 16 |
| 2.7. CALIBRACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ESPECTROFOTÓMETROS UV-VIS..... | 17 |
| 2.7.1. EXACTITUD DE LONGITUD DE ONDA | 18 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| 2.7.2. | EXACTITUD FOTOMÉTRICA..... | 19 |
| 2.8. | VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS | 19 |
| 2.8.1. | IMPORTANCIA DE VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO | 19 |
| 2.8.2. | CUANDO REALIZAR UNA VALIDACIÓN | 20 |
| 2.9. | PARÁMETROS DE VALIDACIÓN | 20 |
| 2.9.1. | LINEALIDAD Y RANGO DE TRABAJO | 20 |
| 2.9.2. | LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN..... | 24 |
| 2.9.3. | SELECTIVIDAD | 26 |
| 2.9.4. | PRECISIÓN | 29 |
| 2.9.5. | EXACTITUD | 30 |
| 2.9.6. | ROBUSTEZ | 32 |
| CAPÍTULO III | | 35 |
| 3. | METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 35 |
| 3.1. | TIPO DE INVESTIGACIÓN | 35 |
| 3.2. | ZONA DE ESTUDIO | 35 |
| 3.2.1. | AGUA NATURAL | 35 |
| 3.2.2. | AGUA RESIDUAL..... | 37 |
| 3.3. | TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA | 40 |
| 3.3.1. | TIPOS DE MUESTRAS | 41 |
| 3.3.2. | CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA..... | 41 |
| 3.4. | DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS | 42 |
| 3.5. | EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS | 42 |
| 3.6. | METODOLOGÍA ANALÍTICA | 45 |
| 3.6.1. | VERIFICACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO GENESYS 10S UV-VIS | 45 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.6.2. | DETERMINACIÓN DE CR (VI) POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS | 47 |
| 3.6.2.2. | Preparación de la Solución Tampón | 48 |
| 3.6.2.3. | Preparación de la Difenilcarbazida | 48 |
| 3.6.2.4. | Preparación de las soluciones para la curva de calibración | 48 |
| 3.6.2.5. | Tratamiento de la muestra para la determinación de Cr (VI) | 49 |
| 3.6.2.6. | Desarrollo de color y medición..... | 50 |
| 3.6.3. | DETERMINACIÓN DEL RANGO ÓPTIMO DE pH PARA EL DESARROLLO DEL COMPLEJO Cr (VI)-DPC | 50 |
| 3.6.4. | DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CONDUCTIVIDAD SOBRE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO Cr (VI)-DPC | 51 |
| 3.6.5. | DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO Cr (VI)-DPC | 51 |
| 3.6.6. | DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD..... | 51 |
| 3.6.7. | DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN..... | 52 |
| 3.6.8. | DETERMINACIÓN DE LA SELECTIVIDAD | 52 |
| 3.6.9. | DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN | 53 |
| 3.6.10. | DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD..... | 54 |
| 3.6.11. | DETERMINACIÓN DE LA ROBUSTEZ..... | 54 |
| | CAPÍTULO IV | 55 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIONES | 55 |
| 4.1. | VERIFICACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS (GENESYS 10S)..... | 55 |
| 4.1.1. | Evaluación de la Exactitud de Longitud de onda | 55 |
| 4.1.2. | Evaluación de la exactitud fotométrica en el rango Visible | 55 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.2. | CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Cr (VI)..... | 56 |
| 4.2.1. | Variación del pH | 56 |
| 4.2.2. | Variación de la Conductividad | 57 |
| 4.2.3. | Tiempo de reacción del complejo Cr (VI)-DPC | 58 |
| 4.3. | PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO | 60 |
| 4.3.1. | Linealidad | 60 |
| 4.3.2. | Límite de Detección y Límite de Cuantificación | 68 |
| 4.3.3. | Selectividad del Método | 71 |
| 4.3.4. | Precisión | 78 |
| 4.3.5. | Exactitud..... | 84 |
| 4.3.6. | Robustez | 85 |
| | CAPÍTULO V | 89 |
| 5. | CONCLUSIONES..... | 89 |
| | CAPÍTULO VI..... | 92 |
| 6. | RECOMENDACIONES | 92 |
| | CAPÍTULO VII..... | 93 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA..... | 93 |
| 8. | ANEXOS..... | 97 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 Diagrama pE-pH de cromo acuoso..... | 9 |
| FIGURA 2 Diagrama de flujo del proceso de curtido al cromo | 11 |
| FIGURA 3 Espectro electromagnético..... | 14 |
| FIGURA 4 Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro UV-VIS | 17 |
| FIGURA 5 Efecto de la exactitud de longitud de onda en una medición UV-VIS..... | 18 |
| FIGURA 6 Intervalo de trabajo..... | 21 |
| FIGURA 7 Relación de los criterios de exactitud y precisión | 31 |
| FIGURA 8 Diseño experimental de Plackett-Burman | 33 |
| FIGURA 9 Zona de la toma de muestra..... | 36 |
| FIGURA 10 Toma de la muestra de agua natural | 36 |
| FIGURA 11 Mapa Hidrográfico mostrando el curso natural del Río Seco | 37 |
| FIGURA 12 Puntos de Muestro en el Río Seco, Distrito 4 Ciudad de El Alto..... | 38 |
| FIGURA 13 Vista de la situación de contaminación del Río Seco, Distrito 4..... | 39 |
| FIGURA 14 Toma de la muestra de agua residual | 39 |
| FIGURA 15 Tipos de envase, preservación de diferentes muestras ambientales | 41 |
| FIGURA 16 Reacción de la difenilcarbazida con el Cr (VI) | 47 |
| FIGURA 17 Formación del complejo Cr (VI)-DPC a diferentes valores de pH | 57 |
| FIGURA 18 Cinética de reacción de la solución de 0,020 mg Cr (VI)/L..... | 58 |
| FIGURA 19 Cinética de reacción de la solución de 0,078 mg Cr (VI)/L..... | 58 |
| FIGURA 20 Cinética de reacción de la solución de 0,245 mg Cr (VI)/L..... | 59 |
| FIGURA 21 Cinética de reacción de los tres niveles de concentración estudiados.... | 59 |
| FIGURA 22 Linealidad del sistema | 67 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 23 Selectividad del método de determinación de Cromo (VI)..... | 77 |
| FIGURA 24 Curvas de calibración realizadas en los dos equipos..... | 83 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Equipos y materiales utilizados en el desarrollo del proyecto. | 43 |
| Tabla 2 Reactivos utilizados en el desarrollo del trabajo..... | 44 |
| Tabla 3 Valores de longitud de onda de referencia, del espectro de absorción de la solución de Dicromato de potasio 0,040 mg/kg en ácido perclórico 0,001 N. | 46 |
| Tabla 4 Absorbancias de referencia de la solución de Sulfato de cobre pentahidratado 0,08 mol/L en ácido sulfúrico. | 47 |
| Tabla 5 Datos experimentales de la solución de Dicromato de potasio 0,040 mg/L preparada con el SRM 935a. | 55 |
| Tabla 6 Datos experimentales de la solución de Sulfato de cobre pentahidratado | 56 |
| Tabla 7 Valores de absorbancia del estándar de 0,098 mg Cr (VI)/L a diferentes valores de pH. | 56 |
| Tabla 8 Resultados experimentales de la variación de la conductividad | 57 |
| Tabla 9 Datos experimentales para determinar la linealidad del sistema | 60 |
| Tabla 10 Datos experimentales de absorbancia para cada nivel de concentración. Cálculo del estadístico (G). | 62 |
| Tabla 11 Datos experimentales de absorbancia para cada nivel de concentración. Cálculo del estadístico (C)..... | 64 |
| Tabla 12 Resumen de datos experimentales para determinar la linealidad del sistema...66 | |
| Tabla 13 Límite de detección y límite de cuantificación, hallados a partir de los datos de linealidad del sistema. | 69 |
| Tabla 14 Límite de detección y límite de cuantificación a partir de la lectura de muestras blanco | 70 |

| | |
|---|----|
| Tabla 15 Resumen de los valores obtenidos para el límite de detección y el límite de cuantificación. | 70 |
| Tabla 16 Datos experimentales para la prueba de selectividad del método con matriz sin analito, al nivel de concentración 0,098 mg Cr (VI)/L y cálculo del estadístico F..... | 71 |
| Tabla 17 Datos experimentales para la prueba de selectividad del método con matriz sin analito, al nivel de concentración 0,247 mg Cr (VI)/L y cálculo del estadístico F..... | 73 |
| Tabla 18 Valores de los parámetros físico-químicos de la matriz | 74 |
| Tabla 19 Datos experimentales para la prueba de selectividad del método utilizando matriz con analito..... | 75 |
| Tabla 20 Resumen de los resultados obtenidos..... | 77 |
| Tabla 21 Valores de los parámetros físico-químicos de la matriz | 78 |
| Tabla 22 Datos experimentales para la evaluación de la precisión en condiciones de repetibilidad y cálculo del estadístico F..... | 79 |
| Tabla 23 Resumen de los cálculos para obtener una repetibilidad combinada..... | 80 |
| Tabla 24 Datos experimentales de dos analistas para la evaluación de la precisión en condiciones de precisión intermedia y cálculo del estadístico F. | 81 |
| Tabla 25 Datos experimentales obtenidos de la recta de calibración en dos equipos..... | 82 |
| Tabla 26 Datos experimentales para determinar el porcentaje de recuperación. | 84 |
| Tabla 27 Valores de las variables modificadas en el estudio de la robustez..... | 85 |
| Tabla 28 Diseño de Plackett-Burman, que resume los ocho experimentos | 86 |
| Tabla 29 Diseño de Plackett-Burman, que resume los ocho experimentos | 86 |
| Tabla 30 Resumen de los valores obtenidos para evaluar el criterio de Robustez. | 87 |
| Tabla 31 Resultados obtenidos de la determinación de Cr (VI) en muestras reales. | 88 |

RESUMEN

La validación de métodos de ensayo constituye una premisa para la realización de servicios científicos técnicos y una garantía de la calidad de los resultados a reportar. En el presente trabajo se realizó la validación del método espectrofotométrico de determinación de Cromo (VI) en agua natural y residual. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Química Ambiental del CCQ-UMSA basado en el método normalizado de la guía Standard Methods. (APHA-AWWA-WPCF, 2012)

Se comenzó la validación desde la verificación de la eficiencia del espectrofotómetro evaluando los parámetros de exactitud de longitud de onda y exactitud fotométrica, así también la determinación de las condiciones experimentales óptimas del proceso analítico. Se utilizó el equipo espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10S con una cubeta de 1cm de paso óptico a una longitud de onda de 540 nm.

Para validar la metodología en agua natural se utilizó una muestra recolectada de la vertiente de la gruta de la Virgen de Lourdes que se encuentra ubicada entre la avenida del Poeta y la avenida del Libertador, en la zona sur de la ciudad de La Paz. Para la matriz de agua residual se tomaron muestras del curso de agua del Río Seco en la zona Mercedario Sector 1 entre la avenida costanera, en el distrito 4 de la ciudad de El Alto.

Los parámetros validados fueron: linealidad en un rango de 0,039 a 0,245 mg Cr (VI)/L con un coeficiente de correlación de 0,9996, selectividad concluyendo que no hay efecto de matriz en agua natural y residual, límite de detección que es de 0,006 mg Cr (VI)/L, el límite de cuantificación que es de 0,019 mg Cr (VI)/L, precisión con una desviación estándar de 0,002, exactitud con un porcentaje de recuperación que varía desde un 91,6 a 99,8 % valores que se encuentran dentro del rango esperado de 80 a 110%, la robustez determinó que no se pueden alterar los valores establecidos para el tiempo de reacción, presencia de ácido fosfórico, volumen de ácido sulfúrico y volumen de DPC, pero el cambio de analista no afecta al proceso analítico.

Se determinó la concentración de cromo (VI) de tres muestras recolectadas del curso de agua del Río Seco que atraviesa la zona Mercedario del distrito 4 de la ciudad de El Alto, donde hay actividad industrial de curtiembres artesanales que vierten sus efluentes

al río. Los valores encontrados fueron: Punto 1 (16°30'42.2908"; 68°07'10.1784) 0,031±0,003 mg Cr (VI)/L, Punto 2 (16°30'42.2908"; 68°07'10.1784) 0,035±0,002 mg Cr (VI)/L, Punto 3 (16°30'42.2908"; 68°07'10.1784) 0,118±0,003 mg Cr (VI)/L. El valor máximo permitido por el Reglamento en Materia de Contaminación Hídrica para Cr (VI) es 0,05 mg/L, el valor del Punto 3 se encuentra por encima del máximo permitido.

Palabras clave: Validación, cromo, método espectrofotométrico



CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La principal fuente de cromo (Cr) en la naturaleza es la cromita ($FeO \cdot Cr_2O_3$) mineral que se encuentra frecuentemente como granos pequeños en rocas ígneas, pero la principal fuente de la contaminación ambiental con cromo es antropogénica, puede presentarse en estados de oxidación de 0 y II a VI (SLOOFF et al., 1990). La descarga de efluentes industriales al medio ambiente es la causa más importante de acumulación de cromo. Los compuestos de Cr (VI) son tóxicos y agente carcinógeno para una variedad de organismos, causan irritación en la piel, debilitamiento en el sistema inmunológico, daños en riñones e hígado y la muerte (RAMIREZ, 2012). Estos son móviles en los sistemas suelo/agua, mucho más que los compuestos de cromo (III) debido a que el cromo (VI) es un oxidante fuerte y es muy soluble en sus formas aniónicas, mientras que los compuestos de cromo (III) tienden a formar precipitados inertes cerca de pH neutro. Estas características físicas y químicas de los compuestos de cromo son la causa de la diferente biodisponibilidad y toxicidad entre los compuestos de cromo (III) y cromo (VI). El Cromo (VI) puede coexistir en aguas naturales, efluentes y suelos dependiendo del pH del medio y sus características redox, puede ser generado por corrientes de efluentes provenientes principalmente de cromado, pigmentos, preservación de la madera, anticorrosión y cuero curtido entre otros. (Milovanovic, 2011)

En consecuencia, a los daños a la salud, medio ambiente, que puede ocasionar el Cr (VI), se ve necesario contar con una metodología que nos permita cuantificar la concentración de Cr (VI) en muestras ambientales. Por lo cual el presente trabajo tiene por objetivo Validar el método analítico para la determinación de Cr (VI) en aguas naturales y residuales por espectrofotometría UV VIS. Para realizar la validación inicialmente se realizó la verificación de la eficiencia del espectrofotómetro utilizado y se determinó las condiciones experimentales óptimas del proceso analítico de determinación de Cr (VI).

Los parámetros evaluados en la validación fueron: linealidad y rango de trabajo, límites de detección y cuantificación, selectividad, precisión, exactitud y robustez según la norma ISO-17025, también se determinó la concentración de Cr (VI) en muestras reales de agua residual.

1.1. ANTECEDENTES

Existen muchos estudios que se han ocupado de la repercusión negativa de los metales pesados en diversos ecosistemas y en la salud del ser humano. Hoy en día se conoce mucho más sobre los efectos de estos elementos, cuya exposición está relacionada con problemas de salud como retraso en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en los riñones, e incluso con casos de muerte. De ahí, la importancia que tiene el estudio de los metales pesados en el medio ambiente, lo cual está dado por su alta toxicidad, alta persistencia y rápida acumulación por los organismos vivos. Sus efectos tóxicos no se detectan fácilmente a corto plazo, aunque sí puede haber una incidencia importante a corto y mediano plazo. Estos son difíciles de eliminar del medio, de ahí la necesidad de contar con métodos de ensayos rápidos para el monitoreo y control de los mismos en el medio ambiente. (DANNIS A CASCARET, 2010)

De acuerdo con los estándares de calidad del agua establecidos por la Organización Mundial de la Salud, las principales directrices se encuentran en el control y cuantificación para cationes como: Aluminio (Al), Antimonio (Sb), Arsénico (As), Bario (Ba), Boro (B), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Plomo (Pb), Manganeseo (Mn), Mercurio (Hg), Molibdeno (Mo), Níquel (Ni), Nitrógeno total (N total), Selenio (Se), Sodio (Na), Uranio (U) y Zinc (Zn). En cuanto a los aniones, la OMS tiene estándares para: Cloruro (Cl^-), Cianuro (CN^-), Flúor (F^-), Sulfato (SO_4^{2-}), Nitrato (NO_3^-) y Nitrito (NO_2^-). (OMS, 2003)

Existen varios métodos para la determinación de Cr (VI) podemos mencionar algunos a continuación:

- El método colorimétrico, es útil para la determinación de Cr (VI) en agua natural o tratada en el intervalo de 100 a 1000 $\mu\text{g/L}$. Este rango puede ser extendido por dilución apropiada de la muestra o la concentración y/o el uso de trayectorias de celda más largas.

- La cromatografía de iones con detección fotométrica es un método adecuado para determinar el Cr (VI) disuelto en aguas subterráneas, y de los efluentes de aguas residuales industriales en un rango de 0,5 a 5000 µg/L.
- El método de espectrometría de absorción atómica electro térmica es adecuado para determinar niveles bajos de cromo total (< 50 µg/L) en aguas naturales y aguas residuales.
- Los métodos de espectrometría de absorción atómica de llama y los métodos de plasma acoplado inductivamente son apropiados para medir las concentraciones totales de cromo hasta niveles de ppm (mg/L). (APHA-AWWA-WPCF, 2012)

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los mayores problemas medio ambientales están relacionados con los desechos a los cuerpos de agua de la creciente actividad industrial, minera, agropecuaria y descargas domésticas que generan efluentes que en muchos casos descargan directamente a los cursos de aguas superficiales (CONDE, 2018), En nuestro país, en general, las descargas a cuerpos de agua están actualmente reguladas por la Ley de Medio Ambiente 1333 y sus reglamentos. En particular, las descargas líquidas industriales están reguladas por el RASIM sin embargo, muy pocas empresas cumplen con los límites establecidos, los cuales han sido calificados como muy exigentes por las industrias.

En cada ciudad la situación de las descargas líquidas industriales es diferente. A continuación se menciona la situación actual de las ciudades de La Paz y El Alto:

- En la ciudad de La Paz, no existe una planta de tratamiento que reciba las aguas de desecho industriales. Tampoco existe una normativa que regule éstas descargas al sistema de alcantarillado (incluidas las de curtiembres), las empresas en su mayoría, no cuentan con sistemas individuales de tratamiento de efluentes y por lo tanto, descargan sus efluentes sin tratamiento a los cuerpos de agua.
- En la ciudad de El Alto, la empresa de agua potable y alcantarillado cuenta con una planta de tratamiento de tratamiento de aguas de desecho, ubicada en Puchucollo. En vista de que no existe cobertura total de alcantarillado, la planta

recibe parcialmente las aguas de desecho industriales (incluyendo las de curtiembre) y cobra una tarifa por la descarga de aguas a su sistema en función al caudal, carga contaminante y degradación de la tubería. Algunas industrias descargan sus efluentes líquidos directamente al suelo o a los ríos. (CPTS, 2006)

El reglamento en Materia de Contaminación Hídrica establece como valor máximo permisible para el Cr (VI) 0,05 mg/L y como se ha mencionado el Cr (VI) en el agua es un carcinógeno comprobado para diferentes órganos internos y externos de los organismos vivos. Las propiedades físicas, químicas y biológicas del cromo favorecen la disolución en el medio ambiente del agua. (Debabrata Pradhan et.al., 2017)

La importancia de estos problemas, demuestran la necesidad de contar con una metodología confiable de análisis de Cr (VI), el laboratorio de Química Ambiental de la CCQ-UMSA no cuenta con un método validado para la determinación de Cr (VI) con el presente trabajo se pretende validar el método espectrofotométrico que determine Cr (VI) en agua natural y residual.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Validar el método analítico espectrofotométrico, para la determinación de cromo hexavalente en aguas naturales y residuales, en el Laboratorio de Química Ambiental de la Carrera Ciencias Químicas (FCPN-UMSA).

1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Verificar la eficiencia del espectrofotómetro ultravioleta-visible *Genesys* 10S, evaluando la exactitud de longitud de onda y exactitud fotométrica.
- Determinar las condiciones experimentales óptimas para la cuantificación de Cr (VI) por espectrofotometría UV-VIS.
- Determinar los parámetros de la Norma ISO - 17025 referidos a establecer la linealidad y rango de trabajo, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud y robustez.

1.4. JUSTIFICACIÓN

El interés por la validación del método analítico de determinación de Cr (VI) es originado por el amplio uso de este metal en la industria metalúrgica, en la fabricación de materiales refractarios, en fabricación de pigmentos, electro-metalizado y curtido de pieles entre otros. Cantidades considerables de compuestos de cromo son descargados en el ambiente en forma de residuos líquidos, como consecuencia de estos procesos, dichas descargas alteran las condiciones naturales del afluente, ocasionando limitantes para el aprovechamiento del recurso hídrico.

Hoy en día, el cromo sigue siendo detectado en los suministros de agua potable, sin embargo, a diferencia de décadas anteriores, a nivel mundial se han estipulado valores con el fin de regularlo, puesto que se propaga fácilmente a través del agua, afectando la salud del consumidor. (APHA, 1989)

Ahora bien, surge la necesidad de implementar un método analítico que evalúe la calidad del agua, tanto en fuentes naturales, como en plantas potabilizadoras, contando que este sistema analítico sea rápido y de fácil manejo al servicio de la población.

Todo método de cuantificación tiene una finalidad, donde el papel de la validación es verificar que dicho método es adecuado, por lo tanto, una correcta validación debe detectar la presencia de errores en él y permitir corregirlos. La importancia de validar el método propuesto es demostrar que las pruebas para la detección y cuantificación de cromo hexavalente sean confiables y así confirmar que el ensayo tiene las capacidades de desempeño consistente, junto con otras actividades contenidas en el aseguramiento de la calidad.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DEL CROMO

El cromo (Cr) es el primer elemento en el grupo VIB de la tabla periódica; que tiene un número atómico de 24, un peso atómico de 51,99 y valencias de (0) y (II a VI). La abundancia promedio de Cr en la corteza terrestre es de 122 mg/L; en suelos oscila entre 11 a 22 mg/L; en corrientes promedia alrededor de 1 µg/L y en aguas subterráneas es de 100 µg/L (APHA-AWWA-WPCF, 2012).

Las formas más comunes en las que se encuentra este elemento son las valencias (0), (III) y (VI). El Cr (0), también denominado cromo metálico, se usa en la fabricación de acero y el Cr (III) y (VI) se utilizan en el cromado, en colorantes y pigmentos, en curtido del cuero y en la preservación de la madera y, en cantidades pequeñas, en barrenas para la extracción de petróleo, inhibidores de corrosión, en la industria textil y en el tóner para copadoras. El cromo hexavalente Cr (VI) y el cromo Cr (0) son formas producidas normalmente por procesos industriales, mientras que las formas trivalentes predominan en organismos vivos. El cromo trivalente Cr (III) es un elemento residual necesario para mantener un buen estado de salud, ya que ayuda al cuerpo a utilizar el azúcar, la grasa y las proteínas. (ATDRS, 2006)

2.2. FUENTES DE CROMO EN AGUA

El cromo se encuentra de forma natural y se extrae como óxidos dobles, principalmente como cromita ($FeO \cdot Cr_2O_3$) y, en menor medida, como crocoita ($PbO \cdot CrO_3$) o óxido de cromo (Cr_2O_3). La cromita se utiliza casi exclusivamente para la producción de cromo, el contenido de Cr_2O_3 varía de 40 a 55% (SLOOFF et al., 1990).

El cromo y sus sales se utilizan en las industrias de curtido de cuero y textil teñido, la fabricación de catalizadores, productos químicos de lavandería, pigmentos y pinturas, fungicidas, la industria cerámica y vidrio, y en la fotografía, y para el cromo de la aleación y la producción de metal de cromo, cromado y control de la corrosión (SLOOFF et al., 1990). Las emisiones no controladas o descargas de residuos de estos

La especie dominante de Cr (III) presente en el agua depende del pH, ya que se forman complejos acuosos como ser: $Cr(OH)^{2+}$, $Cr(OH)_2^+$, $Cr(OH)_3$. A altas concentraciones estos iones imparten un color verde al agua. El $Cr(OH)_2^+$ es la especie dominante en el agua subterránea natural con un pH entre 6 y 8. (Calder, 1988). En condiciones ligeramente ácidas a alcalinas el Cr (III) puede precipitar como hidróxido de cromo amorfo, $Cr(OH)_3$ (s). El Cr (III), siendo un ion cargado positivamente, tiene una fuerte tendencia a formar complejos muy estables con ligandos orgánicos o inorgánicos cargados negativamente. Por lo tanto, normalmente se encuentra en forma de complejos. (PICHEL et al., 1976)

Se espera que la movilidad de Cr (III) en el medio acuoso sea baja debido a la baja solubilidad de $Cr(OH)_3$ (s) por lo cual precipita además tiene una fuerte adsorción sobre sólidos en condiciones ligeramente ácidas a alcalinas. El Cr (III) alcanza su solubilidad mínima en el intervalo de pH de las aguas naturales (pH= 7,5-8,5).

El Cr (VI) existe en solución como especies/iones monoméricos: H_2CrO_4 (ácido crómico), $HCrO_4^-$ (cromato ácido) y CrO_4^{2-} (cromato); o como el ión dimérico $Cr_2O_7^{2-}$ (dicromato que sólo existe en soluciones fuertemente ácidas). Las especies monoméricas (cromato y cromato ácido) imparten un color amarillo al agua cuando la concentración de Cr (VI) es mayor que 1 mg/L. En soluciones diluidas (<1 mg/L), la forma predominante es CrO_4^{2-} que al estar cargada negativamente, no forma complejos con superficies con carga negativa (PICHEL et al., 1976). Sin embargo, los aniones de Cr (VI) se adsorben sobre superficies cargadas positivamente, como los óxidos e hidróxidos de Fe, Mn y Al. La adsorción de Cr (VI) suele ser limitada y disminuye con aumento del pH Por lo tanto, Cr (VI) es más móvil que Cr (III). (SLOOFF et al., 1990)

El Cr (VI) se reduce fácilmente por Fe (II), sulfuros disueltos y ciertos compuestos orgánicos con grupos sulfhidrilo. En contraste, Cr (III) se oxida rápidamente por un gran exceso de MnO_2 y poco a poco por el oxígeno en condiciones similares a las aguas naturales. Sobre la base de estas tendencias de conversiones internas, es deseable que los estándares de calidad del agua se basen en la concentración total de cromo, así como en la concentración de las especies más tóxicas Cr (VI).

2.4. CROMO EN EL PROCESO INDUSTRIAL DE CURTIEMBRES

En las Curtiembres se desarrolla un proceso en el cual las pieles de animales, especialmente vacunos y caprinos, se someten a una serie de tratamientos con diversas sustancias llamadas curtientes y otras diversas operaciones, destinadas a producir modificaciones químicas y físicas en las pieles, con el fin de convertirlas en material duradero, permeable al agua y a la vez suave, elástico y flexible, el producto final es el cuero o piel curtida. (CORONA, 1998)

El proceso implica tres etapas de producción que son: ribera, curtido y acabado, en la Figura 2 se muestra el diagrama de producción.

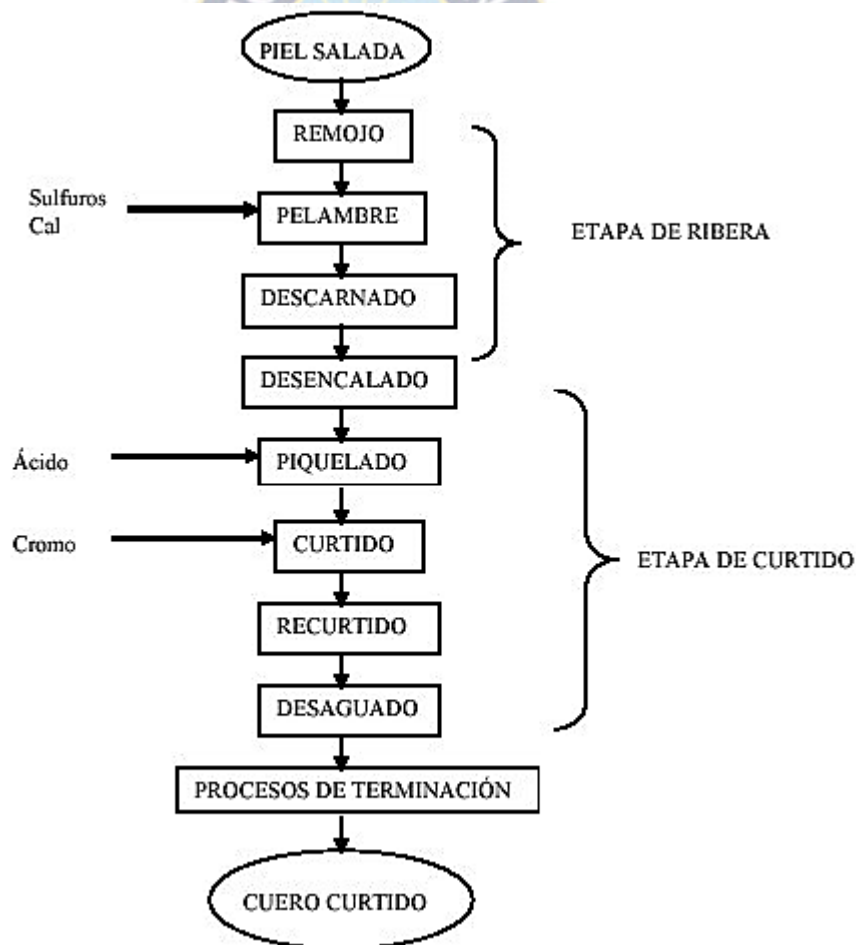


FIGURA 2 Diagrama de flujo del proceso de curtido al cromo

Fuente: (ESTRUCPLAN, 2000)

En la fase de curtido las pieles reaccionan con productos químicos, estabilizando su composición orgánica, evitando de esta manera procesos de descomposición y putrefacción. Esta etapa se inicia con el desencalado que consiste en remover el sulfuro de sodio y la cal de la piel mediante el uso de dióxido de carbono y sulfato de amonio, con el fin de eliminar la alcalinidad de la misma, también se adicionan encimas pancreáticas y bacteriales con el fin de modificar la proteína de las fibras de la piel y convertirla en suave y flexible que facilite la penetración de los curtientes; se continúa con el piquelado que consiste en tratar las pieles con ácidos y sales como el sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, acético y cloruro sódico, para dar a la piel pH entre 2 y 3.5 y recibir el curtido mineral a base de cromo; en el curtido se aplica a la piel un curtiente vegetal o mineral para formar un complejo (cuero) resistente a la degradación física o biológica, los curtientes vegetales son principalmente taninos, mientras los curtientes minerales son compuestos químicos inorgánicos y derivados especialmente de cromo, circonio, aluminio y hierro; el escurrido es la operación mecánica mediante la cual el cuero pierde la humedad y aumenta su área; por último el rebajado consiste en rebajar mecánicamente el calibre del cuero hasta obtener un espesor uniforme. (Social, 1996). Después del curtido al cromo, el cuero se escurre, rebaja y divide mecánicamente para obtener el "wet blue", un producto cuyo nombre se debe al color azul verde del sulfato de cromo. Los cueros sin cromo, por su color claro, se llaman "wet white".

2.5. TOXICIDAD DEL CROMO

La toxicidad del cromo depende de la especiación química y, por lo tanto, los efectos asociados a la salud están influenciados por las formas químicas de exposición (Calder, 1988). Los compuestos de Cr (VI) son mucho más solubles que Cr (III) y son mucho más tóxicos (mutagénico y cancerígeno) en microorganismos, plantas, animales y humanos (NTP, 2007). En contraste, Cr (III) tiene toxicidad relativamente baja y es inmóvil bajo moderadamente condiciones alcalinas a ligeramente ácidas (ZOUBOULIS et al., 1995).

Cr (III) es un oligoelemento nutricionalmente esencial, no tóxico y poco absorbido. Su deficiencia resulta en intolerancia a la glucosa, incapacidad para usar glucosa y otros trastornos metabólicos. El requerimiento diario de cromo se estima en ser 0,5–2 mg de

Cr adsorbible (III). Sin embargo, un exceso cantidad de cromo por encima del valor recomendado puede ser tóxico para la salud humana. La ingestión de 1 a 5 g de cromato resulta en efectos agudos severos y puede ocurrir la muerte después shock cardiovascular (OMS, 2003). Cr (VI) es tóxico, produciendo daño hepático y renal, hemorragia interna y trastornos respiratorios. Una dosis oral de 2 a 5 g de un compuesto de cromo hexavalente soluble puede ser fatal para un humano adulto. Ingerir menos de 2 g de compuesto de cromo hexavalente puede resultar en riñón y daño hepático después de 1 a 4 días de exposición (Katz, 1994). Los efectos sub crónicos y crónicos incluyen dermatitis y ulceración de la piel. Se ha demostrado que Cr (VI) causa cáncer en humanos y animales a través de la exposición por inhalación, pero no se ha demostrado que sea cancerígeno por ingestión exposición. Los compuestos de Cr (VI) se han asociado con cáncer de pulmón en trabajadores de fábrica.

2.6. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

La espectroscopia o espectrofotometría UV-Visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución, la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. (DÍAZ, 2005)

El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda se comprende entre 190 y 800 nm la Figura 3 muestra el espectro electromagnético. (WIKIPEDIA, 2019)

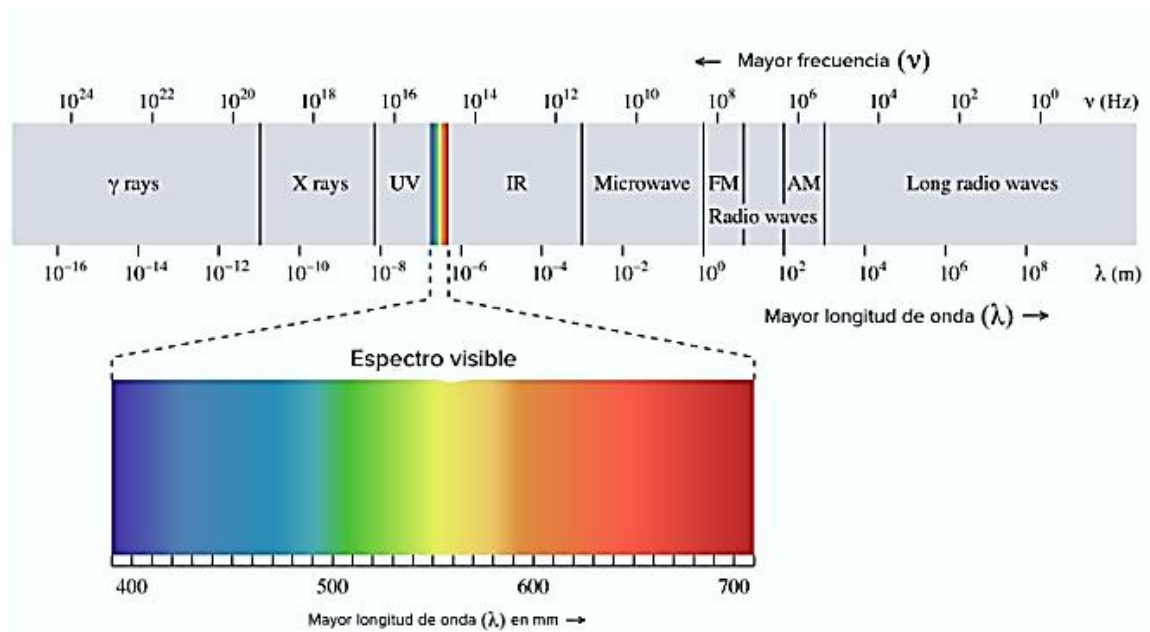


FIGURA 3 Espectro electromagnético

Fuente: (DAVIS, 2010)

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, estos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV.

2.6.1. LEY DE LAMBERT-BEER

La ley Fundamental en que se basa los métodos espectrofotométricos es la ley de Lambert – Beer se cumple para cualquier proceso de absorción en cualquier zona del espectro, en el cual establece que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración y el camino óptico. La cual se puede expresar en la siguiente formula:

$$A = \epsilon bC \quad \text{Ecc.1}$$

Dónde:

A= absorbancia

ϵ = Coeficiente de absortividad Molar

b= camino óptico

C= Concentración

Esta ley es de mucha utilidad para la cuantificación de un determinado analito en una muestra. Esta ley se ve alterada por algunos factores los cuales se conocen como desviaciones de la ley de Lambert – Beer y estas desviaciones se clasifican en:

2.6.2. DESVIACIONES REALES

En la deducción de la ley de Beer, no se ha considerado que la absortividad dependa del índice de refracción, según la expresión:

$$\epsilon = \epsilon_{verdadero} \frac{n}{(n^2+2)^2} \quad \text{Ecc.2}$$

Como a su vez, el índice de refracción varía con la concentración, la absortividad no es rigurosamente constante para cualquier concentración, provocando desviaciones negativas. De todas formas, en la práctica, para concentraciones menores a 10^{-3} M puede prescindirse de la influencia de este factor, al ser el índice de refracción, esencialmente constante.

2.6.3. DESVIACIONES INSTRUMENTALES

Las fluctuaciones producidas en la corriente eléctrica, la inestabilidad de algunas fuentes de radiación o la respuesta no lineal del detector pueden originar el funcionamiento incorrecto de un determinado aparato. Además de éstos, pueden considerarse los siguientes factores de tipo instrumental como causas de desviaciones de la Ley de Beer:

- Uso de radiación no monocromática
- Presencia de radiación parásita
- Errores de lectura

2.6.4. DESVIACIONES QUÍMICAS

Se incluyen en este apartado toda una serie de desviaciones aparentes de la ley de Beer producidas como consecuencia de procesos químicos en los que participan las especies absorbentes, como ser:

- Influencia del equilibrio
- Influencia del solvente
- Influencia de la temperatura
- Presencia de impurezas en los reactivos
- Interacciones entre especies absorbentes
- Interacciones soluto-radiación electromagnética

2.6.5. COMPONENTES DE UN ESPECTROFOTÓMETRO

Los componentes principales de un espectrómetro son:

- Fuente de radiación (Fuente de luz), la fuente de luz ilumina la muestra. Las condiciones necesarias de la fuente son estabilidad, direccionalidad, distribución de energía espectral continua y larga vida. Las fuentes empleadas en los espectrofotómetros son lámparas de tungsteno de bajo voltaje, lámpara tungsteno-halógena o lámpara de pulso/arco de xenón.
- Selector de longitud de onda (Monocromador), Se necesita una radiación constituida por un grupo limitado, estrecho y continuo de longitudes de onda denominadas bandas. Una anchura de banda estrecha aumenta la resolución.
- Recipiente de la muestra (Cubeta de muestra), Es el camino óptico que atraviesa la radiación electromagnética, los recipientes de la muestra tienen medidas de 0.5 a 5 cm., sus formas pueden ser rectangulares y cilíndricas, el material del que están elaborados varían dependiendo de la región del espectro electromagnético en el cual serán utilizadas, así podemos encontrar para la región Ultra violeta: Cuarzo o sílice fundida, para la región Visible: Cuarzo, sílice fundida, plástico y para Infrarrojo: cristales de sal (KCl, KBr)

- Detector (Foto multiplicador), Los detectores son transductores que convierten la energía radiante en señal eléctrica. La propiedad general de los detectores es su capacidad de producir una señal eléctrica cuando son bombardeados por fotones.
- Amplificador de la señal, que produzca o genere una señal eléctrica mucho mayor a la señal recibida.
- Dispositivo de lectura (Ordenador)

En la Figura 4 se muestra un esquema del equipo.

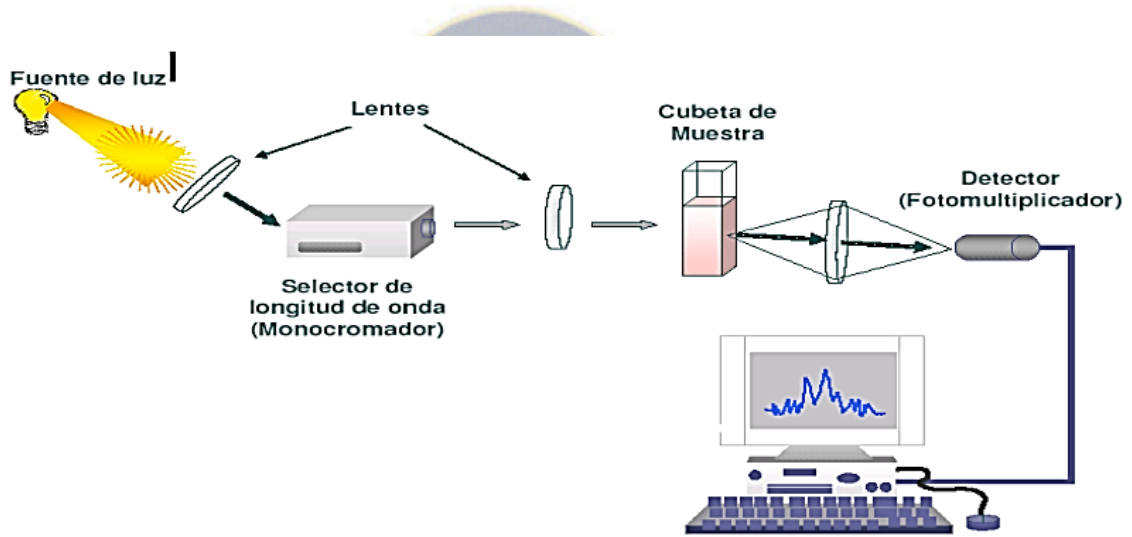


FIGURA 4 Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro UV-VIS

Fuente: (MARTÍNEZ et al., 2009)

2.7. CALIBRACIÓN Y/O VERIFICACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ESPECTROFOTÓMETROS UV-VIS

El objetivo de la calibración es evaluar la capacidad de medida de los instrumentos como objeto de garantizar la comparabilidad de los resultados con los obtenidos por otros laboratorios. El vocabulario internacional de términos fundamentales y generales de metrología (ISO, 1993) define así la calibración: “Conjunto de operaciones que establecen, en unas condiciones especificadas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esta magnitud realizados por patrones”.

Existen varias pruebas para calibrar un espectrofotómetro ultra violeta visible, estas incluyen la exactitud, reproducibilidad de la longitud de onda, y la exactitud y la reproducibilidad fotométrica. En el presente trabajo sólo se hará la verificación de la exactitud de longitud de onda y exactitud fotométrica en el rango visible, por no contar con los materiales de referencia necesarios.

2.7.1. EXACTITUD DE LONGITUD DE ONDA

Es definida como la desviación de la longitud de onda leída a una banda de absorción o emisión de una banda de longitud de onda conocida. Esta desviación puede ser causas de errores significantes en las medidas de los análisis cualitativos y cuantitativos.

La exactitud de longitud de onda es determinada por comparación entre las medidas obtenidas de un material de referencia y el valor estándar establecido en el certificado del material de referencia como se muestra en la Figura 5. Entre los materiales de referencias utilizados tenemos un material óptico neutro el cual tiene poca dependencia de la longitud de onda para las transmitancias o absorbancias es deseable porque este elimina la dependencia del ancho de banda espectral de las mediciones. (MARTÍNEZ et al., 2009)

Prueba: La exactitud de la longitud de onda se verifica midiendo un estándar de referencia de longitud de onda conocida, con picos de absorción o emisión bien caracterizado y comparando la longitud de onda del pico registrado contra el valor de longitud de onda declarado en el certificado del estándar de referencia.

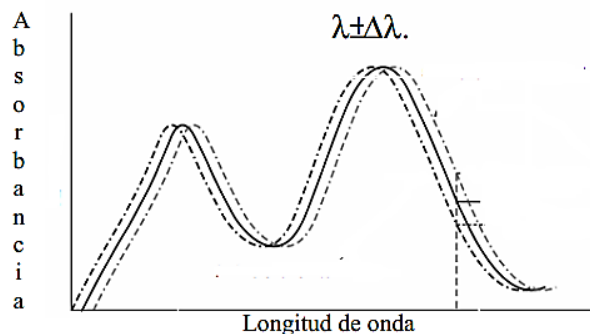


FIGURA 5 Efecto de la exactitud de longitud de onda en una medición UV-VIS

Fuente: (MARTÍNEZ et al., 2009)

2.7.2. EXACTITUD FOTOMÉTRICA

La exactitud fotométrica es determinada comparando la diferencia entre la absorbancia medida del material estándar de referencia y el valor estándar establecido. Entre los materiales de referencia utilizados tenemos un material óptico neutro el cual tiene poca tendencia de la longitud de onda para la transmitancia o absorbancias es deseable porque este elimina la dependencia del ancho de banda espectral de las mediciones. (VI IBEROLAB, 2015)

Prueba en el rango visible: Realizar 6 lecturas consecutivas de la solución de sulfato de cobre en ácido sulfúrico a las longitudes de onda de 600, 650, 700 y 750 nm, registrando los valores y confrontándolos con los valores de referencia.

2.8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación parte del concepto de la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 es, “La confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” (IBMETRO, 2018). Es fundamental que los laboratorios dispongan de medios y criterios objetivos para demostrar por medio de la validación que los métodos de ensayo reproducen resultados confiables y adecuados a la calidad deseada.

Es importante, cumplir las normativas (NB – ISO – IEC 17025) como:

- Optimizar los procesos.
- Asegurar la calidad/mejorar la productividad.
- Reducir costos

2.8.1. IMPORTANCIA DE VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO

Un método debe validarse cuando es necesario verificar que sus parámetros de desempeño cumplen en su totalidad la calidad deseada brindando seguridad y respaldo a una investigación analítica; por ejemplo cuando se desarrolla un nuevo procedimiento para solucionar un problema específico, cuando se requiere incorporar mejoras, extenderlo o cuando el control de la calidad indica que dicho procedimiento establecido está cambiando con el tiempo.

El laboratorio debe validar métodos no normalizados, métodos diseñados / desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesta y modificaciones de método normalizados para confirmar que los métodos se ajustan al uso propuesto. La validación establece un método y confirma su desempeño de apreciaciones cualitativas por parte del laboratorio en general, realizando mediciones analíticas que diariamente varios laboratorios van desarrollando, por ejemplo: como apoyo en la salud, para verificar los parámetros de calidad de agua para consumo humano, para verificar la composición nutricional en inocuidad alimentaria y evaluación de elementos tóxicos en aguas y alimentos. La validación de métodos analíticos junto con otras actividades englobadas en el área del aseguramiento de la calidad, otorgando confianza en los resultados obtenidos. (TOLA, 2016)

2.8.2. CUANDO REALIZAR UNA VALIDACIÓN

El proceso de validación debe realizarse cuando se presente alguna de las situaciones que se expone a continuación:

- Un nuevo método
- Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema
- Cuando el control de calidad indica que el método ya establecido está cambiando con el tiempo
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación
- Para demostrar la equivalencia para dos métodos es decir: un método nuevo y uno de referencia.

2.9. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

2.9.1. LINEALIDAD Y RANGO DE TRABAJO

La linealidad es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis

del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método.

Se puede determinar la linealidad del rango de trabajo (Figura 6) mediante un gráfico de concentración versus respuesta también llamado curva de calibración. Se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de valores teóricos conocidos en este sentido se recomienda partir de valores de cero o cercanos al cero y valores superiores.

Después de establecer el comportamiento lineal del método se debe realizar la curva de calibración graficando los datos de concentración de los estándares (X) versus la lectura observada (Y).

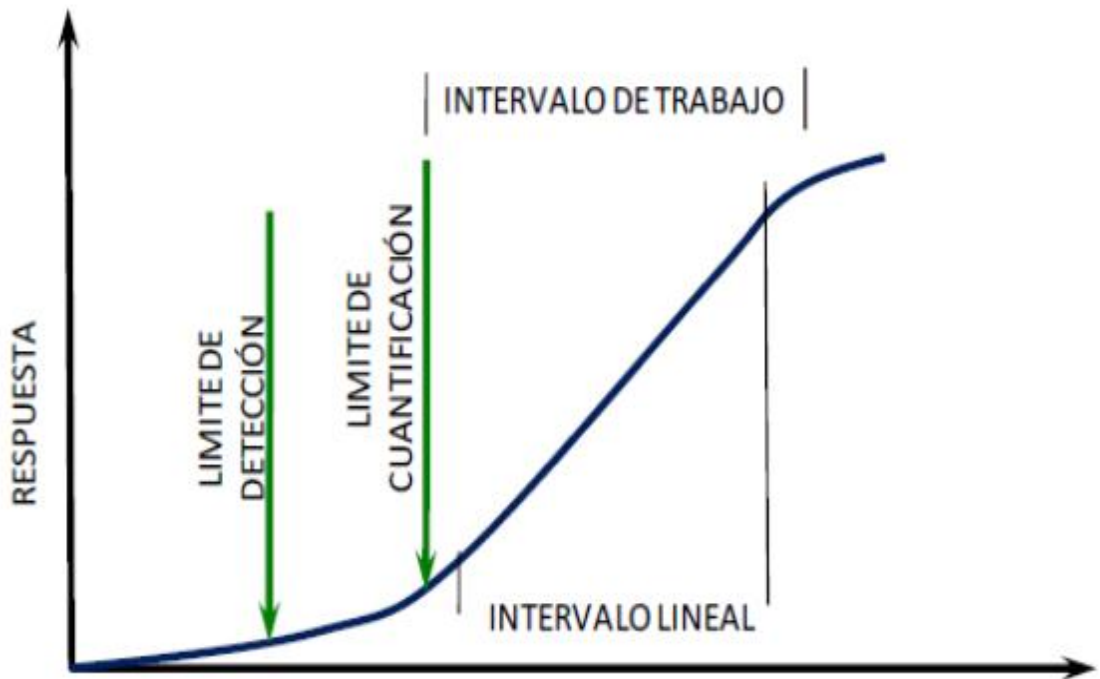


FIGURA 6 Intervalo de trabajo

Fuente: (Callejas, 2010)

2.9.1.1. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

La linealidad es obtenida por calibración interna o externa y formulada como expresión matemática en forma de una ecuación de regresión lineal, determinada por el método de mínimos cuadrados (sin forzar pasar por el origen). (IBMETRO, 2018)

Una ecuación de recta que relaciona dos variables es:

$$y = bx \pm a \quad \text{Ecc.3}$$

Dónde:

y = respuesta de la medida (absorbancia, altura o área de pico y otros)

x = concentración

b = inclinación de la curva de calibración (sensibilidad)

a = intersección con el eje y cuando x=0

Antes de hallar la ecuación de regresión lineal es necesario realizar un tratamiento estadístico de los datos obtenidos para descartar la presencia de datos anómalos. Dos de las pruebas estadísticas utilizadas con mayor frecuencia en un grupo de datos único son la prueba de Dixon y la prueba de Grubbs. La prueba de Grubbs utiliza una estadística de prueba, T, que es la diferencia absoluta entre el valor atípico, X_0 , y el promedio de la muestra dividida por la desviación estándar de la muestra, s.

$$G_{1,0} = \frac{|X_0 - \bar{X}|}{s} \quad \text{Ecc.4}$$

Dónde:

X_0 = valor sospechoso o aberrante

\bar{X} = promedio de la muestra

S = desviación estándar

Si el $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tablas}}$, el valor sospechoso es atípico o aberrante

Para determinar si el rango de trabajo es el correcto se realiza la validación de la dispersión de las medidas, es decir, estudio de las varianzas a lo largo de la curva. El método de los mínimos cuadrados supone que los residuos tienen una misma varianza. En la calibración esto significa que la precisión de las medidas es independiente del valor de la concentración. Esta condición de varianza uniforme es llamada HOMOCEASTICIDAD.

Para la comparación de varianzas se utiliza el Test “C” de Cochran, en el cual se utiliza la siguiente ecuación:

$$C_{calc} = \frac{S^2_{m\acute{a}x}}{\sum_{i=1}^n S^2_i} \quad \text{Ecc.5}$$

Si $C_{calc} > C_{tab}$ hay una condición de heterocedasticidad

Si $C_{calc} < C_{tab}$ hay una condición de homocedasticidad

Posteriormente, se realiza el método de mínimos cuadrados para hallar los valores de ecuación de regresión lineal, las ecuaciones utilizadas son:

$$a = \frac{\sum y_i - b_i \sum x_i}{n} \quad \text{Ecc.6}$$

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecc.7}$$

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{Ecc.8}$$

El coeficiente de correlación (r) indica el grado de relación entre la variable concentración (x) y la variable respuesta (y) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son de -1 y 1, el valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta. Para una curva de calibración es recomendable que el coeficiente de correlación obtenida sea mayor o igual a 0,999 aunque para elementos trazas se admite un valor igual o mayor que 0,99. (CONDE, 2018)

Para contar con un mejor indicador se puede realizar una evaluación de curva de calibración global, haciendo repeticiones de la curva en las mismas condiciones,

realizando una evaluación estadística de prueba t-Student para el coeficiente de correlación (r) que es un test de grado de relación entre la concentración y la respuesta el t_{crit} se calcula por medio de tablas con n-2 grados de libertad, para el nivel de confianza requerido del 95% ($\alpha = 0.05$), dos-colas, en este caso para un “P” que depende de los niveles de calibración (número de puntos usados en su cálculo).

Hipótesis

$H_0: r = 0$ **No Existe** correlación entre **X** y **Y** Sí $t_{exp} < t_{tab}$

$H_1: r \neq 0$ **Existe** correlación entre **X** y **Y** Sí $t_{exp} > t_{tab}$

Se calcula el t_{exp} con la ecuación:

$$t_{exp} = \frac{|r|\sqrt{P-2}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{Ecc.9}$$

2.9.2. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

En términos generales, el límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. Esta descripción proporciona al analista un buen margen de libertad para decidir la definición exacta del límite de detección, basada en una adecuada interpretación de la frase “significativamente diferente”. (MILLER, 2002)

El límite de cuantificación (LOQ) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad. También se define por diversas convenciones como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Algunas veces también se conoce como “límite de determinación”. LOQ es un valor indicativo y no deberá usarse en la toma de decisiones. (EURACHEM, 2005)

Existen diferentes metodologías para calcular los límites de detección y cuantificación los cuales son:

- A partir de la medición de una matriz sin analito
- A partir de la medición de una matriz fortificada
- A partir de la recta de calibración
- A partir de la relación instrumental señal/ruido

2.9.2.1. MEDICIÓN DE UNA MATRIZ SIN ANALITO

Se recomienda hacer 10 determinaciones independientes de una “muestra blanco” (matriz sin analito) y calcular la desviación estándar de los resultados, los límites se calculan con las siguientes ecuaciones:

$$L_D = X_b + 3S \quad \text{Ecc.10}$$

$$L_C = X_b + 10S \quad \text{Ecc.11}$$

Dónde:

X_b = valor medio obtenido para la muestra blanco

S = desviación estándar de los resultados

2.9.2.2. MEDICIÓN DE UNA MATRIZ FORTIFICADA

Se recomienda hacer 10 determinaciones independientes de una matriz fortificada a baja concentración y calcular la desviación estándar de los resultados, las ecuaciones que se utilizan son:

$$L_D = 3S \quad \text{Ecc.12}$$

$$L_C = 10S \quad \text{Ecc.13}$$

2.9.2.3. MEDICIÓN A PARTIR DE LA RECTA DE CALIBRACIÓN

A partir de la pendiente de la recta de calibración (b) y de la desviación estándar de la respuesta (S_a) se calculan los límites de detección y cuantificación con las siguientes expresiones:

$$L_D = \frac{3,3*S_a}{b} \quad \text{Ecc.14}$$

$$L_C = \frac{10*S_a}{b} \quad \text{Ecc.15}$$

2.9.3. SELECTIVIDAD

Según la definición de la IUPAC la selectividad es la capacidad de un método para ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices, sin interferencias de otros componentes de similar comportamiento.

Una interferencia es aquella especie química que causa un error sistemático en la determinación de un analito.

Se pueden dar dos casos:

- La presencia de interferencias que puedan dar una respuesta analítica que no se diferencie de la respuesta del analito.
- La presencia de interferencias que afecten la señal del analito (“efecto matriz”).

2.9.3.1. LA MATRIZ NO AFECTA A LA SEÑAL DEL ANALITO

En el caso que la matriz no afecta a la señal del analito en el rango de concentración estudiado se procede a la preparación de dos grupos de muestras de prueba, una con matriz y otra sin matriz, ambas con idéntica concentración en cada nivel de concentración de interés. Para la evaluación de los resultados se prosigue con los siguientes cálculos:

- Test de valores aberrantes o atípicos (Test de Grubbs)
- Test F (Snedecor) de Homogeneidad de varianzas y Test t (Student) de Comparación de las medias obtenidas.

La prueba F (Snedecor) de Homogeneidad de varianzas se plantea de la siguiente manera:

Hipótesis

Ho: $S_1^2 = S_2^2$ No existe diferencia significativa entre las varianzas Sí $F_{calc} < F_{tab}$

H₁: $S_1^2 \neq S_2^2$ Existe diferencia significativa entre las varianzas Sí $F_{calc} > F_{tab}$

Se calcula el estadístico (F) con la ecuación:

$$F_{calc} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{Ecc.16}$$

Dónde el resultado debe ser mayor a 1.

El valor de F tabulado con (n₁-1) GL como numerador y (n₂-1) GL como denominador, es obtenido en la tabla estadística (Anexo 2) con ayuda de un hoja de cálculo; usualmente, se adopta un nivel de confianza de 95%.

Sí el $F_{calc} < F_{tab}$ la matriz no tiene un efecto significativo sobre la precisión. Las desviaciones estándar de los grupos de pruebas (con matriz y sin matriz) pueden ser agrupados y la significación de las diferencias de las medias de los dos conjuntos de muestras puede ser probado con la prueba *t-student* para medias emparejadas se determina de la siguiente forma.

Hipótesis

Ho: $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$ Las medias son estadísticamente iguales Sí $t_{calc} < t_{tab}$

H₁: $\bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$ Las medias no son estadísticamente iguales Sí $t_{calc} > t_{tab}$

El valor del estadístico t se calcula con las ecuaciones:

$$t_{calc} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_{ag} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecc.17}$$

$$S_{ag} = \sqrt{\frac{[(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2]}{(n_1+n_2-2)}} \quad \text{Ecc.18}$$

2.9.3.2. MATRIZ CON PRESENCIA DE ANALITO

La selectividad en este caso es validada por la comparación de las inclinaciones de las curvas de adición de patrón. Se preparan dos grupos de muestras que contengan la

misma adición de analito para cada nivel de concentración. Un grupo contiene la matriz de la muestras (conteniendo un nivel básico de analito) y otro grupo no incluye la matriz de muestra.

Si las inclinaciones fueran consideradas estadísticamente iguales, no hay efecto matriz, y el uso del método de adición de patrón no es necesario.

El test t-student para igualdad de inclinaciones se desarrolla de la siguiente forma:

Hipótesis

$H_0: b_1 = b_2$ Las inclinaciones son estadísticamente iguales Sí $t_{calc} < t_{tab}$

$H_1: b_1 \neq b_2$ Las inclinaciones no son estadísticamente iguales Sí $t_{calc} > t_{tab}$

Se calcula el estadístico **t** a partir de las ecuaciones:

$$t_{calc} = \frac{|b_1 - b_2|}{ESD \sqrt{\frac{1}{Sxx_1} + \frac{1}{Sxx_2}}} \quad \text{Ecc.19}$$

$$ESD = \sqrt{\frac{GL_1(RSD)^2 + GL_2(RSD)^2}{GL_1 + GL_2}} \quad \text{Ecc.20}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \quad \text{Ecc.21}$$

$$RSD = \sqrt{\frac{(Y_1 - \bar{Y}_1)^2}{n-2}} \quad \text{Ecc.22}$$

Dónde:

GL = grados de libertad del residuo (n-2)

ESD = error estándar

RSD = desviación estándar del residuo

Sí el t-calculado < t-tabulado indica que $b_1 = b_2$ por lo tanto no hay efecto de matriz.

Consultar el t.tabulado para $GL_1 + GL_2$.

2.9.4. PRECISIÓN

La precisión mide la concordancia de los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión también refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, según opinión general, en condiciones repetidas. (BORIS DUFFAU, 2010)

La precisión de un método de ensayo puede evaluarse en diferentes condiciones experimentales:

- Repetibilidad
- Precisión intermedia
- Reproducibilidad

Las condiciones de Repetibilidad (r) son las siguientes:

- El mismo método
- La misma muestra (homogénea)
- En un solo laboratorio
- Un solo analista
- Con el mismo equipamiento
- En un corto intervalo de tiempo

Se compara los valores obtenidos en dos o más días diferentes, para uno o varios niveles de concentración. Se realiza el Test F (Snedecor) de Homogeneidad de varianzas, en caso de no existir diferencias significativas en las varianzas, es decir, $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabulado}}$ se combinan las repetibilidades con la ecuación 23:

$$S_r = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2}} \quad \text{Ecc.23}$$

Las condiciones de Precisión intermedia (Rw) son las siguientes:

- El mismo método
- La misma muestra (homogénea)

- En un solo laboratorio
- Diferentes analistas
- Con distinto equipamiento
- En mayores intervalos de tiempo

Las condiciones de Reproducibilidad (R) son las siguientes:

- El mismo método
- La misma muestra (homogénea)
- En distintos laboratorios
- Diferentes analistas
- Con distinto equipamiento
- En intervalos largos de tiempo

2.9.5. EXACTITUD

La exactitud expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero aplicado a un conjunto de resultados de ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia con dos componentes: la veracidad y la precisión, la veracidad es una expresión de cuan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados respecto al valor real. (EURACHEM, 2005)

2.9.5.1. VERACIDAD

La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia (o sea, un valor verdadero o un valor verdadero convencional).

Se dispone de dos técnicas básicas para la evaluación: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado. Estos valores de referencia son idealmente trazables a patrones internacionales y los materiales

de referencia certificados por lo general se aceptan como medio de proveer valores trazables.

No debemos confundir la exactitud con la precisión (Figura 7), pues la precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está el valor verdadero. Para que un método sea exacto se requiere de un cierto grado de precisión con el uso de material de referencia.

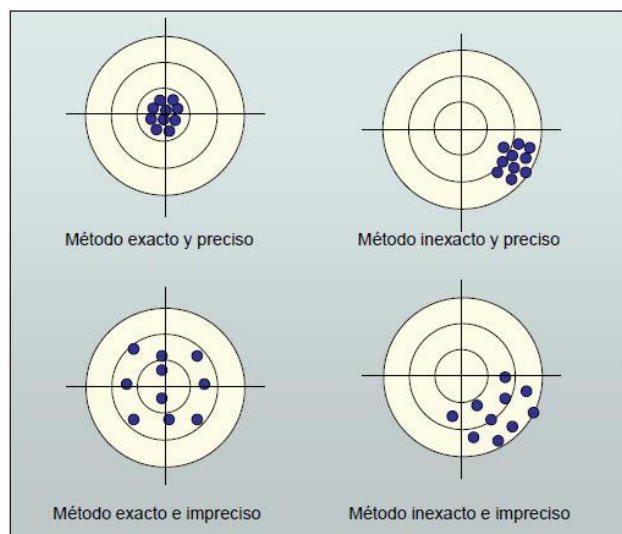


FIGURA 7 Relación de los criterios de exactitud y precisión

Fuente: (FERNÁNDEZ, 2010)

En el caso de no contar con un material de referencia certificado y se vea impedida la posibilidad de comparar los resultados con un método alternativo, se pueden realizar ensayos de recuperación.

2.9.5.2. ENSAYO DE RECUPERACIÓN

En un ensayo de recuperación se ve la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como Porcentaje de Recuperación. (COY, 2006)

Como criterio de aceptación se deben analizar al menos seis mediciones en lo posible en tres niveles de manera que los niveles nos permitan entregar la mejor información posible respecto a la capacidad de recuperación del método, calculada por la ecuación:

$$\%R = \left[\frac{X_e - X_o}{X_{ref}} \right] \cdot 100\% \quad \text{Ecc.24}$$

Dónde:

Xe= Concentración del analito en la muestra fortificada

Xo= Concentración del analito en la muestra

Xref= Concentración del analito adicionado en la muestra

2.9.6. ROBUSTEZ

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para mantenerse sin cambios ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. (ICH, 2002)

Para su determinación se puede considerar lo siguiente:

- Conocer las condiciones del medio.
- Definir las condiciones que afectan al proceso analítico.
- Seleccionar el objetivo de evaluación de la conformidad a ser utilizado, muestras de referencia y las muestras a determinar.
- Realizar mediciones bajo las condiciones modificadas.

Establecer niveles de influencia para cada una de las variables modificadas, sabiendo que la prueba de robustez tiene por objeto optimizar el proceso analítico, describiendo que bajo sus condiciones establecidas se puede obtener resultados suficientemente exactos, de manera que la prueba funcione confiablemente si se utiliza en otros laboratorios.

2.9.6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN

Se evalúan siete parámetros diferentes o menos (A, B, C, D, E, F y G) a través de ocho experimentos. Cada parámetro es medido en dos niveles: “-” representa el parámetro sin modificar y “+” representa el parámetro modificado. Los parámetros pueden corresponder también a variables no cuantitativas o no continuas, por ejemplo tipo de columna, analista, número de extracciones, etc. En la medida de lo posible los 8 experimentos deberían hacerse en condiciones de repetibilidad.

Los ocho experimentos realizados se presentan en la Figura 8:

| parámetro | A | B | C | D | E | F | G | resultado |
|---|---|---|---|---|---|---|---|-----------|
| e x p e r i m e n t o | 1 | - | - | - | - | - | - | s |
| | 2 | - | - | + | - | + | + | t |
| | 3 | - | + | - | + | + | + | u |
| | 4 | - | + | + | + | - | - | v |
| | 5 | + | - | + | + | + | - | w |
| | 6 | + | + | + | - | - | + | x |
| | 7 | + | + | - | - | + | - | y |
| | 8 | + | - | - | + | - | + | z |

FIGURA 8 Diseño experimental de Plackett-Burman

Fuente: (IBMETRO, 2018)

2.9.6.2. EVALUACIÓN

El efecto producido por la variación de un parámetro particular se estima de la siguiente forma, por ejemplo, para el parámetro A:

$$\delta_A = \frac{(s+t+u+v)}{4} - \frac{(w+x+y+z)}{4} \quad \text{Ecc.25}$$

Una vez calculada la diferencia para cada parámetro, se compara la diferencia δ_A con $\sqrt{2} \cdot S_r$, en donde S_r es la desviación estándar del método en condiciones de repetibilidad. Entonces sí:

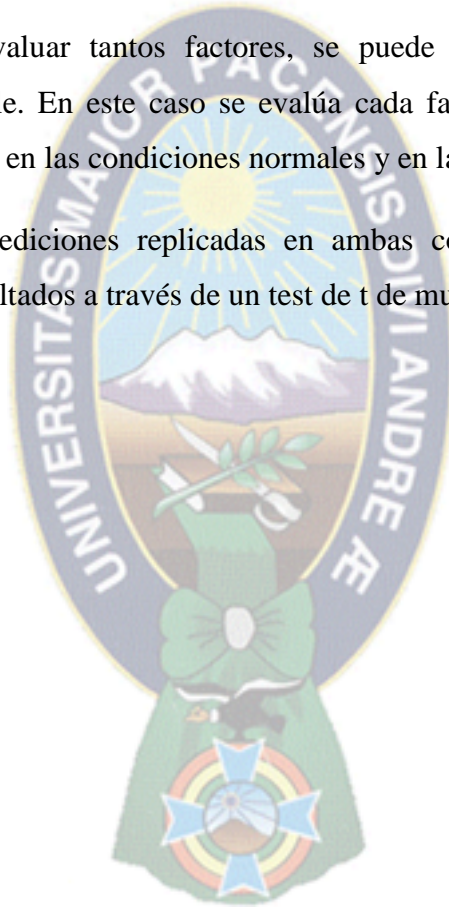
$$|\delta_i| > \sqrt{2} \cdot S_r \quad \text{Ecc.26}$$

El parámetro modificado tiene un efecto significativo, a un nivel de confianza del 95%.

2.9.6.3. MÉTODO SIMPLIFICADO

Si no se quieren evaluar tantos factores, se puede implementar una metodología alternativa más simple. En este caso se evalúa cada factor a partir del análisis de un material de referencia en las condiciones normales y en las condiciones modificadas.

Se llevan a cabo mediciones replicadas en ambas condiciones y se comparan los promedios de los resultados a través de un test de t de muestras independientes.



CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación es de tipo experimental cuantitativa y estadística; donde se realiza una amplia revisión bibliográfica sobre la teoría de validación y de los métodos existentes para la determinación espectrofotométrica de Cromo hexavalente, en aguas naturales y residuales. Tomando como referencia los métodos normalizados de análisis, entre los trabajos de mayor importancia se tiene a: Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater 22nd Edition. Así mismo, se tomó en cuenta el procedimiento empleado anteriormente en la Unidad de Análisis de Calidad Ambiental (UACA) que fue parte del Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN), documentos legales como la Norma Boliviana dictada bajo el amparo de la ley de Gestión Ambiental N° 1333, reglamentos en materia de contaminación hídrica entre otras.

3.2. ZONA DE ESTUDIO

3.2.1. AGUA NATURAL

Se denomina como agua natural a aquellas aguas cuyas propiedades originales no han sido modificadas por la actividad humana. (RMCH, 1995).

3.2.1.1. Vertientes de la Ciudad de La Paz

Por su situación geográfica y topográfica, la ciudad de La Paz, es una cabecera de cuenca donde se ha identificado aproximadamente 200 ríos y más de 100 vertientes que pasan por toda la mancha urbana; de acuerdo a datos de la alcaldía. (Paco, 2018) Por la gran presencia de vertientes en la ciudad se establece como zona de estudio en el caso de agua natural. En el presente trabajo la muestra fue recolectada de la vertiente de la gruta de la Virgen de Lourdes que se encuentra ubicada entre la avenida del Poeta y la avenida del Libertador, en la zona sur de la ciudad de La Paz a 16°30'42" latitud Sur y

68°07'10.0" longitud Oeste. La Figura 9 y 10 muestran imágenes satelitales del punto de muestreo y toma de muestra.

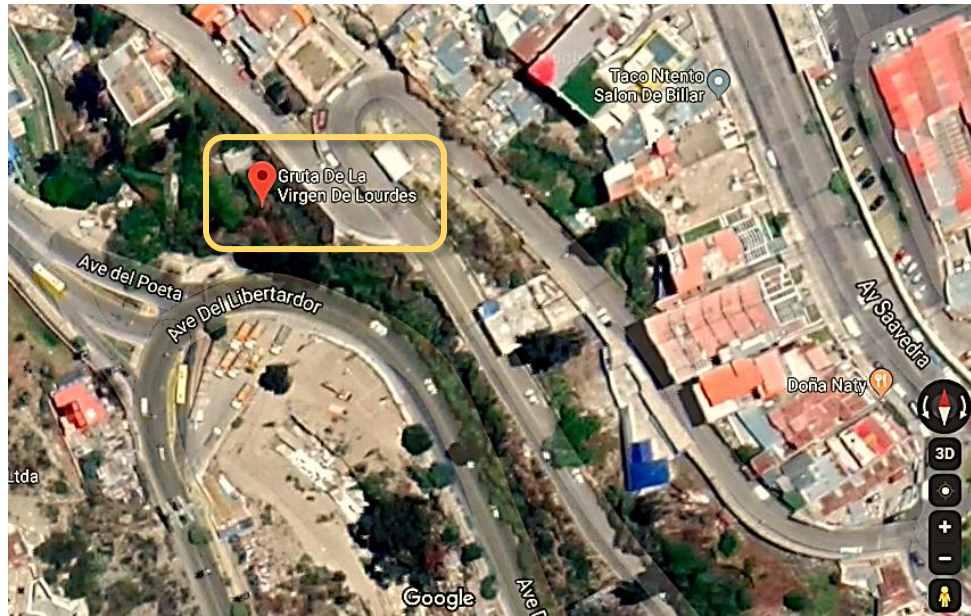


FIGURA 9 Zona de la toma de muestra

Fuente: Google Maps



FIGURA 10 Toma de la muestra de agua natural

3.2.2. AGUA RESIDUAL

Las aguas residuales son cualquier tipo de agua cuya calidad se vio afectada negativamente por influencia antropogénica. Las aguas residuales incluyen las aguas usadas, domésticas, urbanas y los residuos líquidos industriales o mineros eliminados, o las aguas que se mezclaron con las anteriores (aguas pluviales o naturales). (WIKIPEDIA c. d., 2019)

3.2.2.1. Río Seco, ciudad de El Alto

El Río seco es uno de los ríos más importantes de la Ciudad de El Alto, se inicia en los nevados del Huayna Potosí y recorre cinco Distritos: 9, 6, 5, 4 y 3, atravesando un total de 23 zonas; prácticamente cruza toda el área urbana hasta llegar a la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Puchuckollo (Figura 11); posteriormente el agua retornará a río Seco, para luego unirse al río Pallina y seguidamente al río Katari para finalmente desembocar en la Bahía de Cohana. Se caracteriza por permanecer con poco caudal de agua durante el año, sin embargo su riesgo para la población se multiplica en gran manera en las épocas de lluvia, debido a la presencia de inundaciones que afectan a diferentes zonas; y el relave de toda la contaminación depositada en este cuerpo de agua recorrerá río abajo hasta llegar a la Bahía de Cohana. (APAZA, 2011)

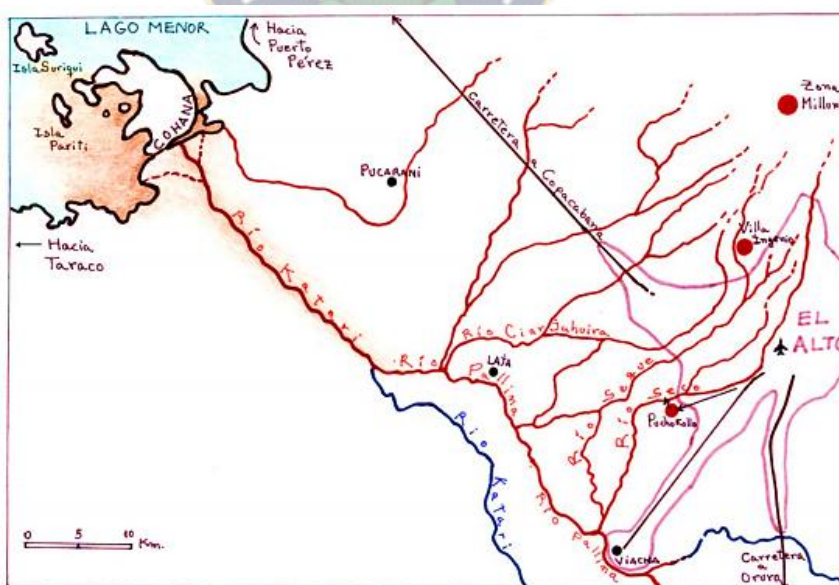


FIGURA 11 Mapa Hidrográfico mostrando el curso natural del Río Seco

Fuente: (Arismendi, 2011)

Se puede observar que sus aguas superficiales son víctimas de contaminación urbana con aguas residuales domésticas, contaminación por uso comercial del agua (lavado y engrase de autos), contaminación industrial y otros. Por tal situación se recolectaron tres muestras del curso de agua del Río Seco que atraviesa la zona Mercedario del distrito 4 de la ciudad de El Alto, donde hay actividad industrial de curtiembres artesanales que vierten sus efluentes al río. La Figura 12 muestra una imagen satelital de los puntos de muestreo.

- Punto 1 ($16^{\circ}30'42.2908''$; $68^{\circ}07'10.1784''$)
- Punto 2 ($16^{\circ}30'42.2908''$; $68^{\circ}07'10.1784''$)
- Punto 3 ($16^{\circ}30'42.2908''$; $68^{\circ}07'10.1784''$)



FIGURA 12 Puntos de Muestro en el Río Seco, Distrito 4 Ciudad de El Alto

Fuente: Elaborado en Google Maps



FIGURA 13 Vista de la situación de contaminación del Río Seco, Distrito 4

La Figura 13 y 14 muestran el estado de contaminación del río y la toma de muestra.



FIGURA 14 Toma de la muestra de agua residual

3.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

El protocolo de muestreo es un proceso específico, diseñado a través de nuestra experiencia del muestreo en campo y se sigue para aprovechar al máximo el tiempo de trabajo, sabiendo con anticipación lo que se va a realizar en la salida de campo. El apropiado muestreo y medición de campo de ciertos parámetros fisicoquímicos son críticos para determinar resultados de alta calidad y una interpretación confiable de datos. (CONDE, 2018)

Para iniciar el muestreo se debe preparar todos los materiales y equipos necesarios:

- Botellas para muestras, debidamente rotulados.
- Hoja para tomar datos.
- Contenedor para las muestras
- pH- metro y Multiparámetro de campo.
- Etiquetas.
- Cinta adhesiva.
- GPS

La localización del sitio de muestreo debe ser registrada con tanta precisión como sea posible, usando un sistema de posicionamiento global (GPS), se debe indicar puntos de referencia cercanos al punto de muestreo, si los hay, para luego proceder a las mediciones fisicoquímicos como la conductividad, temperatura, pH y otros.

Según los análisis que vayan a realizarse se definirá el tipo de envase a utilizar. El mismo estará en función de la cantidad de muestra a tomar y de la necesidad de dejar (en análisis microbiológicos) o no (en la mayoría de los análisis) una cámara de aire, o un espacio para mezclas o para el agregado de algún reactivo que permita la conservación de la muestra. En la Figura 15 se muestra los diferentes tipos de envase que se deben utilizar para distintas fines.

| Parámetro | Tipo de Frasco | Volumen de Muestra | Preservación | Tiempo de Almacenamiento |
|------------------------|----------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
| Enteroparásitos | | | | |
| Agua Residual Cruda | P | 1 L | Refrigerar a 4°C | 24 horas |
| Agua Residual Tratada | P | 5 L | | |
| Agua Superficial | P | 5 L | | |
| Agua Potable | P | 10 L | | |
| Lodos | B | 200 g | | 3 días |
| Fitoplancton** | | | | |
| Aguas Eutróficas | P | 1 L | Temperatura Ambiente | 24 horas |
| Aguas Oligotróficas | P | 6 L | | |
| Zooplancton | | | | |
| Aguas Eutróficas | P | 1 L | Temperatura Ambiente | 24 horas |
| Aguas Oligotróficas | P | 6 L | | |

P: Plásticos

V: Vidrio

B: Bolsa de plástico sellado

NMP: Numero más Probable

A/P: Ausencia / Presencia

FIGURA 15 Tipos de envase, preservación de diferentes muestras ambientales

Fuente: (Saénz, 2015)

3.3.1. Tipos de muestras

- **Muestras simples:** Son las que se toman en un tiempo y lugar determinado para su análisis individual.
- **Muestras compuestas:** Son obtenidas por mezcla y homogenización de muestras simples recogidas en el mismo punto y diferentes tiempos.
- **Muestras integradas:** Son obtenidas por mezcla y homogenización de muestras simples recogidas en puntos diferentes y simultáneamente.

3.3.2. Conservación de la muestra

En el presente trabajo se tomaron muestras simples, para la determinación de los siguientes parámetros:

- Alcalinidad total
- Cationes mayoritarios
- Aniones mayoritarios
- Cromo (VI)

Cada envase utilizado se enjuagó tres veces con la muestra antes de tomar el volumen final, los envases se trasladaron y se mantuvieron bien sellados y etiquetados en el contenedor de muestras con contenido de hielo para mantener las muestras a temperaturas bajas, en el laboratorio se almacenan a 4 °C. De acuerdo a los parámetros que se vayan a determinar la muestra se preserva de diferente forma. En el caso de cationes mayoritarios se preserva con ácido nítrico previa filtración por 0,45 µm , las muestras para la determinación de aniones mayoritarios se filtran por 0,45 µm y se congelan analizándolas en el menor tiempo posible, las muestras para el análisis de alcalinidad se analizan de inmediato sin necesidad previa de filtración y por último para la determinación de Cr (VI) las muestras deben ser filtradas y preservadas durante las primeras 24 horas con el procedimiento explicado en adelante para tal caso.

3.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Se realizó el estudio de parámetros físico-químicos de las matrices de agua natural y residual donde se determinaron: pH, temperatura, conductividad eléctrica, alcalinidad total, cationes mayoritarios, aniones mayoritarios. Se utilizaron los siguientes métodos:

- pH: Determinación potenciométrica, in situ.
- Conductividad eléctrica: Determinación conductimétrica, in situ.
- Oxígeno disuelto: Determinación electrométrica, in situ.
- Alcalinidad: Titulación potenciométrica.
- Cationes mayoritarios: Espectroscopia de Absorción Atómica con llama
- Aniones mayoritarios: Cromatografía Iónica

3.5. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Los equipos, materiales y reactivos utilizados durante el desarrollo del proyecto son los que muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1 Equipos y materiales utilizados en el desarrollo del proyecto.

| EQUIPO | CARACTERÍSTICAS | UBICACIÓN |
|------------------------------------|----------------------------|---|
| Espectrofotómetro UV-VIS | GENESYS 10S UV-VIS | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Espectrofotómetro UV-VIS | SPECTROQUANT® PHARO 300 | Laboratorio de Productos Naturales CCQ-UMSA |
| Balanza analítica | SPAN | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| pH-metro | HACH | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Multiparámetro | HACH | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Espectrómetro de Absorción Atómica | PERKIN ELMER ANALYST 200 | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Cromatógrafo de Iones | THERMO SCIENTIFIC ICS-1100 | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| MATERIALES | CARACTERÍSTICAS | UBICACIÓN |
| 2 Matraces aforados de 1000 MI | Tipo A | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| 1 Matraz aforado de 500 MI | Tipo A | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| 1 Matraz aforado de 250 MI | Tipo A | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| 1 Matraz aforado de 100 mL | Tipo A | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |

| MATERIALES | CARACTERÍSTICAS | UBICACIÓN |
|--|------------------------|---|
| 12 Matraces aforados de 25 mL | Tipo A | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| 12 Vasos de precipitados de 50 mL | Pyrex | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Micro pipeta de 100 μ L | EPPENDORF | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Micro pipeta de 1000 μ L | EPPENDORF | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Micro pipeta de 5000 μ L | EPPENDORF | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Puntas para micropipetas de 100, 1000 y 5000 μ L | EPPENDORF | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |
| Bureta de 50 mL | Tipo A | Laboratorio de Química Ambiental CCQ – UMSA |

Tabla 2 Reactivos utilizados en el desarrollo del trabajo

| REACTIVOS | CARACTERÍSTICAS | APLICACIÓN |
|--------------------------------------|---|---|
| Dicromato de potasio p.a. | NIST (Standard Reference Material) 935a | Verificación del espectrofotómetro UV-VIS, curva de Calibración |
| Sulfato de cobre pentahidratado p.a. | FISCHER SCIENTIFIC COMPANY | Verificación del espectrofotómetro UV-VIS |
| Ácido fosfórico concentrado p.a. | EMSURE ISO | Preparación de la muestra |
| Ácido sulfúrico concentrado p.a. | EMSURE ISO | Preparación de la muestra |

| REACTIVOS | CARACTERÍSTICAS | APLICACIÓN |
|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 1,5 Difenilcarbazida (DPC) p.a. | FISCHER SCIENTIFIC COMPANY | Preparación de la muestra |
| Acetona p.a. | MERCK | Preparación del DPC |
| Sulfato de Amonio p.a. | MERCK | Preparación de la solución tampón |
| Hidróxido de Amonio | MERCK | Preparación de la solución tampón |
| Hidróxido de Sodio | FISCHER SCIENTIFIC COMPANY | Conservación de la muestra |
| Cloruro de Sodio | FISCHER SCIENTIFIC COMPANY | Pruebas de conductividad |

3.6. METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.6.1. VERIFICACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO GENESYS 10S

UV-VIS

3.6.1.1. Evaluación de la exactitud de Longitud de onda

La evaluación de la exactitud de longitud de onda se la realizó con el estándar de la NIST, SRM 935a, que consta de cristales de dicromato de potasio que tiene una pureza del 99,97% el cual es estable indefinidamente. (NIST, 2000).

El uso de 935a SRM requiere una cuidadosa preparación de las soluciones de la fracción de masa conocida, en ácido perclórico 0,001 N. No se requiere secado en la preparación del uso de este material y debe utilizarse a medida que se lo necesite. Todas las soluciones de dicromato de potasio se preparan, y se expresan, sobre una base de fracción de masa. Cada solución se prepara individualmente. Se preparó un blanco de disolvente diluyendo 1 mL de 1 N de ácido perclórico a 1 L con agua desionizada.

Para verificar la exactitud de longitud de onda se preparó por pesada una solución de 40 mg/kg y se realizó un barrido espectral por triplicado durante una semana, los valores obtenidos para los máximos y mínimos de absorción se comparan con valores de referencia que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Valores de longitud de onda de referencia, del espectro de absorción de la solución de Dicromato de potasio 0,040 mg/kg en ácido perclórico 0,001 N.

| Valores de Referencia | |
|-----------------------|-----------|
| Longitud de Onda | λ |
| Valle | 235 |
| Pico | 257 |
| Valle | 313 |
| Pico | 350 |

Fuente: (R.W. Burke and R. Mavrodineanu, 1977)

3.6.1.2. Evaluación de la exactitud fotométrica en el rango Visible

Se hizo la evaluación de la exactitud fotométrica en el rango Visible porque es la región de trabajo, para ello se preparó una solución de Sulfato de Cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en ácido sulfúrico.

Se disolvió en un vaso de precipitado 20,0 g del sulfato de cobre pentahidratado de una pureza del 99,9% en suficiente agua desionizada y se adicionó con cuidado 10 mL de ácido sulfúrico concentrado p.a. y se trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 1 L, se enrasó al aforo con agua desionizada.

Se realizó la lectura de esta solución a 4 diferentes longitudes de onda simultáneamente por triplicado durante una semana, los valores obtenidos se comparan con valores de referencia. Esta verificación es útil para el rango de 400-800 nm.

En la Tabla 4 se muestran los valores de referencia establecidos:

Tabla 4 Absorbancias de referencia de la solución de Sulfato de cobre pentahidratado 0,08 mol/L en ácido sulfúrico.

| Valor de referencia | |
|---------------------|-------------|
| λ | Absorbancia |
| 600 | 0,068 |
| 650 | 0,224 |
| 700 | 0,527 |
| 750 | 0,817 |

Fuente: (VI IBEROLAB, 2015)

3.6.2. DETERMINACIÓN DE CR (VI) POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Con este procedimiento se mide únicamente el cromo hexavalente, la reacción de éste con la difenilcarbazida es una reacción redox en la cual el Cr (VI) se reduce a cromo trivalente y el reactivo se oxida a difenilcarbazona en solución ácida, es éste compuesto el que forma el complejo de color rojo-violeta con el cromo trivalente naciente que absorbe a 540 nm que se muestra en la Figura 16. (Gloria Heredia, et al., 2013)

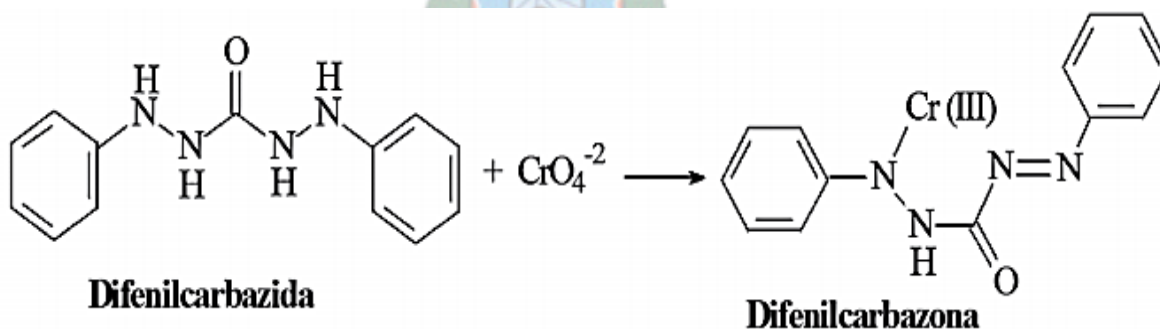


FIGURA 16 Reacción de la difenilcarbazida con el Cr (VI)

Fuente: (Gloria Heredia, et al., 2013)

3.6.2.1. Interferencias del método

- La reacción con la difenilcarbazida es prácticamente específica para el Cr^{+6} . Las sales de molibdeno hexavalente y de mercurio reaccionarán para formar color con el reactivo, pero las intensidades son mucho más bajas que para el cromo hexavalente al pH especificado. Pueden tolerarse concentraciones de hasta 200 mg/L de Molibdeno o hasta 200 mg/L de Hg.
- El molibdeno, vanadio y cobre en la muestra pueden causar interferencias. El vanadio interfiere fuertemente, sin embargo en concentraciones de hasta 10 veces las del Cr^{+6} no causará problemas.
- Se han identificado muestras de matrices diferentes, las cuales producen un complejo de color amarillo-naranja que interfiere con la medición. En este caso el analista debe evaluar el efecto de la matriz con muestras adicionadas.
- Las interferencias de color y turbiedad pueden contrarrestarse con un blanco de muestra. Éste debe prepararse igual que la muestra pero sin adicionar la 1,5 difenilcarbazida, la absorbancia del blanco de muestra se resta a la de la muestra. (NORMA MEXICANA, 2015)

3.6.2.2. Preparación de la Solución Tampón

Para la solución tampón se disolvió 16,50 g de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en aproximadamente 40 mL de agua desionizada, enseguida se añadió 3,25 mL de hidróxido de amonio (NH_4OH) y se diluyó a 50 mL.

3.6.2.3. Preparación de la Difenilcarbazida

La disolución de difenilcarbazida (DPC) se preparó al 0,5 % m/v y se disolvió en acetona p.a. para cada prueba se utilizó una solución de DPC recién preparada en cada caso sólo se preparó la cantidad necesaria para el análisis.

3.6.2.4. Preparación de las soluciones para la curva de calibración

Inicialmente se preparó una solución madre de 500 mg/L de Cr (VI) a partir de cristales de Dicromato de potasio $(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)$ utilizando el SRM 935a mencionado anteriormente,

que cuenta con una pureza del 99,97% y el cual para su uso no necesita de un secado previo.

Para preparar la solución madre de Cr (VI) se pesó 141,4 mg de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en un vaso de precipitado el cual se disolvió y aforó con agua desionizada, posteriormente se trasvaso la solución más sus lavados a un matraz aforado de 100 mL. De la solución madre se extrae 1 mL que se transfirió inmediatamente a un matraz aforado de 100 mL y se disolvió con agua desionizada hasta el aforo, obteniendo así una concentración en Cr (VI) de 5 mg/L.

Después se preparó a partir de la solución de 5 mg Cr (VI)/L, seis estándares para la curva de calibración, de las siguientes concentraciones teóricas 0,040 – 0,060 – 0,080 – 0,100 – 0,150 – 0,250 mg Cr (VI)/L. Estas soluciones fueron aforadas en matraces de 25 mL con agua desionizada y al seguir el procedimiento de desarrollo de color sufren una dilución al realizar las correcciones necesarias se obtienen los valores reales de concentración que son: 0,039 – 0,059 – 0,078 – 0,098 – 0,147 – 0,245 mg Cr (VI)/L.

3.6.2.5. Tratamiento de la muestra para la determinación de Cr (VI)

Una vez recolectadas las muestras se siguió con el procedimiento establecido en el método 3500-Cr D (APHA-AWWA-WPCF, 2012) para el tratamiento de la muestra que se detalla a continuación:

- Se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 μ m.
- Para preservar las muestras se ajustó el pH entre 9,3 y 9,7 mediante la adición de 1 mL de solución tampón de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$)/hidróxido de amonio (NH_4OH) y la cantidad necesaria de solución de Hidróxido de sodio ($NaOH$) 5N o 1N, por 100 mL de muestra.
- Este procedimiento de preservación debe realizarse dentro de las primeras 24 horas, una vez preservadas las muestras pueden ser analizadas dentro de 28 días después de la recolección y deben ser almacenadas a 4°C, en caso de no ajustar el pH al rango necesario, se debe analizar dentro de las primeras 24 horas desde su recolección.

Para la determinación de Cr (VI) se tomó una alícuota 20 mL de muestra y se siguió el procedimiento para el desarrollo de color y para expresar la concentración hacer una corrección para 25.5 mL.

3.6.2.6. Desarrollo de color y medición

En el presente trabajo se realiza una adecuación del método colorimétrico para la determinación de Cr (VI) 3500-Cr D (APHA-AWWA-WPCF, 2012). Se sigue un mismo procedimiento para el desarrollo de color en los estándares y muestras, los cuales deben estar a temperatura ambiente antes del análisis. A continuación se detalla los pasos a seguir:

- Añadir 1 gota de ácido fosfórico concentrado.
- Añadir 3 mL de ácido sulfúrico 0,2 N para ajustar la solución a $\text{pH } 2,0 \pm 0,5$ aforar a 25 mL con agua desionizada y agitar.
- Añadir 0,5 mL de solución de difenilcarbazida, mezclar y dejar reposar 15 minutos para el desarrollo de color.
- Transferir una cantidad adecuada de la solución a una celda de 1 cm y medir su absorbancia a 540 nm, usando agua de reactivo como referencia. A partir de la absorbancia corregida, determinar el cromo Cr (VI) presente por referencia a la curva de calibración.

Se trabajó con matraces aforados de 25 mL y se debe realizar una corrección de concentración debida a la cantidad añadida de DPC después del aforo tanto en los estándares como en las muestras.

3.6.3. DETERMINACIÓN DEL RANGO ÓPTIMO DE pH PARA EL DESARROLLO DEL COMPLEJO Cr (VI)-DPC

La reacción del Cr (VI) con el DPC debe realizarse en medio ácido. El rango de pH establecido en el procedimiento usado es de $2,0 \pm 0,5$. Para comprobar que éste sea el rango óptimo de pH y estudiar si existe la formación del complejo a valores más altos de pH se prepararon ocho réplicas del estándar de concentración 0,098 mg (VI)/L a

diferentes valores de pH. Se ajustó el pH con ácido fosfórico concentrado y solución de ácido sulfúrico 0.2 N.

3.6.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CONDUCTIVIDAD SOBRE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO Cr (VI)-DPC

Debido a que la conductividad de muestras de aguas residuales es alta, se evaluó la formación del complejo a diferentes valores de conductividad. Se preparó tres réplicas del estándar de concentración 0,098 mg (VI)/L a diferentes valores de conductividad. Se ajustó el valor de conductividad con una solución de cloruro de sodio (NaCl) 0,01 M.

3.6.5. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO Cr (VI)-DPC

Para la formación del complejo entre el Cr (VI) y el DPC se debe esperar un lapso de tiempo, que en las diferentes bibliografías señalan un tiempo de espera de 5 a 15 minutos, para determinar el tiempo óptimo para la formación del color se realizó un estudio de cinética en tres niveles de concentración (0,020 – 0,078- 0,245) mg/L durante 60 minutos.

3.6.6. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD

Para determinar la linealidad del método se realizó los siguientes procedimientos:

- Se prepararon seis curvas de calibración de un rango de concentración (0.039 – 0.245 mg/L), con el objetivo de obtener un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,999.
- Se consideró los criterios de evaluación del parámetro de linealidad y se realizó seis réplicas en cada nivel de concentración preparadas de forma independiente con lecturas por triplicado.
- Se evaluó la presencia de valores anómalos con el test de Grubbs, se calculó el coeficiente de correlación, intercepto y pendiente y se evaluó los resultados con el test de Cochran y la prueba T-student para el coeficiente de correlación y comprobar que existe correlación en los resultados obtenidos al Nivel de Confianza del 95%.

3.6.7. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación mediante dos métodos los cuales son:

- Tomando en cuenta los datos del estudio de linealidad se usó las ecuaciones 14 y 15.
- Mediante la evaluación de muestras blanco, se preparó siete réplicas y se hizo la lecturas por triplicado se determinó los resultados con las ecuaciones 10 y 11.

3.6.8. DETERMINACIÓN DE LA SELECTIVIDAD

La selectividad del método se evaluó en la matriz de agua natural y agua residual en cada caso se utilizó un procedimiento específico que se detalla a continuación.

3.6.8.1. Selectividad en Agua natural

La muestra de agua natural se recolecto como se mencionó anteriormente de la vertiente de la gruta de la Virgen de Lourdes que se encuentra ubicada entre la avenida del Poeta y la avenida del Libertador, en la zona sur de la ciudad de La Paz. En la cual se determinó que no hay presencia de Cr (VI).

Cómo la matriz no tiene presencia del analito se preparó dos grupos de muestras de prueba, una con matriz y otra sin matriz, en dos niveles de concentración (0,098 y 0,245 mg Cr (VI)/L), en cada nivel se prepararon 3 réplicas individuales con lecturas por triplicado.

Para evaluar la selectividad en esta matriz se realizó el test F que evalúa la homogeneidad de varianzas y el test T-student para comparación de medias al Nivel de confianza del 95%.

3.6.8.2. Selectividad en Agua residual

La muestra de agua residual se recolecto del curso de agua del Río Seco en los puntos mencionados. En la cual se determinó que si hay presencia de Cr (VI) por la actividad de curtiembres artesanales en cercanías del río.

Debido a que en la matriz hay presencia del analito, la selectividad es validada por la comparación de las pendientes de las curvas de adición de patrón, de la siguiente forma: Se preparó dos grupos de muestras con la misma adición de analito para cada nivel de concentración. Un grupo contiene la matriz de agua residual y otro grupo no incluye la matriz, preparando tres réplicas en cada nivel de concentración para el grupo que contiene la matriz de agua residual y para el grupo que no contiene la matriz se usó los datos del estudio de linealidad.

Para la verificación se realizó una prueba T-student para comparación de inclinaciones al Nivel de confianza del 95%.

3.6.9. DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN

La precisión del método se evaluó en condiciones de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad en cada caso se detalla el procedimiento a continuación:

Para la determinación de la repetibilidad se consideró misma muestra, método, laboratorio, reactivos, condiciones ambientales, diferentes días y el mismo analista. Se comparó los resultados obtenidos para el nivel de concentración de 0,245 mg Cr (VI)/L, para la verificación se realizó una prueba F (Fischer) al Nivel de confianza del 95%.

Para la determinación de la precisión intermedia se consideró misma muestra, método, laboratorio, reactivos, condiciones ambientales, diferentes días y dos analistas. Se comparó los resultados obtenidos para el nivel de concentración de 0,245 mg Cr (VI)/L, para la verificación se realizó una prueba F (Fischer) al Nivel de confianza del 95%.

Para la condición de reproducibilidad se comparó los resultados obtenidos para la curva de calibración en dos equipos de diferentes laboratorios: Laboratorio de Química Ambiental y Laboratorio de Productos Naturales del CCQ-UMSA, utilizando el mismo método, reactivos, condiciones ambientales, diferentes días y mismo analista

Para la verificación se realizó una prueba T-student para comparación de inclinaciones de las rectas obtenidas en los dos equipos al Nivel de confianza del 95%.

3.6.10. DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD

Debido a la imposibilidad de disponer de un MRC de Cr (VI), y aunque de menor jerarquía metrológica se efectuaron ensayos de recuperación con agregados de patrón de concentración 0,059 mg Cr (VI)/L sobre dos muestras recolectadas del Río Seco el análisis se realizó por triplicado.

Se calculó el porcentaje de recuperación de las muestras con la ecuación 24 y se comparó con los valores establecidos por la AOAC que establece un rango del 80-110% de recuperación para determinaciones a nivel de concentración de mg/L. (TOLA, 2016)

3.6.11. DETERMINACIÓN DE LA ROBUSTEZ

En el estudio de Robustez se procede a desafiar al método realizando variaciones al proceso analítico y evaluando el efecto de tales variaciones sobre la exactitud del método. Se aplicó el diseño experimental de Plackett-Burman en el que se desarrollan ocho experimentos para evaluar el efecto de siete variables o menos.

Las variables tomadas en consideración fueron:

- Tiempo de reacción del Cr (VI) y el DPC
- Analista
- Presencia de ácido fosfórico
- Volumen de ácido sulfúrico
- Volumen de DPC

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. VERIFICACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS (GENESYS 10S)

4.1.1. Evaluación de la Exactitud de Longitud de onda

Se determinó la exactitud de longitud de onda con el SRM 935a, comparando los resultados experimentales con los valores de referencia como se observa en la tabla 5.

Tabla 5 Datos experimentales de la solución de Dicromato de potasio 0,040 mg/L preparada con el SRM 935a.

| Promedio λ | Error absoluto E | Error relativo %E |
|-----------------------|---------------------|----------------------|
| 234 | 1 | 0,426 |
| 257 | 0 | 0,000 |
| 313 | 0 | 0,000 |
| 350 | 0 | 0,000 |

Fuente: Elaboración propia

4.1.2. Evaluación de la exactitud fotométrica en el rango Visible

Se determinó la exactitud fotométrica con la solución de Sulfato de cobre pentahidratado, comparando los valores experimentales con los valores de referencia que se encuentran en la tabla 6.

Tabla 6 Datos experimentales de la solución de Sulfato de cobre pentahidratado

| Longitud de onda | Promedio | Error relativo |
|------------------|-------------|----------------|
| λ | Absorbancia | %E |
| 600 | 0,062 | 9,150 |
| 650 | 0,206 | 7,937 |
| 700 | 0,477 | 9,572 |
| 750 | 0,748 | 8,391 |

Fuente: Elaboración propia

4.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE CR (VI)

4.2.1. Variación del pH

Se prepararon soluciones del estándar de 0,098 mg Cr (VI)/L a diferentes valores de pH y se comprobó que el rango óptimo para la formación del complejo de Cr (VI)-DPC es de $2 \pm 0,5$. En la Tabla 7 se muestran los valores obtenidos y en la Figura 17 se observa el gráfico obtenido.

Tabla 7 Valores de absorbancia del estándar de 0,098 mg Cr (VI)/L a diferentes valores de pH.

| 0,098 mg Cr (VI)/L | |
|--------------------|-------------|
| pH | Absorbancia |
| 1,44 | 0,08 |
| 1,68 | 0,096 |
| 1,85 | 0,101 |
| 2,37 | 0,092 |
| 3,08 | 0,063 |
| 4,04 | 0,009 |
| 5,13 | 0,005 |
| 7,60 | 0,002 |

Fuente: Elaboración propia

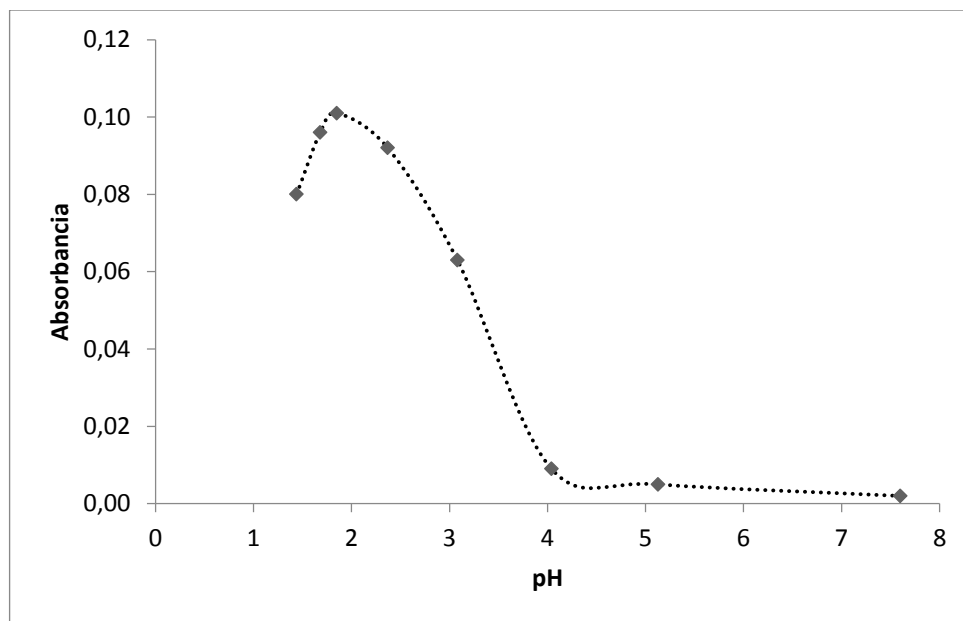


FIGURA 17 Formación del complejo Cr (VI)-DPC a diferentes valores de pH

Fuente: Elaboración propia

4.2.2. Variación de la Conductividad

Para determinar si la conductividad afecta a la formación del complejo de Cr (VI)-DPC, se preparó el estándar de 0,098 mg Cr (VI)/L a tres valores de conductividad, no se afecta la formación del complejo, pero a altos valores de conductividad existe mayor error como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8 Resultados experimentales de la variación de la conductividad

| 0,098 mg Cr(VI)/L | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------|-------|-------|----------|----------------|----------------------|
| Conductividad $\mu\text{S/cm}$ | Absorbancias | | | Promedio | mg Cr(VI)/L | Error relativo %E |
| 125,6 | 0,083 | 0,080 | 0,083 | 0,082 | 0,095 | 3,45 |
| 504,0 | 0,089 | 0,088 | 0,088 | 0,088 | 0,102 | 4,44 |
| 1168 | 0,092 | 0,090 | 0,093 | 0,092 | 0,106 | 8,60 |

Fuente: Elaboración propia

4.2.3. Tiempo de reacción del complejo Cr (VI)-DPC

Se realizó pruebas de cinética de reacción en tres niveles de concentración para determinar el tiempo de espera para la formación del complejo de Cr (VI)-DPC y también observar por cuanto tiempo el complejo es estable, los datos obtenidos se muestran en el Anexo 9 y los gráficos obtenidos se presentan en las Figuras 18,19 y 20.

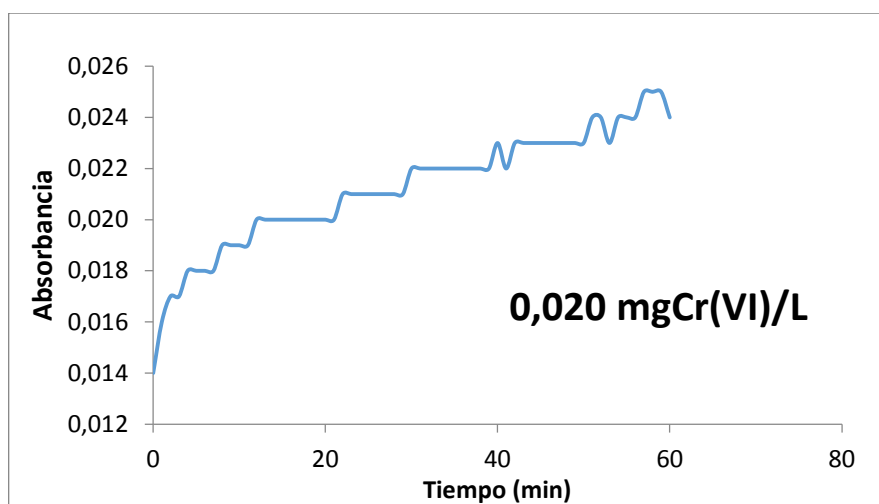


FIGURA 18 Cinética de reacción de la solución de 0,020 mg Cr (VI)/L

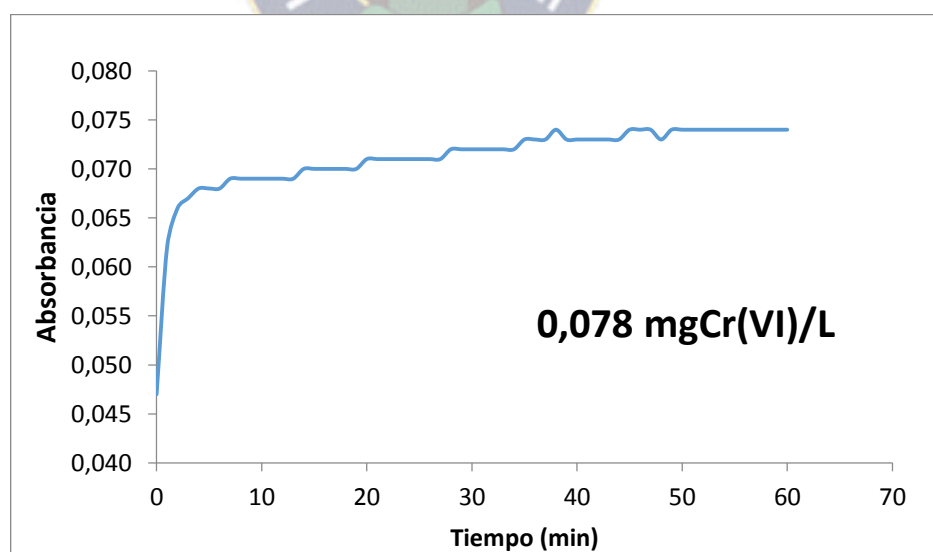


FIGURA 19 Cinética de reacción de la solución de 0,078 mg Cr (VI)/L

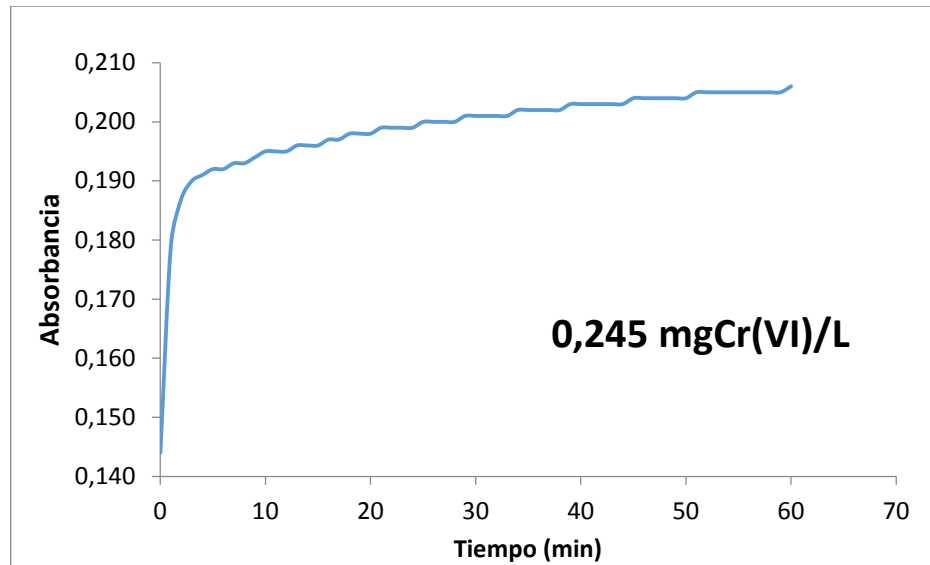


FIGURA 20 Cinética de reacción de la solución de 0,245 mg Cr (VI)/L

Se puede observar que el tiempo promedio para el desarrollo del color es de 12-15 min y que el complejo es estable por unos 40 minutos después de la formación del complejo como se observa en la Figura 21.

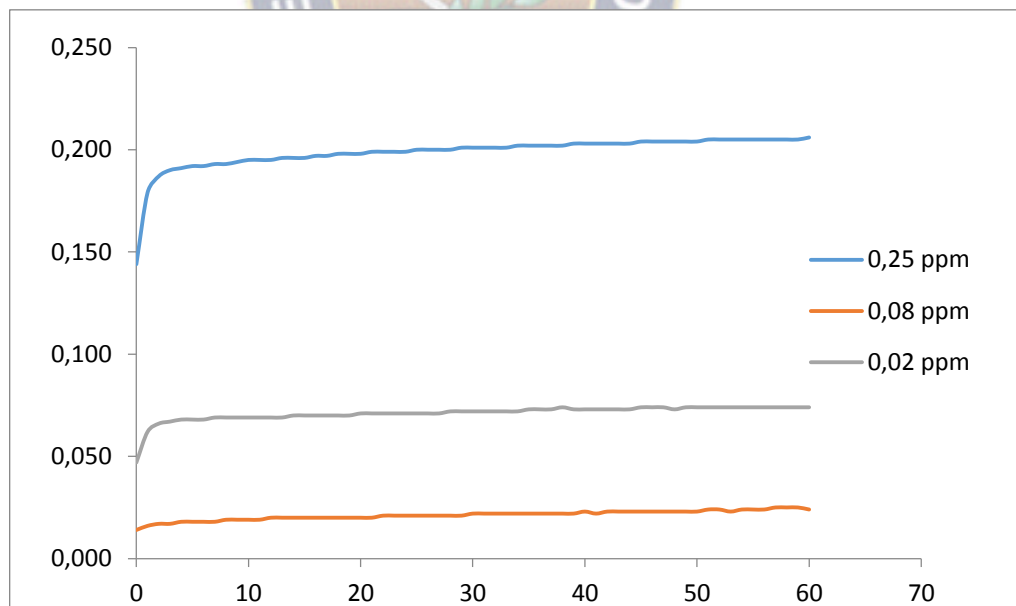


FIGURA 21 Cinética de reacción de los tres niveles de concentración estudiados.

4.3. PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

4.3.1. Linealidad

Para la evaluación de la linealidad se prepararon soluciones de siete concentraciones (0,020-0,040-0,060-0,080-0,100-0,150-0,250) mg Cr (VI)/L a seis réplicas individuales por cada concentración y lecturas por triplicado, a estas soluciones se agregan 0,5 mL de DPC se agita y se espera 15 min para leer a una longitud de onda de 540 nm. Se corrigen las concentraciones por efecto de la dilución.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 9 Datos experimentales para determinar la linealidad del sistema

| Concentración mg Cr(VI)/L | Absorbancia | | | Promedio Parcial | Promedio Total | Desviación Estándar (S) | CV |
|------------------------------|-------------|-------|-------|---------------------|-------------------|-------------------------------|--------|
| 0,020 | 0,019 | 0,020 | 0,019 | 0,019 | 0,023 | 0,005 | 20,165 |
| | 0,024 | 0,024 | 0,024 | 0,024 | | | |
| | 0,032 | 0,030 | 0,030 | 0,031 | | | |
| | 0,018 | 0,018 | 0,019 | 0,018 | | | |
| | 0,025 | 0,026 | 0,025 | 0,025 | | | |
| | 0,020 | 0,020 | 0,021 | 0,020 | | | |
| 0,039 | 0,038 | 0,037 | 0,037 | 0,037 | 0,039 | 0,004 | 9,241 |
| | 0,039 | 0,039 | 0,039 | 0,039 | | | |
| | 0,045 | 0,041 | 0,041 | 0,042 | | | |
| | 0,035 | 0,035 | 0,034 | 0,035 | | | |
| | 0,045 | 0,045 | 0,042 | 0,044 | | | |
| | 0,036 | 0,036 | 0,037 | 0,036 | | | |
| 0,059 | 0,055 | 0,053 | 0,053 | 0,054 | 0,055 | 0,005 | 8,293 |
| | 0,052 | 0,050 | 0,052 | 0,051 | | | |
| | 0,057 | 0,057 | 0,056 | 0,057 | | | |

| | | | | | | | |
|--------------|-------|-------|-------|--------------|--------------|-------|-------|
| | 0,052 | 0,052 | 0,049 | 0,051 | | | |
| | 0,066 | 0,063 | 0,060 | 0,063 | | | |
| | 0,053 | 0,053 | 0,052 | 0,053 | | | |
| 0,078 | 0,070 | 0,068 | 0,069 | 0,069 | 0,074 | 0,006 | 8,350 |
| | 0,072 | 0,070 | 0,072 | 0,071 | | | |
| | 0,088 | 0,085 | 0,084 | 0,086 | | | |
| | 0,074 | 0,075 | 0,076 | 0,075 | | | |
| | 0,075 | 0,076 | 0,075 | 0,075 | | | |
| | 0,069 | 0,070 | 0,069 | 0,069 | | | |
| 0,098 | 0,090 | 0,085 | 0,085 | 0,087 | 0,091 | 0,006 | 6,327 |
| | 0,100 | 0,097 | 0,100 | 0,099 | | | |
| | 0,097 | 0,092 | 0,092 | 0,094 | | | |
| | 0,087 | 0,088 | 0,081 | 0,085 | | | |
| | 0,094 | 0,095 | 0,094 | 0,094 | | | |
| | 0,085 | 0,085 | 0,086 | 0,085 | | | |
| 0,147 | 0,129 | 0,126 | 0,125 | 0,127 | 0,131 | 0,005 | 3,432 |
| | 0,131 | 0,129 | 0,131 | 0,130 | | | |
| | 0,140 | 0,133 | 0,133 | 0,135 | | | |
| | 0,137 | 0,132 | 0,129 | 0,133 | | | |
| | 0,135 | 0,136 | 0,138 | 0,136 | | | |
| | 0,125 | 0,125 | 0,126 | 0,125 | | | |
| 0,245 | 0,205 | 0,202 | 0,201 | 0,203 | 0,209 | 0,004 | 2,021 |
| | 0,210 | 0,207 | 0,210 | 0,209 | | | |
| | 0,216 | 0,211 | 0,211 | 0,213 | | | |
| | 0,214 | 0,209 | 0,206 | 0,210 | | | |
| | 0,215 | 0,213 | 0,213 | 0,214 | | | |
| | 0,205 | 0,205 | 0,206 | 0,205 | | | |

Fuente: Elaboración propia

A partir de los resultados obtenidos se puede observar que el primer nivel de concentración (0,020 mg Cr (VI)/L) tiene un coeficiente de variación de **20,165%**

mayor al 10% que se considera como aceptable en el presente trabajo. Por lo cual se decide eliminar ese nivel de concentración en adelante.

4.3.1.1. Evaluación de los resultados experimentales con el Test de Grubbs (G-test)

Para identificar y eliminar la presencia de valores anómalos se realizó el test de Grubbs, hallando el estadístico G con la ecuación 4 y los resultados se muestran en la Tabla 10.

$$G_{1,0} = \frac{|X_0 - \bar{X}|}{S}$$

Tabla 10 Datos experimentales de absorbancia para cada nivel de concentración. Cálculo del estadístico (G).

| Concentración mg Cr(VI)/L | Promedios Parciales de Absorbancia | Promedio Total | Desviación Estándar | G calculado | G tablas | Evaluación Ccal<Ctab |
|------------------------------|--|-------------------|------------------------|----------------|-------------|-------------------------|
| 0,039 | 0,037 | 0,039 | 0,004 | 0,448 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,039 | | | 0,015 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,042 | | | 0,942 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,035 | | | 1,189 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,044 | | | 1,405 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,036 | | | 0,726 | 1,887 | ACEPTADO |
| 0,059 | 0,054 | 0,055 | 0,004 | 0,213 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,051 | | | 0,771 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,057 | | | 0,505 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,051 | | | 0,851 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,062 | | | 1,782 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,053 | | | 0,452 | 1,887 | ACEPTADO |
| 0,078 | 0,069 | 0,074 | 0,006 | 0,851 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,071 | | | 0,475 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,086 | | | 1,836 | 1,887 | ACEPTADO |

| | | | | | | |
|--------------|-------|--------------|-------|-------|-------|-----------------|
| | 0,075 | | | 0,116 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,075 | | | 0,170 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,069 | | | 0,797 | 1,887 | ACEPTADO |
| 0,098 | 0,087 | 0,091 | 0,006 | 0,706 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,099 | | | 1,442 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,094 | | | 0,513 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,085 | | | 0,939 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,094 | | | 0,629 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,085 | | | 0,939 | 1,887 | ACEPTADO |
| 0,147 | 0,127 | 0,131 | 0,005 | 0,988 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,130 | | | 0,173 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,135 | | | 0,938 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,133 | | | 0,346 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,136 | | | 1,160 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,125 | | | 1,284 | 1,887 | ACEPTADO |
| 0,245 | 0,203 | 0,209 | 0,004 | 1,461 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,209 | | | 0,039 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,213 | | | 0,908 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,210 | | | 0,197 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,214 | | | 1,145 | 1,887 | ACEPTADO |
| | 0,205 | | | 0,829 | 1,887 | ACEPTADO |

Fuente: Elaboración propia

La evaluación del estadístico (G) (tabla 9) muestra que el (G) calculado es menor al (G) de tablas a un Nivel de confianza del 95%, indicando que no se detectan valores discrepantes o alejados de su valor medio, por lo tanto son aceptados y pertenecen al conjunto de la muestra estadística.

4.3.1.2. Evaluación de los resultados experimentales para la determinación de la linealidad según el Test de Cochran

El cálculo del estadístico (C) se realiza en todos los niveles de concentración para evaluar la homogeneidad de varianzas, con la ecuación 5 y los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11 Datos experimentales de absorbancia para cada nivel de concentración. Cálculo del estadístico (C).

| Concentración mg Cr(VI)/L | Absorbancia | | | S | S ² | C calculado | C tablas | Evaluación Ccal<Ctab |
|------------------------------|----------------------|-------|-------|---------------|----------------|----------------|-------------|-------------------------|
| | | | | | | | | |
| 0,039 | 0,038 | 0,037 | 0,037 | 0,001 | 3,333E-07 | 0,571 | 0,616 | ACEPTADO |
| | 0,039 | 0,039 | 0,039 | 0,000 | 0,000E+00 | | | |
| | 0,045 | 0,041 | 0,041 | 0,002 | 5,333E-06 | | | |
| | 0,035 | 0,035 | 0,034 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | 0,045 | 0,045 | 0,042 | 0,002 | 3,000E-06 | | | |
| | 0,036 | 0,036 | 0,037 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | Varianza Máx. | | | 5,333 E-06 | Suma | | | |
| 0,059 | 0,055 | 0,053 | 0,053 | 0,001 | 1,333E-06 | 0,587 | 0,616 | ACEPTADO |
| | 0,052 | 0,050 | 0,052 | 0,001 | 1,333E-06 | | | |
| | 0,057 | 0,057 | 0,056 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | 0,052 | 0,052 | 0,049 | 0,002 | 3,000E-06 | | | |
| | 0,066 | 0,063 | 0,060 | 0,003 | 9,000E-06 | | | |
| | 0,053 | 0,053 | 0,052 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | Varianza Máx. | | | 9,000 E-06 | Suma | | | |
| 0,078 | 0,070 | 0,068 | 0,069 | 0,001 | 1,000E-06 | 0,520 | 0,616 | ACEPTADO |
| | 0,072 | 0,070 | 0,072 | 0,001 | 1,333E-06 | | | |
| | 0,088 | 0,085 | 0,084 | 0,002 | 4,333E-06 | | | |

| | | | | | | | | |
|--------------|----------------------|-------|---------------|-------------|-----------|-------|-------|-----------------|
| | 0,074 | 0,075 | 0,076 | 0,001 | 1,000E-06 | | | |
| | 0,075 | 0,076 | 0,075 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | 0,069 | 0,070 | 0,069 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | Varianza Máx. | | 4,333 E-06 | Suma | 8,333E-06 | | | |
| 0,098 | 0,090 | 0,085 | 0,085 | 0,003 | 8,333E-06 | 0,413 | 0,616 | ACEPTADO |
| | 0,100 | 0,097 | 0,100 | 0,002 | 3,000E-06 | | | |
| | 0,097 | 0,092 | 0,092 | 0,003 | 8,333E-06 | | | |
| | 0,087 | 0,088 | 0,081 | 0,004 | 1,433E-05 | | | |
| | 0,094 | 0,095 | 0,094 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | 0,085 | 0,085 | 0,086 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | Varianza Máx. | | 1,433 E-05 | Suma | 3,467E-05 | | | |
| 0,147 | 0,129 | 0,126 | 0,125 | 0,002 | 4,333E-06 | 0,398 | 0,616 | ACEPTADO |
| | 0,131 | 0,129 | 0,131 | 0,001 | 1,333E-06 | | | |
| | 0,140 | 0,133 | 0,133 | 0,004 | 1,633E-05 | | | |
| | 0,137 | 0,132 | 0,129 | 0,004 | 1,633E-05 | | | |
| | 0,135 | 0,136 | 0,138 | 0,002 | 2,333E-06 | | | |
| | 0,125 | 0,125 | 0,126 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | Varianza Máx. | | 1,633 E-05 | Suma | 4,100E-05 | | | |
| 0,245 | 0,205 | 0,202 | 0,201 | 0,002 | 4,333E-06 | 0,485 | 0,616 | ACEPTADO |
| | 0,210 | 0,207 | 0,210 | 0,002 | 3,000E-06 | | | |
| | 0,216 | 0,211 | 0,211 | 0,003 | 8,333E-06 | | | |
| | 0,214 | 0,209 | 0,206 | 0,004 | 1,633E-05 | | | |
| | 0,215 | 0,213 | 0,213 | 0,001 | 1,333E-06 | | | |
| | 0,205 | 0,205 | 0,206 | 0,001 | 3,333E-07 | | | |
| | Varianza Máx. | | 1,633 E-05 | Suma | 3,367E-05 | | | |

Fuente: Elaboración propia

Los valores del estadístico (C) calculados son menores al (C) de tablas a un Nivel de confianza del 95% indicando una condición de Homocedasticidad, que confirma la tendencia lineal del rango de trabajo.

Una vez realizados los *test de Grubbs* y *Cochran*, se procede a calcular la recta de regresión lineal, por el método de mínimos cuadrados. En la Tabla 12 se muestra el resumen de los datos experimentales y los resultados obtenidos y en la Figura 22 se observa el gráfico obtenido.

Tabla 12 Resumen de datos experimentales para determinar la linealidad del sistema

| Nivel | Concentración mg Cr(VI)/L | Absorbancia |
|--|------------------------------|-------------|
| 1 | 0,039 | 0,039 |
| 2 | 0,059 | 0,055 |
| 3 | 0,078 | 0,074 |
| 4 | 0,098 | 0,091 |
| 5 | 0,147 | 0,131 |
| 6 | 0,245 | 0,209 |
| Pendiente (b) | | 0,8251 |
| Intercepto (a) | | 0,0081 |
| Coefficiente de correlación (r) | | 0,9996 |

Fuente: Elaboración propia

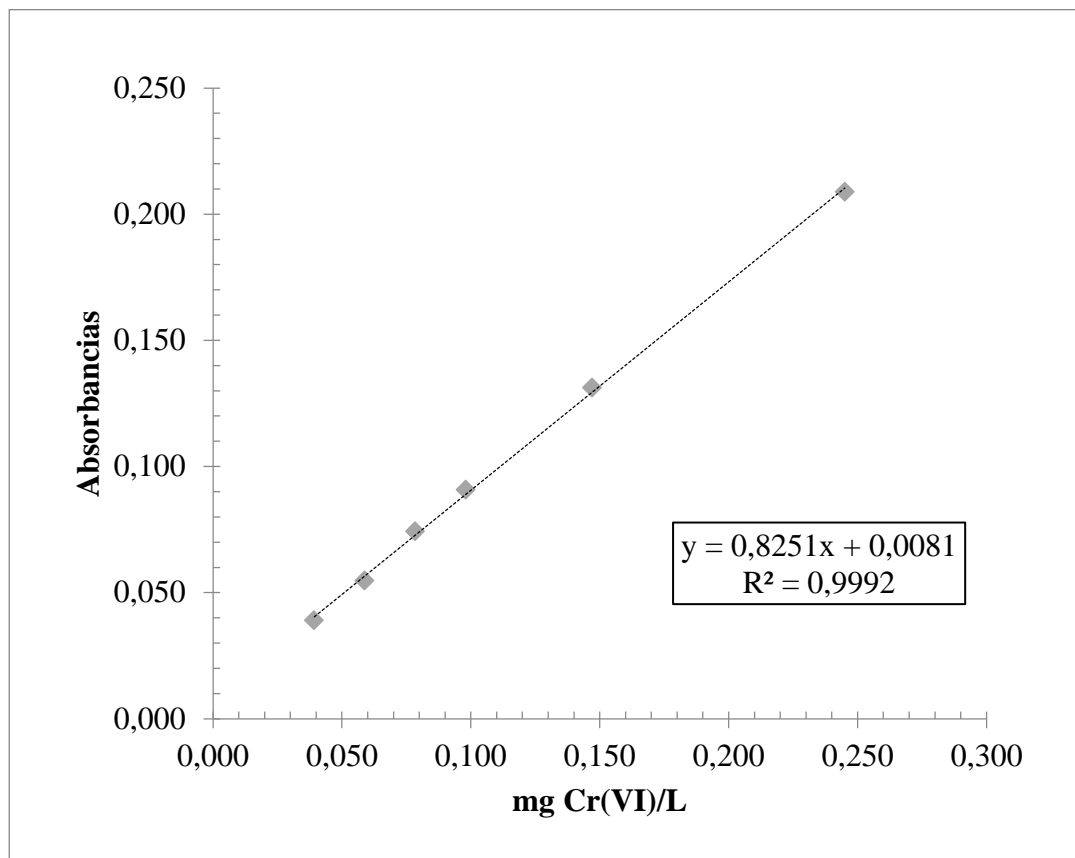


FIGURA 22 Linealidad del sistema

En el Anexo 10 se muestran los resultados obtenidos del análisis de mínimos cuadrados para la evaluación del sistema.

4.3.1.3. Test de T-student para el coeficiente de correlación (r) test de grado de relación entre la concentración y la respuesta

Para demostrar que existe una pendiente significativamente distinta de cero se realizó la prueba t-student, para n-2 grados de libertad = 34 en un nivel de confianza del 95% a dos colas, el valor crítico en la tabla de la distribución t-student es $t_{tab} = 2,032$

Hipótesis

$H_0: r = 0$ **No Existe** correlación entre **X** y **Y**

Sí $t_{exp} < t_{tab}$

$H_1: r \neq 0$ **Existe** correlación entre **X** y **Y**

Sí $t_{exp} > t_{tab}$

Se calcula el t_{exp} con la ecuación 9:

$$t_{exp} = \frac{|r|\sqrt{P-2}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

P= Indica el número de niveles de concentración usados en el trabajo, en este caso es 6

Reemplazando datos en la ecuación se obtiene un valor de: $t_{exp}= 69,59$, cómo este valor es mayor al t_{tab} se acepta la hipótesis alterna, comprobando que existe correlación entre **X y Y**.

4.3.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

4.3.2.1. Recta de calibración

A partir de la pendiente de la recta de calibración (b) y de la desviación estándar de la respuesta (S_a) se calculan los límites de detección y cuantificación con las ecuaciones 14 y 15, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - a - bX_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n X_i^2}{n \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}$$

$$L_D = \frac{3,3 * S_a}{b}$$

$$L_C = \frac{10 * S_a}{b}$$

Tabla 13 Límite de detección y límite de cuantificación, hallados a partir de los datos de linealidad del sistema.

| Nivel | Concentración mg Cr(VI)/L | Absorbancia |
|--|------------------------------|--------------|
| 1 | 0,039 | 0,039 |
| 2 | 0,059 | 0,055 |
| 3 | 0,078 | 0,074 |
| 4 | 0,098 | 0,091 |
| 5 | 0,147 | 0,131 |
| 6 | 0,245 | 0,209 |
| Pendiente (b) | | 0,8251 |
| Intercepto (a) | | 0,0081 |
| Coefficiente de correlación (r) | | 0,9996 |
| Desviación estándar del intercepto (Sa) | | 0,0016 |
| Límite de detección (LD) | | 0,006 |
| Límite de cuantificación (LC) | | 0,020 |

Fuente: Elaboración propia

4.3.2.2. Muestras blanco

A partir de la medición de una matriz sin analito (muestra blanco) se determinó el LD y LC, se realizaron siete réplicas individuales con lecturas por triplicado. Se obtienen los resultados a partir de las ecuaciones 10 y 11, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

$$L_D = X_b + 3S$$

$$L_C = X_b + 10S$$

Tabla 14 Límite de detección y límite de cuantificación a partir de la lectura de muestras blanco

| Muestra | Absorbancias | | | Promedio | Concentración mg Cr(VI)/L |
|--------------------------------------|--------------|-------|-------|----------|------------------------------|
| Blanco-1 | 0,006 | 0,007 | 0,009 | 0,007 | -0,001 |
| Blanco-2 | 0,006 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | -0,002 |
| Blanco-3 | 0,009 | 0,008 | 0,007 | 0,008 | 0,000 |
| Blanco-4 | 0,009 | 0,009 | 0,012 | 0,010 | 0,002 |
| Blanco-5 | 0,009 | 0,009 | 0,012 | 0,010 | 0,002 |
| Blanco-6 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | 0,007 | -0,001 |
| Blanco-7 | 0,008 | 0,008 | 0,006 | 0,007 | -0,001 |
| Concentración promedio | | | | | 0,000 |
| Desviación estándar | | | | | 0,002 |
| Límite de detección (LD) | | | | | 0,005 |
| Límite de cuantificación (LC) | | | | | 0,017 |

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 15, se muestra los resultados obtenidos mediante dos métodos de determinación del límite de detección y el límite de cuantificación.

Tabla 15 Resumen de los valores obtenidos para el límite de detección y el límite de cuantificación.

| Método | Límite de detección mg Cr(VI)/L | Límite de cuantificación mg Cr(VI)/L |
|-----------------------------|------------------------------------|---|
| Recta de calibración | 0,006 | 0,020 |
| Muestras Blanco | 0,005 | 0,017 |

Fuente: Elaboración propia

Se tiene en promedio al límite de detección del método **LD** como 0,006 mg Cr (VI)/L y el límite de cuantificación **LC** 0,019 mg Cr (VI)/L.

4.3.3. Selectividad del Método

Para evaluar la selectividad del método se hicieron pruebas con grupos de muestras de agua natural y residual, sin presencia de analito y con analito, a continuación se detallan los resultados obtenidos.

4.3.3.1. Pruebas de selectividad en Agua Natural

Se preparó dos grupos de muestras de prueba una con matriz y otra sin matriz en dos niveles de concentración (0,098-0,245 mg Cr (VI)/L) se realizó la prueba (F) para comparar las varianzas. Los resultados se muestran en la Tabla 16 y 17.

Hipótesis

Ho: $S_1^2 = S_2^2$ No existe diferencia significativa entre las varianzas Sí $F_{calc} < F_{tab}$

H₁: $S_1^2 \neq S_2^2$ Existe diferencia significativa entre las varianzas Sí $F_{calc} > F_{tab}$

Se calcula el estadístico (F) con la ecuación 16.

$$F_{calc} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

Tabla 16 Datos experimentales para la prueba de selectividad del método con matriz sin analito, al nivel de concentración 0,098 mg Cr (VI)/L y cálculo del estadístico F.

| 0,098 mg Cr(VI)/L | | | |
|-------------------|-------|--------------|-------|
| Sin Matriz | | Con Matriz | |
| Absorbancias | mg/L | Absorbancias | mg/L |
| 0,084 | 0,097 | 0,084 | 0,097 |
| 0,083 | 0,096 | 0,082 | 0,095 |
| 0,083 | 0,096 | 0,083 | 0,096 |
| 0,085 | 0,098 | 0,083 | 0,096 |
| 0,085 | 0,098 | 0,084 | 0,097 |
| 0,084 | 0,097 | 0,084 | 0,097 |
| 0,084 | 0,097 | 0,083 | 0,096 |

| | | | |
|-------------------|--------------|-------|--------------|
| 0,083 | 0,096 | 0,084 | 0,097 |
| 0,084 | 0,097 | 0,083 | 0,096 |
| PROMEDIO | 0,097 | | 0,096 |
| DESVIACIÓN | 0,001 | | 0,001 |
| VARIANZA | 9,12112E-07 | | 7,46273E-07 |
| Fcal | 1,22 | | |
| Ftab | 3,44 | | |

Fuente: Elaboración propia

El estadístico (F) calculado a partir de los datos de la tabla 17 es menor al valor crítico $F_{tab} = 3,44$ a un nivel de confianza del 95%, lo que indica que no hay diferencia significativa entre las varianzas, por lo tanto la matriz no tiene efecto importante sobre la precisión del método en el intervalo de concentración de estudio.

Adicionalmente se realizó la prueba *t-student* para medias emparejadas y de esta manera comparar las medias obtenidas con los dos grupos de muestras.

Hipótesis

$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$ Las medias son estadísticamente iguales

Sí $t_{calc} < t_{tab}$

$H_1: \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2$ Las medias no son estadísticamente iguales

Sí $t_{calc} > t_{tab}$

El valor del estadístico t se calcula con las ecuaciones 17 y 18.

$$t_{calc} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_{ag} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$S_{ag} = \sqrt{\frac{[(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2]}{(n_1 + n_2 - 2)}}$$

Reemplazando valores en las ecuaciones de obtiene un $t_{calc} = 1,58$ que es menor al t de tablas a un nivel de confianza del 95% $t_{tab} = 1,75$ lo que indica que las medias son estadísticamente iguales, es decir, la matriz no tiene efecto significativo sobre los resultados del ensayo.

Tabla 17 Datos experimentales para la prueba de selectividad del método con matriz sin analito, al nivel de concentración 0,247 mg Cr (VI)/L y cálculo del estadístico F.

| 0,245 mg Cr(VI)/L | | | |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| Sin Matriz | | Con Matriz | |
| Absorbancias | mg/L | Absorbancias | mg/L |
| 0,204 | 0,244 | 0,203 | 0,242 |
| 0,203 | 0,242 | 0,204 | 0,244 |
| 0,204 | 0,244 | 0,204 | 0,244 |
| 0,203 | 0,242 | 0,203 | 0,242 |
| 0,205 | 0,245 | 0,204 | 0,244 |
| 0,205 | 0,245 | 0,204 | 0,244 |
| 0,205 | 0,245 | 0,203 | 0,242 |
| 0,205 | 0,245 | 0,205 | 0,245 |
| 0,205 | 0,245 | 0,204 | 0,244 |
| PROMEDIO | 0,244 | | 0,243 |
| DESVIACIÓN | 0,001 | | 0,001 |
| VARIANZA | 1,119E-06 | | 6,634E-07 |
| Fcal | 1,69 | | |
| Ftab | 3,44 | | |

Fuente: Elaboración propia

El estadístico (F) calculado a partir de los datos de la Tabla 17 también es menor al valor crítico $F_{tab} = 3,44$ a un nivel de confianza del 95%, lo que confirma que no hay influencia de la matriz sobre la precisión del método en el intervalo de concentración de estudio.

De la misma forma que en el otro nivel de concentración se realizó la prueba t-student reemplazando valores en las ecuaciones 17 y 18 el t calculado= 1,52 es menor al t de tablas.

4.3.3.2. Características Físico-químicas de la matriz

Los resultados obtenidos de las mediciones de parámetros físico-químicos se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18 Valores de los parámetros físico-químicos de la matriz

| PARÁMETROS | MUESTRA DE AGUA NATURAL |
|------------------------------------|-------------------------|
| pH | 7,94 |
| Conductividad ($\mu\text{S/cm}$) | 816 |
| OD (mg/L) | 7,49 |
| Alcalinidad CaCO_3 (mg/L) | 87,5 |
| Sodio (mg/L) | 220,17 |
| Potasio (mg/L) | 38,16 |
| Calcio (mg/L) | 50,25 |
| Magnesio (mg/L) | 26,381 |
| Sulfato (mg/L) | 129,58 |
| Nitrato (mg/L) | 53,31 |
| Cloruro (mg/L) | 32,86 |
| Cromo (VI) (mg/L) | <LD |

Fuente: Elaboración propia

4.3.3.3. Prueba de selectividad en Agua residual

La selectividad es evaluada por comparación de las inclinaciones de las curvas de adición patrón, se utilizó el test t-student para igualdad de inclinaciones los valores obtenidos se muestran en las Tablas 19,20, el análisis de mínimos cuadrados se encuentran en los Anexos 11 y 12. En la Figura 23 se muestra el gráfico obtenido.

Hipótesis

$H_0: b_1 = b_2$ Las inclinaciones son estadísticamente iguales Sí $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$

$H_1: b_1 \neq b_2$ Las inclinaciones no son estadísticamente iguales Sí $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$

Se calcula el estadístico **t** a partir de las ecuaciones:

$$t_{calc} = \frac{|b_1 - b_2|}{ESD \sqrt{\frac{1}{S_{xx_1}} + \frac{1}{S_{xx_2}}}}$$

$$ESD = \sqrt{\frac{GL_1(RSD)^2 + GL_2(RSD)^2}{GL_1 + GL_2}}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$$

$$RSD = \sqrt{\frac{(Y_1 - \hat{Y}_1)^2}{n - 2}}$$

Tabla 19 Datos experimentales para la prueba de selectividad del método utilizando matriz con analito.

| Concentración mg Cr(VI)/L | Absorbancias | |
|------------------------------|--------------|-----------------|
| | Agua+Patrón | Matriz + Patrón |
| 0,039 | 0,037 | 0,097 |
| 0,039 | 0,039 | |
| 0,039 | 0,042 | 0,097 |
| 0,039 | 0,035 | |
| 0,039 | 0,044 | 0,096 |
| 0,039 | 0,036 | |
| 0,059 | 0,054 | 0,108 |
| 0,059 | 0,051 | |
| 0,059 | 0,057 | 0,107 |
| 0,059 | 0,051 | |
| 0,059 | 0,063 | 0,108 |
| 0,059 | 0,053 | |

| | | |
|--|--------|--------|
| 0,078 | 0,069 | 0,122 |
| 0,078 | 0,071 | |
| 0,078 | 0,076 | 0,123 |
| 0,078 | 0,075 | |
| 0,078 | 0,075 | 0,123 |
| 0,078 | 0,069 | |
| 0,098 | 0,087 | 0,135 |
| 0,098 | 0,099 | |
| 0,098 | 0,094 | 0,136 |
| 0,098 | 0,085 | |
| 0,098 | 0,094 | 0,135 |
| 0,098 | 0,085 | |
| 0,147 | 0,127 | 0,173 |
| 0,147 | 0,130 | |
| 0,147 | 0,135 | 0,174 |
| 0,147 | 0,133 | |
| 0,147 | 0,136 | 0,175 |
| 0,147 | 0,125 | |
| 0,245 | 0,203 | 0,245 |
| 0,245 | 0,209 | |
| 0,245 | 0,213 | 0,245 |
| 0,245 | 0,210 | |
| 0,245 | 0,214 | 0,245 |
| 0,245 | 0,205 | |
| Pendiente (b) | 0,8251 | 0,7322 |
| Intercepto (a) | 0,0081 | 0,0656 |
| Coefficiente de correlación (r) | 0,9996 | 0,9996 |

Fuente: Elaboración propia

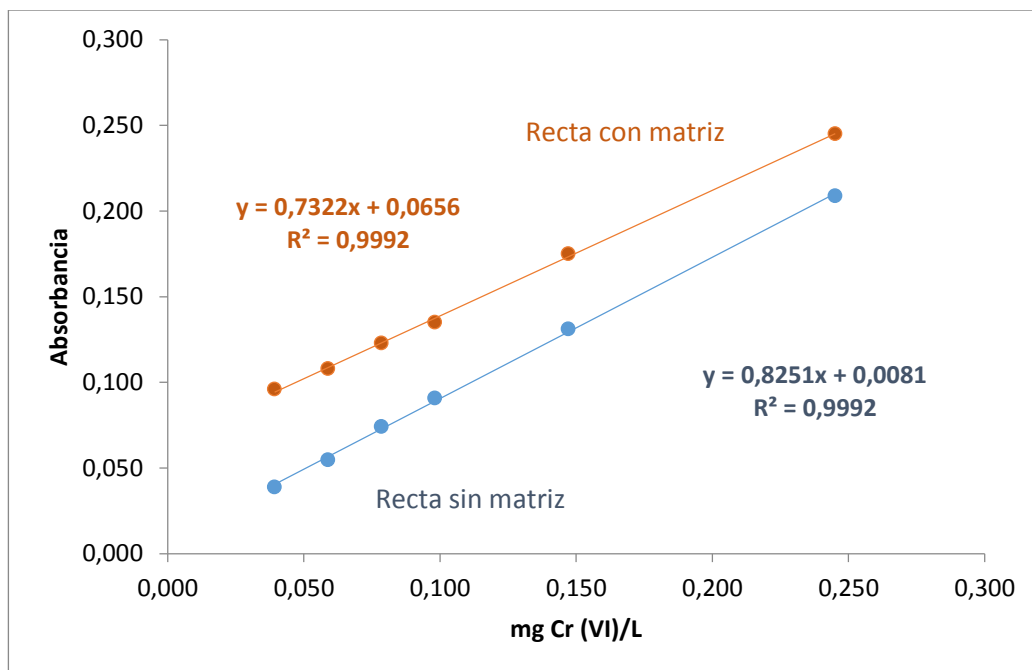


FIGURA 23 Selectividad del método de determinación de Cromo (VI)

Fuente: Elaboración propia

Para el cálculo del estadístico t se hace un análisis de mínimos cuadrados, con $n_1=36$ y $n_2=18$ con datos totales $n_{total}=54$ y los grados de libertad $(n-2)$ $GL_1= 34$ y $GL_2=16$ con grados de libertad totales $GL_{total}= 50$ a un nivel de confianza del 95% el valor crítico en la tabla de la distribución t-student es $t_{tab}= 1,676$. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 20 Resumen de los resultados obtenidos

| | |
|------------------------------|--------------|
| ESD | 0,029 |
| t_{calc} | 0,772 |
| t_{tab} | 1,676 |

Como el $t_{calc}= 0,772$ es menor al $t_{tab}= 1,676$ se acepta la hipótesis nula, comprobando que las pendientes son iguales, que no hay efecto de matriz y el método es selectivo.

4.3.3.4. Características Físico-químicas de la matriz

Los resultados de los parámetros físico-químicos se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21 Valores de los parámetros físico-químicos de la matriz

| PARÁMETROS | PUNTO 1 (Río seco 1) | PUNTO 2 (Río seco 2) | PUNTO 3 (Río seco 3) |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| pH | 9,03 | 9,16 | 8,1 |
| Conductividad ($\mu\text{S/cm}$) | 1053 | 1012 | 2111 |
| OD (mg/L) | 7,02 | 6,81 | 5,46 |
| Alcalinidad CaCO_3 (mg/L) | 87,8 | 82,8 | 173,7 |
| Sodio (mg/L) | 214,82 | 213,25 | 349,19 |
| Potasio (mg/L) | 32,81 | 31,26 | 26,19 |
| Calcio (mg/L) | 69,84 | 77,16 | 57,36 |
| Magnesio (mg/L) | 29,109 | 26,319 | 21,21 |
| Sulfato (mg/L) | 296,02 | (*) | (*) |
| Nitrato (mg/L) | 7,086 | (*) | (*) |
| Cloruro (mg/L) | 55,93 | (*) | (*) |
| Cromo (VI) (mg/L) | 0,031 | 0,035 | 0,118 |

(*) Debido a la alta conductividad de estas muestras no se pudo analizar los aniones mayoritarios en el cromatógrafo de iones.

4.3.4. Precisión

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

4.3.4.1. Condición de Repetibilidad (Sr)

Se realizó lecturas del estándar de 0,245 mg Cr (VI)/L en diferentes días, para evaluar si hay diferencias entre las varianzas se utilizó la prueba (F). Para el cálculo del estadístico (F) se utilizó la ecuación 16. En la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 22 Datos experimentales para la evaluación de la precisión en condiciones de repetibilidad y cálculo del estadístico F.

| 0,245 mg Cr(VI)/L | | | |
|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Día 1 | | Día 2 | |
| Absorbancia | mg/L | Absorbancia | mg/L |
| 0,204 | 0,244 | 0,204 | 0,244 |
| 0,205 | 0,245 | 0,204 | 0,244 |
| 0,205 | 0,245 | 0,204 | 0,244 |
| 0,204 | 0,244 | 0,203 | 0,242 |
| 0,205 | 0,245 | 0,205 | 0,245 |
| 0,205 | 0,245 | 0,204 | 0,244 |
| 0,204 | 0,245 | 0,205 | 0,245 |
| 0,205 | 0,245 | 0,206 | 0,246 |
| 0,206 | 0,246 | 0,206 | 0,246 |
| 0,205 | 0,245 | 0,205 | 0,245 |
| 0,206 | 0,246 | 0,205 | 0,245 |
| 0,203 | 0,242 | 0,206 | 0,246 |
| Promedio | 0,245 | Promedio | 0,245 |
| Desviación Estándar | 0,001 | Desviación Estándar | 0,001 |
| CV | 0,418 | CV | 0,482 |
| Varianza | 1,046E-06 | Varianza | 1,390E-06 |
| F cal | 1,33 | | |
| F tab | 2,82 | | |

Fuente: Elaboración propia

El estadístico (F) calculado a partir de los datos de la tabla 24 $F_{cal}=1,33$ es menor al valor crítico $F_{tab}=2,82$ a un nivel de confianza del 95%, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas y hay concordancia entre los resultados de mediciones obtenidos en días diferentes. Por lo tanto se pueden combinar las Repetibilidades, usando la ecuación 23 y en la Tabla 23 se muestran los resultados obtenidos.

$$S_r = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Tabla 23 Resumen de los cálculos para obtener una repetibilidad combinada

| Combinando Repetibilidades | | | |
|-----------------------------------|------------|------------------|---------------|
| 0.245 mg/L | n-1 | s2 | n-1*s2 |
| Día 1 | 11 | 1,861E-06 | 2,047E-05 |
| Día 2 | 11 | 2,908E-06 | 3,199E-05 |
| Sumatoria | 22 | Sumatoria | 5,2455E-05 |
| | | Sr | 0,002 |

Fuente: Elaboración propia

El método presenta un valor de repetitividad combina de $S_r = 0,002$

4.3.4.2. Condición de Precisión intermedia (Srw)

Para evaluar la precisión intermedia se comparó los valores de lecturas obtenidas por dos analistas para el estándar 0,245 mg Cr (VI)/L de igual manera se comprobó si existen diferencias entre las varianzas por la prueba (F) utilizando la ecuación 16. En la Tabla 24 se observa los resultados obtenidos.

Tabla 24 Datos experimentales de dos analistas para la evaluación de la precisión en condiciones de precisión intermedia y cálculo del estadístico F.

| 0,245 mg Cr(VI)/L | | | |
|----------------------------|--------------|----------------------------|-------------|
| Analista 1 | | Analista 2 | |
| Absorbancia | mg/L | Absorbancia | mg/L |
| 0,202 | 0,241 | 0,204 | 0,244 |
| 0,203 | 0,242 | 0,206 | 0,246 |
| 0,204 | 0,244 | 0,207 | 0,247 |
| 0,203 | 0,242 | 0,202 | 0,241 |
| 0,205 | 0,245 | 0,203 | 0,242 |
| 0,206 | 0,246 | 0,202 | 0,241 |
| 0,205 | 0,245 | 0,201 | 0,240 |
| 0,206 | 0,246 | 0,202 | 0,241 |
| 0,206 | 0,246 | 0,201 | 0,240 |
| 0,205 | 0,245 | 0,203 | 0,242 |
| 0,205 | 0,245 | 0,201 | 0,240 |
| 0,206 | 0,246 | 0,203 | 0,242 |
| Promedio | 0,244 | Promedio | 0,242 |
| Desviación Estándar | 0,002 | Desviación Estándar | 0,002 |
| CV | 0,685 | CV | 0,972 |
| Varianza | 2,804E-06 | Varianza | 5,5518E-06 |
| F cal | 1,98 | | |
| Ftab | 2,82 | | |
| Srw | 0,002 | | |

Fuente: Elaboración propia

Como el $F_{cal}=1,98$ es menor al $F_{tab}=2,82$ se comprueba que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas y hay concordancia entre los resultados

de mediciones obtenidos por dos analistas, por lo cual también se procede a combinar las desviaciones estándar hallando un valor de:

$$S_{rw}=0,002$$

4.3.4.3. Condición de Reproducibilidad

Para evaluar la precisión en condiciones de reproducibilidad se realizó las medidas de los estándares de trabajo en un segundo equipo con las mismas características del equipo de trabajo ver Anexo 6 obteniendo los resultados de la Tabla 25 y la gráfica obtenida se la muestra en la Figura 24.

Tabla 25 Datos experimentales obtenidos de la recta de calibración en dos equipos

| Nivel | EQUIPO 1 | | EQUIPO 2 | |
|--|------------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
| | Concentración mg Cr(VI)/L | Absorbancia | Concentración mg Cr(VI)/L | Absorbancia |
| 1 | 0,039 | 0,039 | 0,039 | 0,032 |
| 2 | 0,059 | 0,055 | 0,059 | 0,050 |
| 3 | 0,078 | 0,074 | 0,078 | 0,068 |
| 4 | 0,098 | 0,091 | 0,098 | 0,089 |
| 5 | 0,147 | 0,131 | 0,147 | 0,131 |
| 6 | 0,245 | 0,209 | 0,245 | 0,217 |
| Pendiente (b) | | 0,8251 | (b) | 0,8977 |
| Intercepto (a) | | 0,0081 | (a) | -0,0019 |
| Coefficiente de correlación (r) | | 0,9996 | (r) | 0,9997 |

Fuente: Elaboración propia

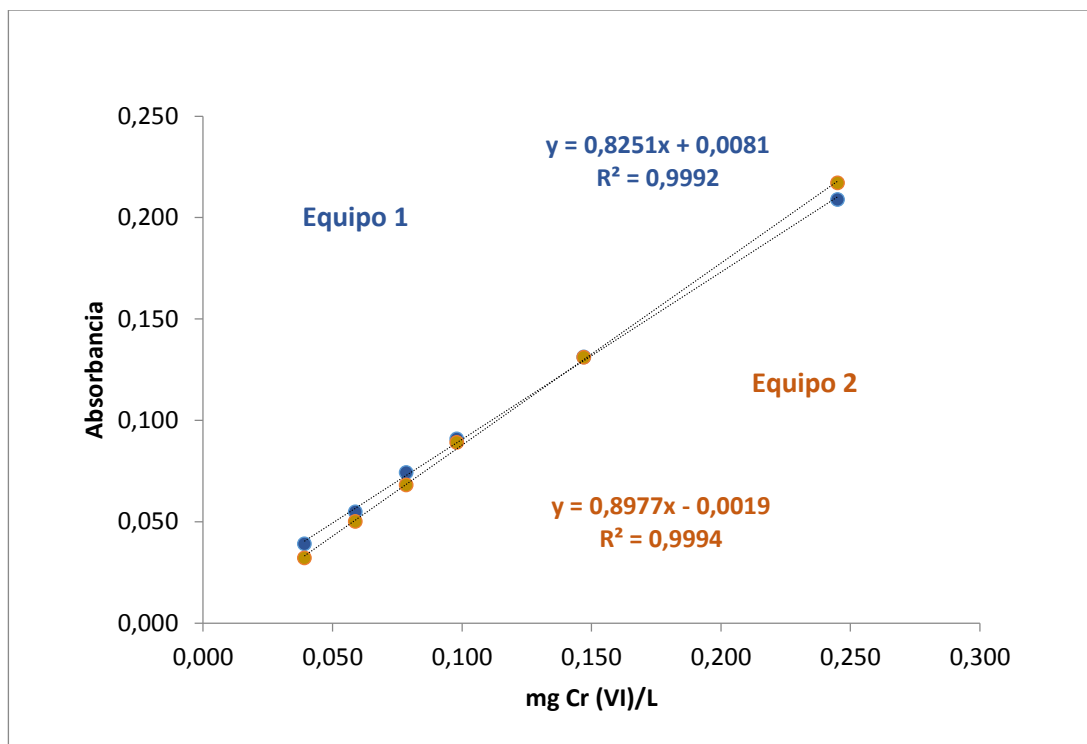


FIGURA 24 Curvas de calibración realizadas en los dos equipos

Fuente: Elaboración propia

Al graficar las rectas de calibración obtenidas en los dos equipos, podemos observar que no hay diferencia significativa entre ambas rectas. Para comprobar que no existe diferencia entre las inclinaciones se realizó la prueba t-student para comparación de pendientes, mencionada anteriormente en la evaluación de la selectividad del método. Utilizando las ecuaciones 19, 20, 21 y 22, y con los valores de la tabla 26 se calculó el estadístico **t** obteniendo el siguiente resultado:

$$t_{\text{calc}}=2,06$$

El resultado es menor al valor crítico es $t_{\text{tab}}=2,306$, lo que indica que estadísticamente las pendientes son iguales y por tanto el método es reproducible.

4.3.5. Exactitud

Se evaluó la exactitud del método en función al porcentaje de recuperación, según la AOAC al nivel de concentración de ppm el rango de porcentaje de recuperación debe estar entre el 80-110% ver Anexo 5.

Para hallar el porcentaje de recuperación se midió el contenido de Cr (VI) por triplicado en dos muestras reales tomadas en el río seque ver Anexo 7. Posteriormente se fortifico con 0,059 mg Cr (VI)/L a dichas muestras por triplicado y se calculó el porcentaje de recuperación con la ecuación 24. Los resultados se muestran en la Tabla 26.

$$\%R = \left[\frac{X_e - X_o}{X_{ref}} \right] \cdot 100\%$$

Tabla 26 Datos experimentales para determinar el porcentaje de recuperación.

| Muestra | Absorbancia | mg Cr(VI)/L | Muestra +STD Absorbancia | MUES+STAD (mg/L) | Sesgo | % de Recuperación |
|-------------------|-------------|-------------|--------------------------|------------------|--------|-------------------|
| punto 1 | 0,024 | 0,024 | 0,069 | 0,079 | 0,002 | 91,6 |
| punto 1 | 0,025 | 0,025 | 0,070 | 0,080 | 0,000 | 91,6 |
| punto 1 | 0,026 | 0,026 | 0,072 | 0,082 | -0,002 | 93,7 |
| Promedio | | 0,025 | Promedio | 0,080 | 0,000 | 92,3 |
| punto 2 | 0,027 | 0,027 | 0,075 | 0,086 | 0,000 | 97,7 |
| punto 2 | 0,028 | 0,029 | 0,077 | 0,089 | 0,002 | 99,8 |
| punto 2 | 0,028 | 0,029 | 0,074 | 0,085 | 0,002 | 93,7 |
| Promedio | | 0,028 | Promedio | 0,086 | 0,001 | 97,1 |
| Valor Min. | 91,6 | | | | | |
| Valor Máx. | 99,8 | | | | | |

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la tabla 27 los valores de porcentaje de recuperación están en un rango del 91,6-99,8% que se encuentran dentro el rango considerado para niveles de concentración en mg/L, por tanto se considera que el método es exacto.

4.3.6. Robustez

Para poder determinar posibles factores que afecten al método, se aplicó el Test de *Plackett-Burman*, el cual permite evaluar el efecto de siete parámetros o menos a través de tan sólo ocho experimentos, desafiando de esta manera al método al realizar variaciones en el proceso analítico. El símbolo “-“ indica el valor nominal y el “+” indica el valor modificado.

Se evaluaron los efectos producidos por cinco variaciones realizadas durante el proceso analítico, se trabajó con el nivel de concentración de 0,098 mg Cr (VI)/L. En la Tabla 30 se muestra las variables que se tomaron en cuenta, con los respectivos valores modificados y en la Tabla 27 el diseño de experimentos.

Tabla 27 Valores de las variables modificadas en el estudio de la robustez.

| VARIABLES | | VALOR | | | |
|-----------|--------------------------|---------|--------|-----------|--------|
| | | Nominal | | Variación | |
| A | Tiempo de reacción | - | 15 min | + | 5 min |
| B | Analista | - | A | + | B |
| C | Ác fosfórico | - | SI | + | NO |
| D | Volumen de Ác. Sulfúrico | - | 3 mL | + | 1 mL |
| E | Volumen de DPC | - | 0.5 mL | + | 0.3 mL |

Fuente: Elaboración propia

Tabla 28 Diseño de Plackett-Burman, que resume los ocho experimentos

| Parámetro | A | B | C | D | E | Resultado | |
|-------------|---|---|---|---|---|-----------|---|
| Experimento | 1 | - | - | - | - | - | S |
| | 2 | - | - | + | - | + | T |
| | 3 | - | + | - | + | + | U |
| | 4 | - | + | + | + | - | V |
| | 5 | + | - | + | + | + | W |
| | 6 | + | + | + | - | - | X |
| | 7 | + | + | - | - | + | Y |
| | 8 | + | - | - | + | - | Z |

Fuente: (IBMETRO, 2018)

Tomando en cuenta las variables establecidas y el diseño de experimentos mostrada en la Tabla 28 se obtuvieron los resultados de la Tabla 29.

Tabla 29 Diseño de Plackett-Burman, que resume los ocho experimentos

| 0,098 mg Cr(VI)/L | | | Resultado |
|-------------------|--------------|-------|-----------|
| Experimento | Absorbancias | mg/L | |
| 1 | 0,098 | 0,109 | s |
| 2 | 0,085 | 0,093 | t |
| 3 | 0,083 | 0,091 | u |
| 4 | 0,084 | 0,092 | v |
| 5 | 0,060 | 0,063 | w |
| 6 | 0,080 | 0,087 | X |
| 7 | 0,085 | 0,093 | Y |
| 8 | 0,089 | 0,098 | Z |

Fuente: Elaboración propia

El efecto producido por la variación de un parámetro en particular se calcula hallando la diferencia entre el promedio de los valores nominales y el promedio de los valores con modificación, por ejemplo, para el parámetro “A” se tiene:

$$\delta_A = \frac{(s + t + u + v)}{4} - \frac{(w + x + y + z)}{4}$$

Una vez calculada la diferencia para cada parámetro, se compara la diferencia δ_A con $\sqrt{2} \cdot S_r$, en donde S_r es la desviación estándar del método en condiciones de repetibilidad. Entonces sí: $|\delta_i| > \sqrt{2} \cdot S_r$

El parámetro modificado tiene un efecto significativo, a un nivel de confianza del 95%. En la Tabla 30 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 30 Resumen de los valores obtenidos para evaluar el criterio de Robustez.

| Variable | Promedio nominal mg/L | Promedio con variación mg/L | Diferencia | $\sqrt{2} \cdot s_r$ | Sr | 0,002 |
|----------|-----------------------|-----------------------------|------------|----------------------|------------------------|---------------------------|
| | | | | | Criterio de Evaluación | |
| A | 0,096 | 0,085 | 0,011 | 0,002 | NO ACEPTADO | Sensible a la variable |
| B | 0,091 | 0,091 | 0,000 | 0,002 | ACEPTADO | No Sensible a la variable |
| C | 0,098 | 0,084 | 0,014 | 0,002 | NO ACEPTADO | Sensible a la variable |
| D | 0,096 | 0,086 | 0,010 | 0,002 | NO ACEPTADO | Sensible a la variable |
| E | 0,097 | 0,085 | 0,012 | 0,002 | NO ACEPTADO | Sensible a la variable |

Fuente: Elaboración propia

En tabla 31 se observa que los parámetros de: tiempo de reacción, presencia de ácido fosfórico, volumen de ácido sulfúrico y volumen de DPC tienen un efecto significativo sobre el proceso analítico, por lo cual no se deben alterar los valores nominales. El parámetro de cambio de analista no afecta al proceso analítico.

4.3.7. Determinación de Cr (VI) en muestras reales

Se determinó el contenido de Cr (VI) en las muestras recolectadas en el Río Seco detalladas anteriormente, utilizando el método planteado en el presente trabajo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31 Resultados obtenidos de la determinación de Cr (VI) en muestras reales.

| PUNTO 1 Río seco | Cr (VI) | Cr (VI) corregido |
|-----------------------------|-------------------|------------------------------|
| ABS | mg/L | mg/L |
| 0,024 | 0,024 | 0,030 |
| 0,025 | 0,025 | 0,031 |
| 0,026 | 0,026 | 0,033 |
| | Promedio | 0,031 |
| | Desviación | 0,002 |
| PUNTO 2 Río seco | Cr (VI) | Cr (VI) corregido |
| ABS | mg/L | mg/L |
| 0,027 | 0,027 | 0,034 |
| 0,028 | 0,029 | 0,036 |
| 0,028 | 0,029 | 0,036 |
| | Promedio | 0,035 |
| | Desviación | 0,001 |
| PUNTO 3 Río Seco | Cr (VI) | Cr (VI) corregido |
| ABS | mg/L | mg/L |
| 0,080 | 0,092 | 0,115 |
| 0,082 | 0,095 | 0,118 |
| 0,083 | 0,096 | 0,120 |
| | Promedio | 0,118 |
| | Desviación | 0,002 |

Se calcula el intervalo de confianza con la ecuación:

$$\mu = \bar{X} \pm \frac{t.s}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecc.27}$$

Los resultados de mg Cr (VI)/L con intervalo de confianza al 95% son: Punto 1=0,031±0,003, Punto 2= 0,035±0,002 y Punto 3=0,118±0,003

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

- Se verificó la eficiencia del espectrofotómetro Genesys 10S tomando en cuenta dos criterios: exactitud de longitud de onda y exactitud fotométrica. En la verificación de la exactitud de longitud de onda se determinó que el error absoluto es de ± 1 que está dentro de los estándares establecidos para este criterio. En la verificación de la exactitud fotométrica se determinó que el error relativo varía de un 9,150 % a 7,937% que son menores al 10%, valor que se considera aceptable en el presente trabajo.
- Se determinó las condiciones experimentales óptimas para la determinación espectrofotométrica de Cr (VI) confirmando que el rango de pH óptimo para la formación del complejo de Cr (VI)-DPC es de $2\pm 0,5$.
- La variación de la conductividad de la solución, con valores que van desde 100, 500 y 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, no interfiere la formación del complejo Cr (VI)-DPC, pero si evidencia mayor desviación de los resultados a conductividades altas.
- Se determinó mediante estudios de cinética de reacción que el tiempo óptimo para la formación del complejo mencionado es de 12 a 15 min permaneciendo estable al menos 40 min.
- Se validó el método de análisis para la determinación de concentración de Cr (VI) mediante la técnica espectrofotométrica en agua natural y residual. Cuyos resultados se detallan a continuación.
 - Se obtuvo un valor de coeficiente de correlación de 0,9996 en un rango de concentración de (0,039-0,245) mg Cr (VI)/L determinándose que hay correlación lineal en el método analítico.
 - Se determinó el límite de detección (LD) a partir de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta (S_a): también se determinó el LD mediante la lectura de muestras blanco, el resultado obtenido es de 0,006 mg Cr (VI)/L concentración mínima detectable.
 - Se determinó el límite de cuantificación (LOQ) a partir de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta (S_a) y

también mediante la lectura de muestras blanco, el resultado obtenido es de 0,019 mg Cr (VI)/L que es la cantidad mínima de Cr (VI) que se puede cuantificar.

- Se determinó la selectividad del método en agua natural y en agua residual. Para la matriz de agua natural se preparó dos grupos de muestra una con matriz y una sin matriz, en dos niveles de concentración 0,098 y 0,245 mg Cr (VI)/L en ambos casos se realizó pruebas de comparación de varianzas (Prueba F) y comparación de medias (Prueba T-student), los estadísticos calculados son menores a los valores de tablas en cada caso, por lo cual se concluye que la matriz no tiene efecto estadísticamente significativo sobre la precisión y resultados del método. El método es selectivo en agua natural.
- La selectividad en agua residual, se evaluó por la comparación de las pendientes de las curvas de adición patrón, para la evaluación se utilizó la prueba de t-Student para igualdad de inclinaciones, en el resultado del estadístico t es menor al de tablas, comprobando que las pendientes son iguales y no hay efecto estadísticamente significativo de la matriz. El método es selectivo en agua residual.
- Se evaluó la precisión del método en condiciones de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Se determinó que la desviación estándar del método en condiciones de repetibilidad es de 0,002 y se verificó que no hay diferencias estadísticamente significativas cuando se emplea el método en diferentes días, con diferente analista y con diferente equipo que tenga características similares de instrumentación.
- Se evaluó la exactitud del método calculando el porcentaje de recuperación de dos muestras reales, los resultados varían de 91,6 a 99,8% estos valores se encuentran dentro el rango de aceptación establecido de 80 a 110%.
- En la evaluación de la robustez se observó que la alteración de los parámetros de tiempo de reacción, presencia de ácido fosfórico, volumen de ácido sulfúrico y volumen de DPC tiene un efecto significativo sobre

el proceso analítico, por lo tanto no se deben alterar los valores nominales, el parámetro de cambio de analista no afecta al proceso analítico.



CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

- Los reactivos químicos empleados en el desarrollo del método deben ser de grado analítico, las soluciones deben ser preparadas en pequeños volúmenes y almacenar los residuos generados con precaución.
- Las muestras para el análisis de Cr (VI) deben ser analizadas en lo posible dentro de las primeras 24 horas después de su recolección, aun si fueron preservadas, mantenerlas fuera del alcance de la luz.
- Para contar con resultados confiables, se debe trabajar con mucha precaución y realizar periódicamente una calibración de los materiales volumétricos y la verificación de la eficiencia de los equipos de medición.
- Es necesario, realizar un estudio del grado de contaminación del Río Seco, tomando en cuenta diferentes parámetros entre ellos el Cr (VI), por la actividad industrial que existe en cercanías del río que van desde curtiembres artesanales, lavados de autos, mataderos clandestino entre otras actividades humanas que llegan a contaminar el río y de esta forma realizar una evaluación del impacto ambiental.
- Se debe formular alternativas de reciclaje o recuperación de los licores de cromo que se generan en el proceso de curtido, beneficiando de esta forma a las pequeñas empresas dedicadas al curtido artesanal y también se reduciría el daño al medio ambiente.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

- ESTRUCPLAN. (1 de Enero de 2000). Recuperado el 19 de Noviembre de 2019, de Combinación de process biológicos y oxidación avanzada para el tratamiento de una corriente de proceso de la Industria de Curtiembre: <https://estrucplan.com.ar/combinacion-de-procesos-biologicos-y-oxidacion-avanzada-para-el-tratamiento-de-una-corriente-de-proceso-de-la-industria-de-curtiembre/>
- APAZA, V. H. (2011). Insuficiencia del reglamento en materia de contaminación hídrica para la protección y conservación de aguas superficiales. *Estudio de caso río seco-el alto*. Unoversidad mayor de dan andrés, carrera de derecho.
- APHA-AWWA-WPCF. (2012). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Washington D.C.
- ARISMENDI, M. O. (2011). Mapa hidrográfico del río seco-ciudad de el alto. Lidema.
- ATDRS. (2006). Agency for Toxic Substances and disease Registry. Chromium Toxicity. Case Studies in Environmental Medicine.
- AWWARF, A. W. (2004). Low-level Hexavalent Chromium Treatment Options: Bench-Scale Evaluation. Denver .
- BORIS DUFFAU, F. R. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la. Chile.
- CALDER, L. (1988). Chromium in the Natural and Human Environments. *Chromium contamination of groundwater In: Nriagu, J. y Nieboer, E. (eds), 20, 215-230*. New York: John Wiley and Sons.
- CALLEJAS, F. R. (s.f.). Guía de Validación de Métodos Analíticos.
- CARTAJENA, A. S. (2013). Validación de métodos analíticos por Espectrofotometría para determinar Sulfatos, Cianuros y Cromo Hexavalente en aguas, suelos y lixiviados. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador.
- CONDE, I. J. (2018). Validación del método espectrofotométrico uv-vis para la determinación de amonio en aguas naturales. Universidad mayor de san andres.
- CORONA, D. N. (1998). Microempresa y competitividad, cuero. Bogotá: Centro de Innovación del calzado, Impresión Panamericana.
- COY, G. A. (10 de Febreo de 2006). Estandarización de métodos analíticos. Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales.

- CPTS, C. d. (2006). Guía técnica de producción más limpia para curtiembres bolivia. Usaid/bolivia.
- Dannis A Cascaret, R. P. (2010). Validación interna del método espectrofotométrico por adecuación, para la determinación de cromo (vi) en aguas residuales. *Revista Cubana de Química*, 9-13.
- Dannis A Cascaret, Rosa Pérez, Isabel Aguiloa. (2010). Validación interna del método espectrofotométrico por adecuación, para la determinación de cromo (vi) en aguas residuales. *Revista Cubana de Química*, 9-13.
- DAVIS, C. D. (s.f.). Espectro electromagnético. Universidad de California en Davis.
- Debabrata Pradhan et.al. (2017). Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater . *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* , 1-20.
- Diaz, N. A. (2005). Espectrofotometría, espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Mexico: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- EURACHEM. (Noviembre de 2005). Guía para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. México.
- FERNÁNDEZ, G. (7 de Noviembre de 2010). *FISICOQUÍMICA*. Recuperado el 19 de Noviembre de 2019, de <http://www.quimicafisica.com/exactitud-y-precision.html>
- GLORIA HEREDIA, et al. (2013). Estandarización de la Difenilcarbazida como indicador y acomplejante en la identificación de Cromo Hexavalente-Cr(VI). *Producción + Limpia*.
- IBMETRO, I. B. (10-11 de Mayo de 2018). Validación de Métodos de Ensayos Analíticos. La Paz, Bolivia.
- ICH. (2002). *Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano*. Recuperado el 15 de Noviembre de 2019, de http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
- ISO. (1993). Términos y definiciones relacionadas con los materiales de referencia.
- KATZ, S. A. (1994). *The Toxicology of Chromium and Its Compounds: The Biological and Environmental Chemistry of Chromium*. New York: VCH.
- MARTÍNEZ et al., F. S. (Noviembre de 2009). Calibración de un Espectrofotómetro UV-Visible y Evaluación de la Incertidumbre. León, Nicaragua: universidad nacional autonoma de León.

- MILLER, N. y. (2002). ESTADÍSTICA Y QUIMIOMETRÍA PARA QUÍMICA ANALÍTICA (Cuarta edición ed.). MADRID: PEARSON EDUCACIÓN.S.A.
- MILOVANOVIC, J. (2011). Desarrollo y optimización de un método para la determinación de cr (vi) en matrices complejas. Alicante.
- NIST, N. I. (24 de Noviembre de 2000). Certificate of Analysis, Standard Reference Material® Crystalline Potassium Dichromate for Use as an Ultraviolet Absorbance Standard.
- NORMA MEXICANA. (13 de Enero de 2015). NMX-AA-044-SCFI-2014. Análisis de agua: medición de cromo hexavalente en aguas naturales, salinas, residuales y residuales tratadas. México D.F.
- NTP. (2007). NTP Report on Sodium Dichromate Dihydrate (CAS No. 7789-12-0) Administered in Drinking Water to Male and Female F344/N Rats and B6C3F1 Mice and Male BALB/ c and am3-C57BL/6 Mice. North Carolina: National Toxicology Program.
- OMS, O. M. (2003).
- PACO, G. (17 de Septiembre de 2018). La Paz, ciudad de vertientes. *ERBOL*.
- PICHEL et al., P. L. (1976). Effect of Chromium in the Canadian Environment. Ottawa: National Research Council.
- R.W. BURKE and R. MAVRODINEANU. (1977). Certification and Use of Acidic Potassium Dichromate Solutions as an Ultraviolet Absorbance Standard-SRM 935. *NBS SPECIAL PUBLICATION 260-54*, 147.
- RMCH, R. E. (1995)Reglamento en Materia de Contaminación Hídrica, Bolivia.
- SAÉNZ, P. B. (2015). Procedimiento de muestreo de agua superficial. Perú: laboratorio de calidad ambiental, facultad de ciencias del ambiente de la universidad nacional“santiago antunez de mayolo”.
- SLOOFF et al., W. C. (1990). Integrated Criteria Document, Chromium Report No 710401002. The Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental.
- SOCIAL, M. d. (1996). Guía para el control de factores de riesgo ocupacional, sector informal del cuero. Bogotá.
- TOLA, R. H. (2016). Validación del método analítico para la determinación de arsénico total en peces. La paz: universidad mayor de san andrés, facultad de tecnología, carrera de química industrial.
- VI IBEROLAB. (2015). Guía para la verificación de espectrofotómetros UV-Visible utilizados en el análisis de suelo y agua. Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad de Laboratorios.

WHO, W. H. (2003). Chromium in Drinking Water: Background Document for Preparation of WHO Guidelines for Drinking Water. .

WIKIPEDIA, C. d. (22 de Octubre de 2019). *Espectroscopia ultravioleta-visible*. Recuperado el 19 de Noviembre de 2019, de Wikipedia, La enciclopedia libre.: https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Espectroscopia_ultravioleta-visible&oldid=120646537

WIKIPEDIA, c. d. (12 de Noviembre de 2019). *WIKIPEDIA la enciclopedia libre*. Recuperado el 24 de Noviembre de 2019, de https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Especial:Citar&page=Aguas_residuales&id=121249374

ZOUBOULIS et al., A. I. (1995). Removal of hexavalent chromium anions from solutions by pyrite fines. 1755–1760. Water Res.



8. ANEXOS

ANEXO 1

Valores críticos para la distribución t-student

| v IT | 60% | 75% | 80% | 85% | 90% | 95% | 97.5% | 99% | 99.5% | 99.9% | 99.95% |
|------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|
| v 2T | 20% | 50% | 60% | 70% | 80% | 90% | 95% | 98% | 99% | 99.8% | 99.9% |
| 1 | 0.3249 | 1.0000 | 1.3764 | 1.963 | 3.078 | 6.314 | 12.706 | 31.821 | 63.657 | 318.3 | 636.62 |
| 2 | 0.2887 | 0.8165 | 1.0607 | 1.386 | 1.886 | 2.920 | 4.303 | 6.965 | 9.925 | 22.33 | 31.596 |
| 3 | 0.2767 | 0.7649 | 0.9785 | 1.250 | 1.638 | 2.353 | 3.182 | 4.541 | 5.841 | 10.21 | 12.941 |
| 4 | 0.2707 | 0.7407 | 0.9410 | 1.190 | 1.533 | 2.132 | 2.776 | 3.747 | 4.604 | 7.173 | 8.610 |
| 5 | 0.2672 | 0.7267 | 0.9195 | 1.156 | 1.476 | 2.015 | 2.571 | 3.365 | 4.032 | 5.893 | 6.869 |
| 6 | 0.2648 | 0.7176 | 0.9057 | 1.134 | 1.440 | 1.943 | 2.447 | 3.143 | 3.707 | 5.208 | 5.959 |
| 7 | 0.2632 | 0.7111 | 0.8960 | 1.119 | 1.415 | 1.895 | 2.365 | 2.998 | 3.499 | 4.785 | 5.408 |
| 8 | 0.2619 | 0.7064 | 0.8889 | 1.108 | 1.397 | 1.860 | 2.306 | 2.896 | 3.355 | 4.501 | 5.041 |
| 9 | 0.2610 | 0.7027 | 0.8834 | 1.100 | 1.383 | 1.833 | 2.262 | 2.821 | 3.250 | 4.297 | 4.781 |
| 10 | 0.2602 | 0.6998 | 0.8791 | 1.093 | 1.372 | 1.812 | 2.228 | 2.764 | 3.169 | 4.144 | 4.587 |
| 11 | 0.2596 | 0.6974 | 0.8755 | 1.088 | 1.363 | 1.796 | 2.201 | 2.718 | 3.106 | 4.025 | 4.437 |
| 12 | 0.2590 | 0.6955 | 0.8726 | 1.083 | 1.356 | 1.782 | 2.179 | 2.681 | 3.055 | 3.930 | 4.318 |
| 13 | 0.2586 | 0.6938 | 0.8702 | 1.079 | 1.350 | 1.771 | 2.160 | 2.650 | 3.012 | 3.852 | 4.221 |
| 14 | 0.2582 | 0.6924 | 0.8681 | 1.076 | 1.345 | 1.761 | 2.145 | 2.624 | 2.977 | 3.787 | 4.140 |
| 15 | 0.2579 | 0.6912 | 0.8662 | 1.074 | 1.341 | 1.753 | 2.131 | 2.602 | 2.947 | 3.733 | 4.073 |
| 16 | 0.2576 | 0.6901 | 0.8647 | 1.071 | 1.337 | 1.746 | 2.120 | 2.583 | 2.921 | 3.686 | 4.015 |
| 17 | 0.2573 | 0.6892 | 0.8633 | 1.069 | 1.333 | 1.740 | 2.110 | 2.567 | 2.898 | 3.646 | 3.965 |
| 18 | 0.2571 | 0.6884 | 0.8620 | 1.067 | 1.330 | 1.734 | 2.101 | 2.552 | 2.878 | 3.610 | 3.922 |
| 19 | 0.2569 | 0.6876 | 0.8610 | 1.066 | 1.328 | 1.729 | 2.093 | 2.539 | 2.861 | 3.579 | 3.883 |
| 20 | 0.2567 | 0.6870 | 0.8600 | 1.064 | 1.325 | 1.725 | 2.086 | 2.528 | 2.845 | 3.552 | 3.850 |
| 21 | 0.2566 | 0.6864 | 0.8591 | 1.063 | 1.323 | 1.721 | 2.080 | 2.518 | 2.831 | 3.527 | 3.819 |
| 22 | 0.2564 | 0.6858 | 0.8583 | 1.061 | 1.321 | 1.717 | 2.074 | 2.508 | 2.819 | 3.505 | 3.792 |
| 23 | 0.2563 | 0.6853 | 0.8575 | 1.060 | 1.319 | 1.714 | 2.069 | 2.500 | 2.807 | 3.485 | 3.768 |
| 24 | 0.2562 | 0.6848 | 0.8569 | 1.059 | 1.318 | 1.711 | 2.064 | 2.492 | 2.797 | 3.467 | 3.745 |
| 25 | 0.2561 | 0.6844 | 0.8562 | 1.058 | 1.316 | 1.708 | 2.060 | 2.485 | 2.787 | 3.450 | 3.725 |
| 26 | 0.2560 | 0.6840 | 0.8557 | 1.058 | 1.315 | 1.706 | 2.056 | 2.479 | 2.779 | 3.435 | 3.707 |
| 27 | 0.2559 | 0.6837 | 0.8551 | 1.057 | 1.314 | 1.703 | 2.052 | 2.473 | 2.771 | 3.421 | 3.690 |
| 28 | 0.2558 | 0.6834 | 0.8546 | 1.056 | 1.313 | 1.701 | 2.048 | 2.467 | 2.763 | 3.408 | 3.674 |
| 29 | 0.2557 | 0.6830 | 0.8542 | 1.055 | 1.311 | 1.699 | 2.045 | 2.462 | 2.756 | 3.396 | 3.659 |
| 30 | 0.2556 | 0.6828 | 0.8538 | 1.055 | 1.310 | 1.697 | 2.042 | 2.457 | 2.750 | 3.385 | 3.646 |
| 31 | 0.2556 | 0.6825 | 0.8534 | 1.054 | 1.309 | 1.695 | 2.039 | 2.453 | 2.744 | 3.375 | 3.634 |
| 32 | 0.2555 | 0.6822 | 0.8530 | 1.054 | 1.309 | 1.694 | 2.037 | 2.449 | 2.738 | 3.365 | 3.622 |
| 33 | 0.2554 | 0.6820 | 0.8527 | 1.053 | 1.308 | 1.692 | 2.034 | 2.445 | 2.733 | 3.356 | 3.611 |
| 34 | 0.2553 | 0.6818 | 0.8523 | 1.052 | 1.307 | 1.691 | 2.032 | 2.441 | 2.728 | 3.348 | 3.601 |
| 35 | 0.2553 | 0.6816 | 0.8520 | 1.052 | 1.307 | 1.690 | 2.030 | 2.437 | 2.723 | 3.340 | 3.591 |
| 36 | 0.2552 | 0.6814 | 0.8517 | 1.052 | 1.306 | 1.688 | 2.028 | 2.434 | 2.719 | 3.333 | 3.582 |
| 37 | 0.2551 | 0.6812 | 0.8515 | 1.051 | 1.305 | 1.687 | 2.026 | 2.431 | 2.715 | 3.326 | 3.574 |
| 38 | 0.2551 | 0.6810 | 0.8512 | 1.051 | 1.304 | 1.686 | 2.024 | 2.429 | 2.712 | 3.319 | 3.566 |
| 39 | 0.2550 | 0.6809 | 0.8509 | 1.051 | 1.304 | 1.685 | 2.022 | 2.426 | 2.708 | 3.313 | 3.558 |
| 40 | 0.2550 | 0.6807 | 0.8507 | 1.050 | 1.303 | 1.684 | 2.021 | 2.423 | 2.704 | 3.307 | 3.551 |

ANEXO 2

Valores críticos para la distribución de test “F”

Valores críticos de F para un contraste de una cola ($P = 0.05$).

| v_2 | v_1 | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 15 | 20 | |
| 1 | 161.4 | 199.5 | 215.7 | 224.6 | 230.2 | 234.0 | 236.8 | 238.9 | 240.5 | 241.9 | 243.9 | 245.9 | 248.0 | |
| 2 | 18.51 | 19.00 | 19.16 | 19.25 | 19.30 | 19.33 | 19.35 | 19.37 | 19.38 | 19.40 | 19.41 | 19.43 | 19.45 | |
| 3 | 10.13 | 9.552 | 9.277 | 9.117 | 9.013 | 8.941 | 8.887 | 8.845 | 8.812 | 8.786 | 8.745 | 8.703 | 8.660 | |
| 4 | 7.709 | 6.944 | 6.591 | 6.388 | 6.256 | 6.163 | 6.094 | 6.041 | 5.999 | 5.964 | 5.912 | 5.858 | 5.803 | |
| 5 | 6.608 | 5.786 | 5.409 | 5.192 | 5.050 | 4.950 | 4.876 | 4.818 | 4.772 | 4.735 | 4.678 | 4.619 | 4.558 | |
| 6 | 5.987 | 5.143 | 4.757 | 4.534 | 4.387 | 4.284 | 4.207 | 4.147 | 4.099 | 4.060 | 4.000 | 3.938 | 3.874 | |
| 7 | 5.591 | 4.737 | 4.347 | 4.120 | 3.972 | 3.866 | 3.787 | 3.726 | 3.677 | 3.637 | 3.575 | 3.511 | 3.445 | |
| 8 | 5.318 | 4.459 | 4.066 | 3.838 | 3.687 | 3.581 | 3.500 | 3.438 | 3.388 | 3.347 | 3.284 | 3.218 | 3.150 | |
| 9 | 5.117 | 4.256 | 3.863 | 3.633 | 3.482 | 3.374 | 3.293 | 3.230 | 3.179 | 3.137 | 3.073 | 3.006 | 2.936 | |
| 10 | 4.965 | 4.103 | 3.708 | 3.478 | 3.326 | 3.217 | 3.135 | 3.072 | 3.020 | 2.978 | 2.913 | 2.845 | 2.774 | |
| 11 | 4.844 | 3.982 | 3.587 | 3.357 | 3.204 | 3.095 | 3.012 | 2.948 | 2.896 | 2.854 | 2.788 | 2.719 | 2.646 | |
| 12 | 4.747 | 3.885 | 3.490 | 3.259 | 3.106 | 2.996 | 2.913 | 2.849 | 2.796 | 2.753 | 2.687 | 2.617 | 2.544 | |
| 13 | 4.667 | 3.806 | 3.411 | 3.179 | 3.025 | 2.915 | 2.832 | 2.767 | 2.714 | 2.671 | 2.604 | 2.533 | 2.459 | |
| 14 | 4.600 | 3.739 | 3.344 | 3.112 | 2.958 | 2.848 | 2.764 | 2.699 | 2.646 | 2.602 | 2.534 | 2.463 | 2.388 | |
| 15 | 4.543 | 3.682 | 3.287 | 3.056 | 2.901 | 2.790 | 2.707 | 2.641 | 2.588 | 2.544 | 2.475 | 2.403 | 2.328 | |
| 16 | 4.494 | 3.634 | 3.239 | 3.007 | 2.852 | 2.741 | 2.657 | 2.591 | 2.538 | 2.494 | 2.425 | 2.352 | 2.276 | |
| 17 | 4.451 | 3.592 | 3.197 | 2.965 | 2.810 | 2.699 | 2.614 | 2.548 | 2.494 | 2.450 | 2.381 | 2.308 | 2.230 | |
| 18 | 4.414 | 3.555 | 3.160 | 2.928 | 2.773 | 2.661 | 2.577 | 2.510 | 2.456 | 2.412 | 2.342 | 2.269 | 2.191 | |
| 19 | 4.381 | 3.522 | 3.127 | 2.895 | 2.740 | 2.628 | 2.544 | 2.477 | 2.423 | 2.378 | 2.308 | 2.234 | 2.155 | |
| 20 | 4.351 | 3.493 | 3.098 | 2.866 | 2.711 | 2.599 | 2.514 | 2.447 | 2.393 | 2.348 | 2.278 | 2.203 | 2.124 | |

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.



Valores críticos de F para un contraste de dos colas ($P = 0.05$).

| v_2 | v_1 | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 15 | 20 | |
| 1 | 647.8 | 799.5 | 864.2 | 899.6 | 921.8 | 937.1 | 948.2 | 956.7 | 963.3 | 968.6 | 976.7 | 984.9 | 993.1 | |
| 2 | 38.51 | 39.00 | 39.17 | 39.25 | 39.30 | 39.33 | 39.36 | 39.37 | 39.39 | 39.40 | 39.41 | 39.43 | 39.45 | |
| 3 | 17.44 | 16.04 | 15.44 | 15.10 | 14.88 | 14.73 | 14.62 | 14.54 | 14.47 | 14.42 | 14.34 | 14.25 | 14.17 | |
| 4 | 12.22 | 10.65 | 9.979 | 9.605 | 9.364 | 9.197 | 9.074 | 8.980 | 8.905 | 8.844 | 8.751 | 8.657 | 8.560 | |
| 5 | 10.01 | 8.434 | 7.764 | 7.388 | 7.146 | 6.978 | 6.853 | 6.757 | 6.681 | 6.619 | 6.525 | 6.428 | 6.329 | |
| 6 | 8.813 | 7.260 | 6.599 | 6.227 | 5.988 | 5.820 | 5.695 | 5.600 | 5.523 | 5.461 | 5.366 | 5.269 | 5.168 | |
| 7 | 8.073 | 6.542 | 5.890 | 5.523 | 5.285 | 5.119 | 4.995 | 4.899 | 4.823 | 4.761 | 4.666 | 4.568 | 4.467 | |
| 8 | 7.571 | 6.059 | 5.416 | 5.053 | 4.817 | 4.652 | 4.529 | 4.433 | 4.357 | 4.295 | 4.200 | 4.101 | 3.999 | |
| 9 | 7.209 | 5.715 | 5.078 | 4.718 | 4.484 | 4.320 | 4.197 | 4.102 | 4.026 | 3.964 | 3.868 | 3.769 | 3.667 | |
| 10 | 6.937 | 5.456 | 4.826 | 4.468 | 4.236 | 4.072 | 3.950 | 3.855 | 3.779 | 3.717 | 3.621 | 3.522 | 3.419 | |
| 11 | 6.724 | 5.256 | 4.630 | 4.275 | 4.044 | 3.881 | 3.759 | 3.664 | 3.588 | 3.526 | 3.430 | 3.330 | 3.226 | |
| 12 | 6.554 | 5.096 | 4.474 | 4.121 | 3.891 | 3.728 | 3.607 | 3.512 | 3.436 | 3.374 | 3.277 | 3.177 | 3.073 | |
| 13 | 6.414 | 4.965 | 4.347 | 3.996 | 3.767 | 3.604 | 3.483 | 3.388 | 3.312 | 3.250 | 3.153 | 3.053 | 2.948 | |
| 14 | 6.298 | 4.857 | 4.242 | 3.892 | 3.663 | 3.501 | 3.380 | 3.285 | 3.209 | 3.147 | 3.050 | 2.949 | 2.844 | |
| 15 | 6.200 | 4.765 | 4.153 | 3.804 | 3.576 | 3.415 | 3.293 | 3.199 | 3.123 | 3.060 | 2.963 | 2.862 | 2.756 | |
| 16 | 6.115 | 4.687 | 4.077 | 3.729 | 3.502 | 3.341 | 3.219 | 3.125 | 3.049 | 2.986 | 2.889 | 2.788 | 2.681 | |
| 17 | 6.042 | 4.619 | 4.011 | 3.665 | 3.438 | 3.277 | 3.156 | 3.061 | 2.985 | 2.922 | 2.825 | 2.723 | 2.616 | |
| 18 | 5.978 | 4.560 | 3.954 | 3.608 | 3.382 | 3.221 | 3.100 | 3.005 | 2.929 | 2.866 | 2.769 | 2.667 | 2.559 | |
| 19 | 5.922 | 4.508 | 3.903 | 3.559 | 3.333 | 3.172 | 3.051 | 2.956 | 2.880 | 2.817 | 2.720 | 2.617 | 2.509 | |
| 20 | 5.871 | 4.461 | 3.859 | 3.515 | 3.289 | 3.128 | 3.007 | 2.913 | 2.837 | 2.774 | 2.676 | 2.573 | 2.464 | |

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.

ANEXO 3

Valores tabulados de “C” para el test de Cochran a 1% y 5% de probabilidad

| p | n=2 | | n=3 | | n=4 | | n=5 | | n=6 | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1% | 5% | 1% | 5% | 1% | 5% | 1% | 5% | 1% | 5% |
| 2 | --- | --- | 0,995 | 0,975 | 0,979 | 0,939 | 0,959 | 0,906 | 0,937 | 0,877 |
| 3 | 0,993 | 0,967 | 0,942 | 0,871 | 0,883 | 0,798 | 0,834 | 0,746 | 0,793 | 0,707 |
| 4 | 0,968 | 0,906 | 0,864 | 0,768 | 0,781 | 0,684 | 0,721 | 0,629 | 0,676 | 0,590 |
| 5 | 0,928 | 0,841 | 0,788 | 0,684 | 0,696 | 0,598 | 0,633 | 0,544 | 0,588 | 0,506 |
| 6 | 0,883 | 0,781 | 0,722 | 0,616 | 0,626 | 0,532 | 0,564 | 0,480 | 0,520 | 0,445 |
| 7 | 0,838 | 0,727 | 0,664 | 0,561 | 0,568 | 0,480 | 0,508 | 0,431 | 0,466 | 0,397 |
| 8 | 0,794 | 0,680 | 0,615 | 0,516 | 0,521 | 0,438 | 0,463 | 0,391 | 0,423 | 0,360 |
| 9 | 0,754 | 0,638 | 0,573 | 0,478 | 0,481 | 0,403 | 0,425 | 0,358 | 0,387 | 0,329 |
| 10 | 0,718 | 0,602 | 0,536 | 0,445 | 0,447 | 0,373 | 0,393 | 0,331 | 0,357 | 0,303 |
| 11 | 0,684 | 0,570 | 0,504 | 0,417 | 0,418 | 0,348 | 0,366 | 0,308 | 0,332 | 0,281 |
| 12 | 0,653 | 0,541 | 0,475 | 0,392 | 0,392 | 0,326 | 0,343 | 0,288 | 0,310 | 0,262 |
| 13 | 0,624 | 0,515 | 0,450 | 0,371 | 0,369 | 0,307 | 0,322 | 0,271 | 0,291 | 0,243 |
| 14 | 0,599 | 0,492 | 0,427 | 0,352 | 0,349 | 0,291 | 0,304 | 0,255 | 0,274 | 0,232 |
| 15 | 0,575 | 0,471 | 0,407 | 0,335 | 0,332 | 0,276 | 0,288 | 0,242 | 0,259 | 0,220 |
| 16 | 0,553 | 0,452 | 0,388 | 0,319 | 0,316 | 0,262 | 0,274 | 0,230 | 0,246 | 0,208 |
| 17 | 0,532 | 0,434 | 0,372 | 0,305 | 0,301 | 0,250 | 0,261 | 0,219 | 0,234 | 0,198 |
| 18 | 0,514 | 0,418 | 0,356 | 0,293 | 0,288 | 0,240 | 0,249 | 0,209 | 0,223 | 0,189 |
| 19 | 0,496 | 0,403 | 0,343 | 0,281 | 0,276 | 0,230 | 0,238 | 0,200 | 0,214 | 0,181 |
| 20 | 0,480 | 0,389 | 0,330 | 0,270 | 0,265 | 0,220 | 0,229 | 0,192 | 0,205 | 0,174 |
| 21 | 0,465 | 0,377 | 0,318 | 0,261 | 0,255 | 0,212 | 0,220 | 0,185 | 0,197 | 0,167 |
| 22 | 0,450 | 0,365 | 0,307 | 0,252 | 0,246 | 0,204 | 0,212 | 0,178 | 0,189 | 0,160 |
| 23 | 0,437 | 0,354 | 0,297 | 0,243 | 0,238 | 0,197 | 0,204 | 0,172 | 0,182 | 0,155 |
| 24 | 0,425 | 0,343 | 0,287 | 0,235 | 0,230 | 0,191 | 0,197 | 0,166 | 0,176 | 0,149 |
| 25 | 0,413 | 0,334 | 0,278 | 0,228 | 0,222 | 0,185 | 0,190 | 0,160 | 0,170 | 0,144 |
| 26 | 0,402 | 0,325 | 0,270 | 0,221 | 0,215 | 0,179 | 0,184 | 0,155 | 0,164 | 0,140 |
| 27 | 0,391 | 0,316 | 0,262 | 0,215 | 0,209 | 0,173 | 0,179 | 0,150 | 0,159 | 0,135 |
| 28 | 0,382 | 0,308 | 0,255 | 0,209 | 0,202 | 0,168 | 0,173 | 0,146 | 0,154 | 0,131 |
| 29 | 0,372 | 0,300 | 0,248 | 0,203 | 0,196 | 0,164 | 0,168 | 0,142 | 0,150 | 0,127 |
| 30 | 0,363 | 0,293 | 0,241 | 0,198 | 0,191 | 0,159 | 0,164 | 0,138 | 0,145 | 0,124 |
| 31 | 0,355 | 0,286 | 0,235 | 0,193 | 0,186 | 0,155 | 0,159 | 0,134 | 0,141 | 0,120 |
| 32 | 0,347 | 0,280 | 0,229 | 0,188 | 0,181 | 0,151 | 0,155 | 0,131 | 0,138 | 0,117 |
| 33 | 0,339 | 0,273 | 0,224 | 0,184 | 0,177 | 0,147 | 0,151 | 0,127 | 0,134 | 0,114 |
| 34 | 0,332 | 0,267 | 0,218 | 0,179 | 0,172 | 0,144 | 0,147 | 0,124 | 0,131 | 0,111 |
| 35 | 0,325 | 0,262 | 0,213 | 0,175 | 0,168 | 0,140 | 0,144 | 0,121 | 0,127 | 0,108 |
| 36 | 0,318 | 0,256 | 0,208 | 0,172 | 0,165 | 0,137 | 0,140 | 0,118 | 0,124 | 0,106 |
| 37 | 0,312 | 0,251 | 0,204 | 0,168 | 0,161 | 0,134 | 0,137 | 0,116 | 0,121 | 0,103 |
| 38 | 0,306 | 0,246 | 0,200 | 0,164 | 0,157 | 0,131 | 0,134 | 0,113 | 0,119 | 0,101 |

ANEXO 4

Valores tabulados de “G” para el test de Grubb al 1% y al 5 % de probabilidad

| p | Prueba simple de un solo valor alejado | | Prueba doble de dos valores alejados | |
|----|--|--------------|--------------------------------------|---------|
| | Arriba de 1% | Arriba de 5% | Bajo 1% | Bajo 5% |
| 3 | 1,155 | 1,154 | --- | --- |
| 4 | 1,496 | 1,481 | 0,0000 | 0,0002 |
| 5 | 1,764 | 1,715 | 0,0018 | 0,0090 |
| 6 | 1,973 | 1,887 | 0,0116 | 0,0349 |
| 7 | 2,139 | 2,020 | 0,0308 | 0,0708 |
| 8 | 2,274 | 2,127 | 0,0563 | 0,1101 |
| 9 | 2,387 | 2,215 | 0,0851 | 0,1492 |
| 10 | 2,482 | 2,290 | 0,1150 | 0,1864 |
| 11 | 2,564 | 2,355 | 0,1448 | 0,2213 |
| 12 | 2,636 | 2,412 | 0,1738 | 0,2537 |
| 13 | 2,699 | 2,462 | 0,2016 | 0,2836 |
| 14 | 2,755 | 2,507 | 0,2280 | 0,3112 |
| 15 | 2,806 | 2,548 | 0,2530 | 0,3367 |
| 16 | 2,852 | 2,586 | 0,2767 | 0,3603 |
| 17 | 2,894 | 2,620 | 0,2990 | 0,3822 |
| 18 | 2,932 | 2,652 | 0,3200 | 0,4025 |
| 19 | 2,968 | 2,681 | 0,3398 | 0,4214 |
| 20 | 3,001 | 2,708 | 0,3585 | 0,4391 |
| 21 | 3,031 | 2,734 | 0,3761 | 0,4556 |
| 22 | 3,060 | 2,758 | 0,3927 | 0,4711 |
| 23 | 3,087 | 2,780 | 0,4019 | 0,4857 |
| 24 | 3,112 | 2,802 | 0,4234 | 0,4994 |
| 25 | 3,135 | 2,822 | 0,4376 | 0,5123 |
| 26 | 3,158 | 2,841 | 0,4510 | 0,5245 |
| 27 | 3,179 | 2,859 | 0,4638 | 0,5360 |
| 28 | 3,199 | 2,876 | 0,4759 | 0,5470 |
| 29 | 3,218 | 2,893 | 0,4875 | 0,5574 |
| 30 | 3,236 | 2,908 | 0,4985 | 0,5672 |
| 31 | 3,253 | 2,924 | 0,5091 | 0,5766 |
| 32 | 3,270 | 2,938 | 0,5192 | 0,5856 |
| 33 | 3,286 | 2,952 | 0,5288 | 0,5941 |
| 34 | 3,301 | 2,965 | 0,5381 | 0,6023 |
| 35 | 3,316 | 2,978 | 0,5469 | 0,6101 |
| 36 | 3,330 | 2,991 | 0,5554 | 0,6175 |
| 37 | 3,343 | 3,003 | 0,5636 | 0,6247 |
| 38 | 3,356 | 3,014 | 0,5714 | 0,6316 |

ANEXO 5

Valores establecidos por la AOAC para porcentajes de recuperación

| ANALITO | UNIDAD | RECUPERACIÓN ESTIMADO (%) |
|-----------|---------|---------------------------|
| 100 | 100% | 98 – 102 |
| 10 | 10% | 98 – 102 |
| 1 | 1% | 97 - 103 |
| 0,1 | 0,10% | 95 – 105 |
| 0,01 | 100 ppm | 90 – 107 |
| 0,001 | 10 ppm | 80 – 110 |
| 0,0001 | 1 ppm | 80 – 110 |
| 0,00001 | 100 ppb | 80 – 110 |
| 0,000001 | 10 ppb | 60 – 115 |
| 0,0000001 | 1 ppb | 40 – 120 |

ANEXO 6

EQUIPOS UTILIZADOS

CARACTERÍSTICAS DEL ESPECTROFOTÓMETRO GENESYS 10 S

Especificaciones de la serie GENESYS 10S

| | GENESYS 10S UV-Vis | GENESYS 10S Vis |
|-------------------------------------|---|--|
| Diseño óptico | Doble haz - Detector interno de referencia | Haz simple |
| Ancho de banda espectral | 1,8 nm | 5,0 nm |
| Fuente de luz (vida útil típica) | Lámpara flash de xenón (5 años; 3 años garantizados) | Lámpara halógena de tungsteno (1.000 horas) |
| Detector | Doble Fotodiodos de silicio | Fotodiodo de silicio |
| Longitud de onda: | | |
| Rango | 190 - 1.100 nm | 325 - 1.100 nm |
| Exactitud | ± 1,0 nm | |
| Repetibilidad | ± 0,5 nm | |
| Velocidad de rotación | 11.000 nm/min | |
| Velocidad de barrido | 10 - 4.200 nm/min | |
| Intervalo de datos | 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 nm | 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 nm |
| Fotometría: | | |
| Rango de linealidad | Hasta 3,5 A a 260 nm | Hasta 3,0 A a 340 nm |
| Pantalla | -0,5 - 5,0 A; -1,5 - 125% T; ± 9999 C | -0,1 - 3,0 A; -0,3 - 125% T; ± 9999 C |
| Exactitud | ± 0,005 A a 1,0 A 0,010 A K ₂ Cr ₂ O ₇ | 0,5% o ± 0,005 A, la que sea mayor, hasta 2 A |
| Ruido | < 0,00025 a 0,0 A < 0,00050 a 1,0 A < 0,00080 a 2,0 A RMS a 260 nm | < 0,001 A a 0,0 A < 0,002 A a 2,0 A Pico a pico a 340 nm |
| Corrimiento | < 0,0005 A/h | 0,002 A/hr tras calentamiento |
| Luz difusa | < 0,08% T a 220, 340 nm (NaI, NaNO ₂) < 1,0% T 198 nm (KCl) | < 1,0% T a 340, y 400 nm |
| Pantalla | Gráfica con retroiluminación LED. 9,7 x 7,1 cm (3,8 x 2,8 pulg.) | |
| Teclado | Membrana sellada, con teclas de respuesta táctiles | |
| Impresora (opcional) | Interna, 40 columnas (texto y gráficos) Externa, USB (HP PCL 3 o superior) | |
| Conectividad | Puerto USB tipo A para unidad de memoria USB (panel frontal) Puerto USB tipo B para conectividad con PC opcional (panel trasero) Puerto USB tipo A para impresora externa (panel trasero) | |
| Dimensiones | 30 x 40 x 25 cm (11,8 x 15,7 x 9,8 pulg.) (ancho x fondo x alto) | |
| Peso | 8,6 kg (19 libras) | |
| Requisitos eléctricos | 100 - 240 V con selección automática; 50 - 60 Hz | |

CARACTERÍSTICAS DEL ESPECTROFOTÓMETRO SPECTROQUANT[®] PHARO 300

| | | Especificaciones técnicas |
|--|---|--|
| 7 Especificaciones técnicas | | |
| 7.1 Características de medición | | |
| Principio de medición | Fotómetro espectral con medición de la absorción de un rayo de referencia | |
| Fuente luminosa | Tipo de lámpara | Lámpara flash de xenon |
| | vida útil media | 5×10^8 flash, corresponde a mínimo 13000 h en funcionamiento ininterrumpido |
| Monocromador | tipo | monocromador reticulado con motor paso a paso |
| | Rango de longitud de onda | 190 - 1100 nm |
| | Velocidad máxima de escaneo | aprox. 3300 nm/min |
| | Calibración de longitudes de onda | automáticamente |
| | Exactitud | ± 1 nm |
| | Reproducibilidad | $\pm 0,5$ nm |
| | Resolución | 1 nm |
| | Ancho de banda espectral | 4 nm |
| Medición fotométrica | Sensor de luz | fotoiodo |
| | Rango de medición | $E = -3.300$ hasta $E = +3.300$ |
| | Linealidad: | $< 1\%$ con $E \leq 2,000$ |
| | Exactitud | $- 0,003 E$ con $E < 0,600$ |
| | | $- 0,5\%$ de la indicación con $0,600 \leq E \leq 2,000$ |
| | Reproducibilidad | $\pm 0,002$ con $E = 1,000$ |
| | Resolución | $\Delta E = 0,001$ |
| | Luz difusa | $< 0,1\%$ transmisión a 340 y 408 nm |

ESPECTROFOTÓMETRO GENESYS 10S



ESPECTROFOTÓMETRO ESPECTROQUANT PHARO 300



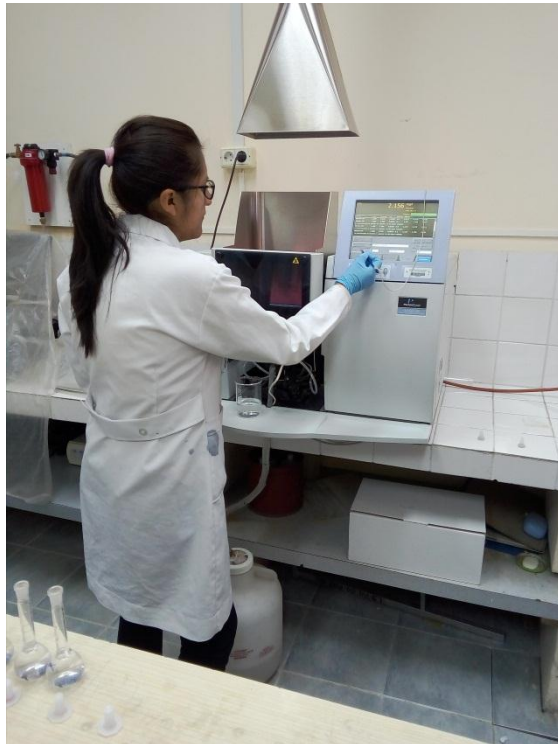
BALANZA DIGITAL SPAN



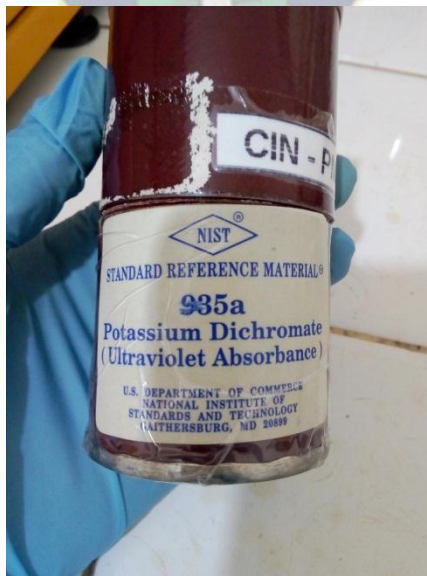
MULTIPARÁMETRO HACH



ANALYST 200 PERKIN ELMER



SRM 935a NIST



ANEXO 7

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA



MEDICIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS IN SITU



FILTRACIÓN DE LA MUESTRA

ANEXO 8

PROCESO DE VALIDACIÓN



CURVA DE CALIBRACIÓN SIN MATRIZ



CURVA DE CALIBRACIÓN CON MATRIZ

ANEXO 9

DATOS DE LA CINÉTICA DE REACCIÓN

| Concentración | 0,020 mgCr(VI)/L | 0,078 mgCr(VI)/L | 0,245 mgCr(VI)/L |
|---------------|------------------|------------------|------------------|
| Tiempo (min) | Absorbancias | | |
| 0 | 0,014 | 0,047 | 0,144 |
| 1 | 0,016 | 0,062 | 0,179 |
| 2 | 0,017 | 0,066 | 0,187 |
| 3 | 0,017 | 0,067 | 0,190 |
| 4 | 0,018 | 0,068 | 0,191 |
| 5 | 0,018 | 0,068 | 0,192 |
| 6 | 0,018 | 0,068 | 0,192 |
| 7 | 0,018 | 0,069 | 0,193 |
| 8 | 0,019 | 0,069 | 0,193 |
| 9 | 0,019 | 0,069 | 0,194 |
| 10 | 0,019 | 0,069 | 0,195 |
| 11 | 0,019 | 0,069 | 0,195 |
| 12 | 0,020 | 0,069 | 0,195 |
| 13 | 0,020 | 0,069 | 0,196 |
| 14 | 0,020 | 0,070 | 0,196 |
| 15 | 0,020 | 0,070 | 0,196 |
| 16 | 0,020 | 0,070 | 0,197 |
| 17 | 0,020 | 0,070 | 0,197 |
| 18 | 0,020 | 0,070 | 0,198 |
| 19 | 0,020 | 0,070 | 0,198 |
| 20 | 0,020 | 0,071 | 0,198 |
| 21 | 0,020 | 0,071 | 0,199 |
| 22 | 0,021 | 0,071 | 0,199 |
| 23 | 0,021 | 0,071 | 0,199 |
| 24 | 0,021 | 0,071 | 0,199 |
| 25 | 0,021 | 0,071 | 0,200 |
| 26 | 0,021 | 0,071 | 0,200 |
| 27 | 0,021 | 0,071 | 0,200 |
| 28 | 0,021 | 0,072 | 0,200 |
| 29 | 0,021 | 0,072 | 0,201 |
| 30 | 0,022 | 0,072 | 0,201 |
| 31 | 0,022 | 0,072 | 0,201 |
| 32 | 0,022 | 0,072 | 0,201 |
| 33 | 0,022 | 0,072 | 0,201 |

| | | | |
|----|-------|-------|-------|
| 34 | 0,022 | 0,072 | 0,202 |
| 35 | 0,022 | 0,073 | 0,202 |
| 36 | 0,022 | 0,073 | 0,202 |
| 37 | 0,022 | 0,073 | 0,202 |
| 38 | 0,022 | 0,074 | 0,202 |
| 39 | 0,022 | 0,073 | 0,203 |
| 40 | 0,023 | 0,073 | 0,203 |
| 41 | 0,022 | 0,073 | 0,203 |
| 42 | 0,023 | 0,073 | 0,203 |
| 43 | 0,023 | 0,073 | 0,203 |
| 44 | 0,023 | 0,073 | 0,203 |
| 45 | 0,023 | 0,074 | 0,204 |
| 46 | 0,023 | 0,074 | 0,204 |
| 47 | 0,023 | 0,074 | 0,204 |
| 48 | 0,023 | 0,073 | 0,204 |
| 49 | 0,023 | 0,074 | 0,204 |
| 50 | 0,023 | 0,074 | 0,204 |
| 51 | 0,024 | 0,074 | 0,205 |
| 52 | 0,024 | 0,074 | 0,205 |
| 53 | 0,023 | 0,074 | 0,205 |
| 54 | 0,024 | 0,074 | 0,205 |
| 55 | 0,024 | 0,074 | 0,205 |
| 56 | 0,024 | 0,074 | 0,205 |
| 57 | 0,025 | 0,074 | 0,205 |
| 58 | 0,025 | 0,074 | 0,205 |
| 59 | 0,025 | 0,074 | 0,205 |
| 60 | 0,024 | 0,074 | 0,206 |



ANEXO 10

Análisis de los mínimos cuadrados para la linealidad del sistema

| Concentración mg Cr(VI)/L X_i | Absorbancia Y_i | $(X_i - \bar{X})^2$ | $(Y_i - \bar{Y})^2$ | $(X_i - \bar{X})^2(Y_i - \bar{Y})^2$ | X_i^2 |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------------|---------|
| 0,039 | 0,037 | 0,0052 | 0,0039 | 0,0000202 | 0,002 |
| 0,039 | 0,039 | 0,0052 | 0,0037 | 0,0000191 | 0,002 |
| 0,039 | 0,042 | 0,0052 | 0,0033 | 0,0000171 | 0,002 |
| 0,039 | 0,035 | 0,0052 | 0,0042 | 0,0000220 | 0,002 |
| 0,039 | 0,044 | 0,0052 | 0,0031 | 0,0000161 | 0,002 |
| 0,039 | 0,036 | 0,0052 | 0,0040 | 0,0000209 | 0,002 |
| 0,059 | 0,054 | 0,0027 | 0,0021 | 0,0000057 | 0,003 |
| 0,059 | 0,051 | 0,0027 | 0,0023 | 0,0000063 | 0,003 |
| 0,059 | 0,057 | 0,0027 | 0,0019 | 0,0000050 | 0,003 |
| 0,059 | 0,051 | 0,0027 | 0,0024 | 0,0000064 | 0,003 |
| 0,059 | 0,063 | 0,0027 | 0,0014 | 0,0000037 | 0,003 |
| 0,059 | 0,053 | 0,0027 | 0,0022 | 0,0000060 | 0,003 |
| 0,078 | 0,069 | 0,0011 | 0,0009 | 0,0000010 | 0,006 |
| 0,078 | 0,071 | 0,0011 | 0,0008 | 0,0000009 | 0,006 |
| 0,078 | 0,086 | 0,0011 | 0,0002 | 0,0000002 | 0,006 |
| 0,078 | 0,075 | 0,0011 | 0,0006 | 0,0000007 | 0,006 |
| 0,078 | 0,075 | 0,0011 | 0,0006 | 0,0000007 | 0,006 |
| 0,078 | 0,069 | 0,0011 | 0,0009 | 0,0000010 | 0,006 |
| 0,098 | 0,087 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0000000 | 0,010 |
| 0,098 | 0,099 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000000 | 0,010 |
| 0,098 | 0,094 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000000 | 0,010 |
| 0,098 | 0,085 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0000000 | 0,010 |
| 0,098 | 0,094 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000000 | 0,010 |
| 0,098 | 0,085 | 0,0002 | 0,0002 | 0,0000000 | 0,010 |

| | | | | | |
|------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|--|----------------|
| 0,147 | 0,127 | 0,0013 | 0,0007 | 0,0000009 | 0,022 |
| 0,147 | 0,130 | 0,0013 | 0,0009 | 0,0000012 | 0,022 |
| 0,147 | 0,135 | 0,0013 | 0,0013 | 0,0000016 | 0,022 |
| 0,147 | 0,133 | 0,0013 | 0,0011 | 0,0000014 | 0,022 |
| 0,147 | 0,136 | 0,0013 | 0,0013 | 0,0000017 | 0,022 |
| 0,147 | 0,125 | 0,0013 | 0,0007 | 0,0000008 | 0,022 |
| 0,245 | 0,203 | 0,0180 | 0,0106 | 0,0001901 | 0,060 |
| 0,245 | 0,209 | 0,0180 | 0,0119 | 0,0002142 | 0,060 |
| 0,245 | 0,213 | 0,0180 | 0,0127 | 0,0002289 | 0,060 |
| 0,245 | 0,210 | 0,0180 | 0,0121 | 0,0002169 | 0,060 |
| 0,245 | 0,214 | 0,0180 | 0,0130 | 0,0002329 | 0,060 |
| 0,245 | 0,205 | 0,0180 | 0,0111 | 0,0002001 | 0,060 |
| 0,111 | 0,100 | 0,1704 | 0,1167 | 0,0014441 | 0,614 |
| \bar{X} | \bar{Y} | $\Sigma(X_i - \bar{X})^2$ | $\Sigma(Y_i - \bar{Y})^2$ | $\Sigma(X_i - \bar{X})^2(Y_i - \bar{Y})^2$ | ΣX_i^2 |
| 3,996 | 3,592 | | | | |
| ΣX_i | ΣY_i | | | | |
| 15,968 | 12,900 | | | | |
| $(\Sigma X_i)^2$ | $(\Sigma Y_i)^2$ | | | | |



ANEXO 11

Análisis de los mínimos cuadrados de los datos sin matriz.

| Concentración mg Cr (VI)/L | Absorbancia Yi | Concentración Real Xi | Y predicho | Residuo | Residuo^2 |
|-------------------------------|-------------------|--------------------------|------------|---------|-----------|
| 0,039 | 0,037 | 0,035 | 0,040 | -0,0029 | 0,000009 |
| 0,039 | 0,039 | 0,037 | 0,040 | -0,0013 | 0,000002 |
| 0,039 | 0,042 | 0,042 | 0,040 | 0,0021 | 0,000004 |
| 0,039 | 0,035 | 0,032 | 0,040 | -0,0056 | 0,000031 |
| 0,039 | 0,044 | 0,044 | 0,040 | 0,0037 | 0,000014 |
| 0,039 | 0,036 | 0,034 | 0,040 | -0,0039 | 0,000015 |
| 0,059 | 0,054 | 0,055 | 0,057 | -0,0031 | 0,000010 |
| 0,059 | 0,051 | 0,052 | 0,057 | -0,0054 | 0,000029 |
| 0,059 | 0,057 | 0,059 | 0,057 | -0,0001 | 0,000000 |
| 0,059 | 0,051 | 0,052 | 0,057 | -0,0058 | 0,000033 |
| 0,059 | 0,063 | 0,067 | 0,057 | 0,0062 | 0,000039 |
| 0,059 | 0,053 | 0,054 | 0,057 | -0,0041 | 0,000017 |
| 0,078 | 0,069 | 0,074 | 0,072 | -0,0034 | 0,000012 |
| 0,078 | 0,071 | 0,077 | 0,072 | -0,0011 | 0,000001 |
| 0,078 | 0,086 | 0,094 | 0,072 | 0,0132 | 0,000175 |
| 0,078 | 0,075 | 0,081 | 0,072 | 0,0026 | 0,000007 |
| 0,078 | 0,075 | 0,082 | 0,072 | 0,0029 | 0,000008 |
| 0,078 | 0,069 | 0,074 | 0,072 | -0,0031 | 0,000010 |
| 0,098 | 0,087 | 0,095 | 0,089 | -0,0023 | 0,000005 |
| 0,098 | 0,099 | 0,110 | 0,089 | 0,0101 | 0,000101 |
| 0,098 | 0,094 | 0,104 | 0,089 | 0,0047 | 0,000022 |
| 0,098 | 0,085 | 0,094 | 0,089 | -0,0036 | 0,000013 |
| 0,098 | 0,094 | 0,105 | 0,089 | 0,0054 | 0,000029 |
| 0,098 | 0,085 | 0,094 | 0,089 | -0,0036 | 0,000013 |
| 0,147 | 0,127 | 0,144 | 0,129 | -0,0027 | 0,000007 |

| | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|---------|-----------------|
| 0,147 | 0,130 | 0,148 | 0,129 | 0,0010 | 0,000001 |
| 0,147 | 0,135 | 0,154 | 0,129 | 0,0060 | 0,000036 |
| 0,147 | 0,133 | 0,151 | 0,129 | 0,0033 | 0,000011 |
| 0,147 | 0,136 | 0,155 | 0,129 | 0,0070 | 0,000048 |
| 0,147 | 0,125 | 0,142 | 0,129 | -0,0040 | 0,000016 |
| 0,245 | 0,203 | 0,236 | 0,210 | -0,0076 | 0,000057 |
| 0,245 | 0,209 | 0,244 | 0,210 | -0,0012 | 0,000002 |
| 0,245 | 0,213 | 0,248 | 0,210 | 0,0024 | 0,000006 |
| 0,245 | 0,210 | 0,244 | 0,210 | -0,0006 | 0,000000 |
| 0,245 | 0,214 | 0,249 | 0,210 | 0,0034 | 0,000012 |
| 0,245 | 0,205 | 0,239 | 0,210 | -0,0049 | 0,000024 |
| SUMA | | | | | 0,000820 |
| RSD1 | | | | | 0,004910 |



ANEXO 12

Análisis de los mínimos cuadrados de los datos con matriz.

| Concentración mg Cr (VI)/L | Absorbancia Yi | Concentración real Xi | Y predicho | Residuo | Residuo ² |
|-------------------------------|-------------------|--------------------------|------------|-------------|----------------------|
| 0,039 | 0,097 | 0,043 | 0,094 | 0,0028 | 0,000008 |
| 0,039 | 0,097 | 0,043 | 0,094 | 0,0028 | 0,000008 |
| 0,039 | 0,096 | 0,041 | 0,094 | 0,0018 | 0,000003 |
| 0,059 | 0,108 | 0,058 | 0,109 | -0,0008 | 0,000001 |
| 0,059 | 0,107 | 0,056 | 0,109 | -0,0018 | 0,000003 |
| 0,059 | 0,108 | 0,058 | 0,109 | -0,0008 | 0,000001 |
| 0,078 | 0,122 | 0,077 | 0,123 | -0,0008 | 0,000001 |
| 0,078 | 0,122 | 0,077 | 0,123 | -0,0008 | 0,000001 |
| 0,078 | 0,123 | 0,078 | 0,123 | 0,0002 | 0,000000 |
| 0,098 | 0,135 | 0,095 | 0,137 | -0,0024 | 0,000006 |
| 0,098 | 0,136 | 0,096 | 0,137 | -0,0014 | 0,000002 |
| 0,098 | 0,135 | 0,095 | 0,137 | -0,0024 | 0,000006 |
| 0,147 | 0,173 | 0,147 | 0,173 | -0,0003 | 0,000000 |
| 0,147 | 0,174 | 0,148 | 0,173 | 0,0007 | 0,000001 |
| 0,147 | 0,175 | 0,149 | 0,173 | 0,0017 | 0,000003 |
| 0,245 | 0,245 | 0,245 | 0,245 | 0,0000 | 0,000000 |
| 0,245 | 0,245 | 0,245 | 0,245 | 0,0000 | 0,000000 |
| 0,245 | 0,245 | 0,245 | 0,245 | 0,0000 | 0,000000 |
| 0,111 | 0,147 | | | SUMA | 0,000042 |
| | | | | RSD2 | 0,001620 |