

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO”  
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA**



**Trabajo de Monografía para optar al título de  
Licenciado en Química pura**

Título del estudio:

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO PARA LA DETERMINACIÓN DE CROMO HEXAVALENTE EN AGUAS NATURALES POR COLORIMETRIA UTILIZADO EN EL CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN EN RECURSOS ACUÁTICOS DE NICARAGUA CIRACUNAN, MANAGUA, ENERO-DICIEMBRE 2011.”**

**Elaborado por:**

Br. Eymara Elizabeth Mercado Sánchez

**Tutor(a):**

Msc. Junette Molina Marcia.

**Managua - Nicaragua, Noviembre 2012.**



## **CARTA DEL TUTOR**

Dirección del Departamento de Química y Tribunal Examinador UNAN-Managua:

Presento ante ustedes el trabajo de tesis basado en la validación del método desarrollado para la determinación de Cromo hexavalente en aguas naturales por colorimetría utilizado en el centro para la investigación en recursos acuáticos de Nicaragua CIRA-UNAN, Managua, Enero-Diciembre 2011. El cual fue realizado por la Br. Eymara Elizabeth Mercado Sánchez, para optar al título de licenciado en Química pura.

El presente estudio abarca aspectos significativos de la aplicación de la química en el mundo laboral actual, aspectos tales como el análisis químico cualitativo-cuantitativo de muestras ambientales, aplicación del análisis instrumental y el control estadístico de la calidad en el desarrollo de una metodología analítica. El hecho de enfocar estos aspectos tan importantes en la aplicación integral de la química como ciencia, permite que este estudio sea de utilidad como material de consulta para los actuales estudiantes de la carrera de química.

Durante el desarrollo del estudio la bachiller Mercado realizó un excelente esfuerzo en el cumplimiento de cada una de las etapas del presente trabajo. Asimismo realizó las correcciones orientadas por el tribunal examinador una vez realizada la pre-defensa y la defensa del estudio.

Por lo que considero que una vez concluido todo este proceso se le habilita a la Bachiller Mercado Sánchez para optar al título antes propuesto.

---

**MSc. Junette Molina Marcia**  
**Tutor**

---

## Índice de Contenido

1. ASPECTOS GENERALES .....	8
1.1 INTRODUCCIÓN .....	9
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	10
1.3 OBJETIVOS .....	12
1.4 ALCANCES .....	13
1.4.1 Alcance del método analítico para determinar Cromo Hexavalente .....	13
1.4.2 Alcance de la validación .....	13
2. MARCO TEÓRICO .....	14
2.1 CROMO .....	15
2.1.1 Descripción general .....	15
2.1.2 Generalidades de los metales de transición .....	15
2.1.3 Estabilidad de los estados de oxidación de los metales de transición del período 4 .....	16
2.2 COMPUESTOS DE CROMO .....	16
2.2.1 CROMATOS Y DICROMATOS .....	16
2.3 CROMO HEXAVALENTE .....	17
2.4 TOXICIDAD DEL CROMO HEXAVALENTE EN HUMANOS .....	18
2.4.1 Sus efectos sobre la salud .....	18
2.5 TRANSPORTE EN AGUAS NATURALES .....	19
2.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV/VIS .....	20
2.6.1 Ley de Lambert-Beer .....	21
2.7 VALIDACIÓN .....	22
2.7.1 Validación de un método analítico .....	22
2.7.2 Herramientas de validación .....	22
2.8 PARÁMETROS DE EFICIENCIA .....	24
3. HIPÓTESIS .....	27
3.1 HIPÓTESIS .....	28
4. DISEÑO METODOLÓGICO .....	29
4.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO .....	30



4.2 TIPO DE ESTUDIO .....	30
4.3 TIEMPO DE EJECUCIÓN .....	30
4.4 UNIVERSO.....	30
4.5 MUESTRAS.....	31
4.6 VARIABLES .....	34
4.6.1. Operacionalización de variables .....	34
4.7 MATERIAL Y MÉTODO.....	35
4.7.1 Método de recolección de la información.....	35
4.7.2 Análisis estadístico de la información.....	35
4.8 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN .....	36
4.8.1 Linealidad.....	36
4.8.2 Rango de trabajo.....	36
4.8.3 Exactitud.....	36
4.8.4 Precisión en condiciones de:.....	36
4.8.4.1 Repetibilidad.....	36
4.8.4.2 Precisión intermedia.....	37
4.9 MATERIALES.....	37
4.9.1 Materiales.....	37
4.9.2 Instrumentación.....	38
4.10 MÉTODO DE ANÁLISIS.....	38
4.10.1 Reactivos.....	38
4.10.2 Preparación de soluciones.....	39
4.10.3 Calibración del método.....	40
4.11 METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LIMITE DE DETECCIÓN Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN .....	43
4.12 RANGO DE TRABAJO .....	44
4.13 LINEALIDAD .....	44
4.14 EXACTITUD.....	45
4.15 PRECISIÓN.....	45
4.15.1 Precisión en condiciones de precisión intermedia .....	45
4.15.2 Repetibilidad.....	46



5. RESULTADOS .....	47
5.1 LÍMITE DE DETECCIÓN .....	48
5.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN .....	50
5.3 RANGO DE TRABAJO .....	50
5.4 LINEALIDAD .....	51
5.5 EXACTITUD.....	59
5.6 PRECISIÓN .....	62
5.7 PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD .....	67
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	69
6.1 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	70
7. CONCLUSIONES .....	72
8. RECOMENDACIONES .....	74

### **Índice de Tablas**

Tabla 1. Curva de calibración utilizada para determinar el límite de detección. ....	48
Tabla 2. Mediciones de absorbancia de los blancos independientes. ....	49
Tabla 3. Lectura de absorbancias de estándares de calibración de 10 y 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ .....	50
Tabla 4. Lecturas de los estándares de calibración. ....	51
Tabla 5. Curva de calibración promedio.....	52
Tabla 6. Tratamiento estadístico de los resultados. ....	53
Tabla 7. Cálculo de los residuales. ....	56
Tabla 8. Lectura de curva de calibración.....	59
Tabla 9. Resultados de las concentraciones de las absorbancias y concentraciones obtenidas de las mediciones de la muestra C. ....	60
Tabla 10. Curva de calibración del analista A.....	62
Tabla 11. Resultados de la concentración de la muestra A del analista A.....	63
Tabla 12. Curva de calibración del analista B. ....	63
Tabla 13. Resultados de la concentración de la muestra A del analista B. ....	64
Tabla 14. Curva de calibración del analista C. ....	64
Tabla 15. Resultados de la concentración de la muestra A del analista C. ....	65
Tabla 16. Resultados del Test de Grubbs. ....	66
Tabla 17. Resultados del Test de Hartley. ....	66
Tabla 18. Resultados de curva de calibración utilizada para evaluar Precisión en condiciones de repetibilidad. ....	67
Tabla 19. Resultados de la concentración de la muestra A.....	68



## **Dedicatoria**

*Dedico este logro a mi primer y más grande amor, mi camino, mi verdad y mi vida  
“JESUCRISTO” sin ti nada soy y nada puedo hacer.*

*A mi madre Emelda y mi padre Ricardo, cuan bendecida he sido por tenerlos hasta el día  
de hoy a mi lado, esto es especialmente para ustedes.*

*Eymara Elizabeth Mercado Sánchez.*



## **Agradecimientos**

*A Dios mi señor por:*

*Concederme el don de la vida y la salud*

*Guiarme, respaldarme siempre y rodearme de personas  
que me han brindado un gran apoyo.*

*Mi familia quienes han estado siempre a mi lado.*

*Obtener el apoyo del Centro para la Investigación en  
Recursos Acuáticos de Nicaragua pues sin ellos no hubiese  
sido posible la realización de este estudio.*



Un sentimiento muy especial de agradecimiento a quienes me apoyaron y estuvieron conmigo durante esta etapa tan importante y quienes de alguna manera me alentaron a llegar hasta aquí:

**MSc. Junette Molina Marcia**

Tutora y Amiga, gracias por su compromiso, cariño y apoyo, por escucharme y aconsejarme siempre, por creer en mí y por su decidido esfuerzo de alentarme a dar siempre lo mejor de mí como profesional y como persona.

**Msc. Jorge Cuadra Leal**

Jefe de Laboratorio de Contaminantes Orgánicos.

**PhD. Francisco Picado Pavón**

Jefe de Laboratorio de Contaminantes Metálicos

**Ing. Osnar Mondragón**

Analista de apoyo

**Ing. Claudia Gonzales López**

Analista de apoyo

**Lic. Cristhian Renier Arcía Lumbí**

Un profundo agradecimiento por tu apoyo, siempre lo he de tener presente.

**Lic. Julio Lacayo**

Especialista-Analista Laboratorio de Contaminantes Metálicos

**Docentes UNAN-MANAGUA.**

Mis estimados profesores vuestro esfuerzo también está reflejado en este trabajo, aquí concluyo y plasmo en papel sus valiosas enseñanzas:

*MSc. Frank Medrano Mayorga.*

*Msc. Roger Amaya Picado.*

*Msc. Rosa María Gonzales.*

*MSc. Ramón Ignacio Cáceres.*

*MSc. Elvis Jiménez Peralta.*

*Lic. Dodanin Mercado.*

*MSc. María Natalia Gutiérrez.*

**MSc. Salvador Montenegro Guillen y Dr. Katherine Vammen**

Director/Fundador y Sub-Director CIRA/UNAN



## **RESUMEN**

El presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar el desempeño del método analítico utilizado para determinar cromo hexavalente en aguas naturales mediante la técnica de colorimetría, dichas mediciones proporcionaron datos que se sometieron a tratamiento estadístico para soportar su validez.

El estudio consistió en el desarrollo de mediciones analíticas realizadas en laboratorio a tres muestras de agua natural: una muestra de agua natural con presencia de cromo hexavalente, una muestra de agua destilada fortificada a concentraciones conocidas de cromo hexavalente y una muestra de referencia certificada de cromo hexavalente.

Estas mediciones se realizaron en el Laboratorio de Contaminantes Metálicos del Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua, CIRA/UNAN.

Para la evaluación del desempeño del método analítico se llevaron a cabo una serie de mediciones a las muestras antes mencionadas, estas muestras generaron datos que permitieron a través de la aplicación de estadísticos y test estadísticos evaluar los parámetros de desempeño del método considerados en el alcance de la validación tales como: Límite de detección, Límite de cuantificación, Linealidad, Rango de trabajo, Exactitud, Precisión en condiciones de precisión intermedia y de Repetibilidad, estableciendo criterios de aceptación para estos datos.

El estudio se realizó en tres etapas clasificadas como: etapa experimental, etapa de tratamiento estadístico de los datos y etapa de interpretación de los resultados en la cual también se incluye la elaboración del informe de validación y del presente documento, estas fueron desarrolladas en el período de enero a diciembre del 2011.

Al aplicarle tratamiento estadístico a dichas mediciones y cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos se pudo demostrar que se cumplen los requisitos particulares para su uso específico y por lo tanto que el método para la determinación de cromo hexavalente en aguas naturales a través de la técnica de colorimetría es adecuado para su finalidad.



# **1. Aspectos Generales**



## 1.1 INTRODUCCIÓN

El Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua, CIRA/UNAN, tiene el compromiso de garantizar que los resultados de los análisis realizados en sus laboratorios y a cargo de sus analistas cuenten con un alto grado de confiabilidad.

Una manera muy importante de lograrlo, ya sea para uno o varios métodos de análisis, es evaluando su desempeño, conociendo sus limitaciones e identificando los aspectos influyentes que puedan cambiar estos lineamientos, los cuales están comprendidos en un proceso conocido como validación analítica, la cual permite asegurar la confiabilidad de los resultados.

En el desarrollo del presente trabajo se refleja el proceso de validación del método para determinar Cromo Hexavalente en aguas naturales a través de la técnica de colorimetría, se emplea el **Método analítico Según Standards Methods for Examination of Water and Wastewater**, dicho método es adaptado a las condiciones del laboratorio para lograr un óptimo desempeño del método.

La validación del método implica el análisis de tres muestras de agua natural con presencia de cromo hexavalente y el posterior tratamiento estadísticos de los resultados generados en los análisis desarrollados en el laboratorio de Contaminantes metálicos del CIRA/UNAN.

Se seleccionaron parámetros para evaluar el desempeño del método tales como: Límite de detección, límite de cuantificación, rango de trabajo, linealidad, exactitud, precisión en condiciones de precisión intermedia y en condiciones de repetibilidad. A estos parámetros se les relacionan sus correspondientes criterios de aceptación que son cumplidos y que se demuestra su validez con el tratamiento estadístico correspondiente dado a los resultados generados en el análisis de las muestras.



## 1.2 JUSTIFICACIÓN

El cromo hexavalente puede existir en aguas naturales, efluentes y suelos dependiendo del pH, esta especiación del cromo posee una biodisponibilidad y toxicidad en los seres humanos muy diferente a la del cromo total y del cromo trivalente y por esta razón para preservar la salud de la población, se requiere de un estricto control de sus contenidos en el agua.<sup>1</sup>

Los metales a altas concentraciones aumentan su toxicidad repercutiendo en los organismos vivos y en el ser humano. Las altas concentraciones de cromo hexavalente en las aguas naturales generan efectos negativos tales como el deterioro de la calidad del agua, alteraciones en la vida acuática, y problemas en la salud humana en caso de que el agua se disponga para el consumo humano. Es necesario contar con técnicas de detección y metodologías analíticas que permitan detectar, y cuantificar tales concentraciones.

La determinación de cromo hexavalente se realiza a través de la técnica de colorimetría; la reacción del cromo VI con la difenilcarbazida es una reacción Redox en la cual el cromo VI se reduce a cromo III y el reactivo se oxida a difenilcarbazona, es este compuesto el que forma el complejo de color rojo-violeta con el cromo III naciente y que luego es medido en un espectrofotómetro ultravioleta-visible a una longitud de onda de 540 nm.

La concentración máxima permisible de cromo hexavalente en agua potable recomendada por la organización mundial de la salud es de  $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Con estas disposiciones que persiguen la preservación de la salud es necesario contar con métodos analíticos que reporten datos de concentración fiables, es por eso que es de suma importancia asegurar que el procedimiento analítico para determinar cromo hexavalente se ajusta al propósito de la medición, por lo tanto es admitido que el laboratorio deba tomar las medidas pertinentes para asegurarse de que produce efectivamente datos con el nivel necesario de calidad, una de estas medidas comprende la utilización de métodos de análisis validados.

La validación de un método analítico permite evaluar su desempeño, en este particular el método para determinar cromo hexavalente en aguas naturales por colorimetría.

---

<sup>1</sup> Romero, Cesar H. –Pellerano, Roberto G. –Acevedo, Hugo A. –Vazquez, Francisco A.



Este proceso nos brinda información confiable acerca de las capacidades y limitaciones de este, las cuales se experimentan durante su uso rutinario.<sup>2</sup>

Al ser el cromo hexavalente un elemento que pone en riesgo la salud humana y la preservación de los recursos hídricos es necesario realizar la validación de este método analítico en el Laboratorio de Contaminantes Metálicos del Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua. CIRA/UNAN, como un paso fundamental para asegurar que los datos reportados en su determinación son confiables a su vez esto proporciona garantía de calidad del método y la confirmación de que este método se ajusta al uso propuesto.

---

<sup>2</sup> Mongay Fernández Carlos. Quimiometría, Universitat de Valencia. Edición 2005



### **1.3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

- Validar el método analítico empleado para determinar cromo hexavalente en aguas naturales por colorimetría en el Centro para la investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua en el período de enero a diciembre del 2011.

#### **Objetivos Específicos**

- Determinar los parámetros de eficiencia del método tales como límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango de trabajo, exactitud, precisión, aplicando herramientas estadísticas del control de calidad en mediciones analíticas.



## **1.4 ALCANCES**

### **1.4.1 Alcance del método analítico para determinar Cromo Hexavalente**

Este método es aplicable para la determinación de Cromo Hexavalente en aguas naturales en un rango de concentración de 10-200  $\mu\text{g.l}^{-1}$  el cual es medido por la técnica de colorimetría.

### **1.4.2 Alcance de la validación**

La validación del método de Cromo hexavalente se lleva a cabo a través de mediciones analíticas que proporcionan datos que son sometidos a tratamiento estadístico. Evaluando parámetros tales como: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango de trabajo, exactitud, precisión en condiciones de repetibilidad y la precisión intermedia.



## **2. Marco teórico**



## 2.1 CROMO

### 2.1.1 Descripción general

El cromo se encuentra en la tabla periódica clasificado como un metal de transición:

- Numero atómico: 24
- Números de oxidación son 2, 3, 6.
- Peso atómico es de 51,9961 g/mol
- Grupo 6
- Periodo 4

### 2.1.2 Generalidades de los metales de transición

Todos los metales de transición son duros (excepto los del grupo II) y tienen puntos de fusión muy altos. De hecho 10 de los metales tienen puntos de fusión de más de 2000<sup>0</sup> C, y tres, de más de 3000<sup>0</sup>C. Todos los metales de transición tienen densidades elevadas, las densidades aumentan de los elementos del periodo 4 a los del periodo 6. Químicamente, los metales mismos son poco reactivos, solo unos cuantos de los metales, son lo bastante electropositivos como para reaccionar con ácidos.<sup>3</sup>

Los números de oxidación de los metales de transición son más altos para la primera mitad de cada fila que para los miembros subsecuentes. El número de oxidación más alto de un metal de transición se encuentra en un óxido.

El cromo forma óxidos con un número de oxidación de <sup>+6</sup>, tales como el óxido de cromo (VI), CrO<sub>3</sub>, que es altamente oxidante.

---

<sup>3</sup> Geoff Rayner-Canham. Química inorgánica descriptiva. Segunda edición. Año 2000. pag 456.



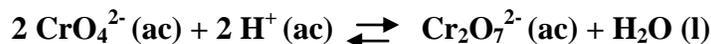
### 2.1.3 Estabilidad de los estados de oxidación de los metales de transición del período 4

Los metales de transición del período 4 son los más comunes y los de mayor importancia industrial. El titanio metálico (estado de oxidación 0) es muy reductor pero los elementos se vuelven menos reductores a medida que avanzamos por la fila. Al llegar al cobre, el metal mismo es el estado de oxidación más estable termodinámicamente. Conforme avanzamos por la fila, el estado de oxidación más alto se favorece cada vez menos; para cuando llegamos al cromo, se ha vuelto altamente oxidante. El número de oxidación más estable termodinámicamente es  $+3$ . El estado  $+6$  del cromo es muy oxidante.

## 2.2 COMPUESTOS DE CROMO

### 2.2.1 Cromatos y Dicromatos

A pesar de su inestabilidad termodinámica, factores cinéticos permiten la existencia de varios compuestos de cromo  $+6$ . Lo más importantes de estos son los cromatos y los dicromatos. El ion cromato amarillo  $\text{CrO}_4^{2-}$ , solo puede existir en solución en condiciones alcalinas, y el ion dicromato  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , solo en condiciones ácidas, a causa del equilibrio



El ion cromato es la base conjugada del ion hidrógeno -cromato,  $[\text{HCrO}_4]$ ; por ello una solución del ion cromato siempre es básica a causa del equilibrio.



Tanto en los iones cromato como dicromato, el cromo tiene un estado de oxidación de  $+6$ ; por tanto, el metal tiene una configuración electrónica  $d^0$ , sin electrones d, podríamos esperar que estas, y todas las configuraciones  $d^0$ , fueran incoloras. Esto obviamente no sucede. El color proviene de una transición electrónica del ligante al metal, proceso conocido como transferencia de carga. La transferencia de carga es evidente sobre todo cuando el metal esta en estados de oxidación altos, como en los cromatos y dicromatos.



El ion dicromato tiene una estructura que incluye un átomo de oxígeno puente. Este ion es un agente oxidante fuerte, aunque la naturaleza carcinogénica del ion cromo VI, implica que se le debe tratar con respeto, sobre todo al solido en polvo, que se puede absorber a través de los pulmones. El ion dicromato anaranjado es un buen agente oxidante y se reduce al ion hexaacuocromo (III)  $\text{Cr}(\text{OH}_2)^{3+}$  en la reacción redox.



### **2.3 CROMO HEXAVALENTE**

Es un metal que se halla espontáneamente en el agua, el suelo y las rocas. También se encuentra en los cultivos y como elemento remanente en los suelos agrícolas. Además, hay niveles traza de cromo en el medio ambiente, el cual proviene de la actividad industrial.

El cromo se presenta comúnmente en las formas trivalente ( $\text{Cr}^{+3}$ ) y hexavalente ( $\text{Cr}^{+6}$ ). En la forma trivalente, al átomo de cromo le faltan tres electrones, mientras que en la forma hexavalente le faltan seis. El cromo generalmente se halla presente en el medio ambiente bajo la forma trivalente. Bajo ciertas condiciones químicas, el cromo puede cambiar de una forma a la otra.

El cromo en su estado natural es altamente insoluble, sin embargo algunas condiciones climáticas, oxidación y la acción bacteriana pueden convertirlo a una forma ligeramente más soluble. La mayoría de las formas más solubles en el suelo especialmente cualquier cromo hexavalente, son principalmente el resultado de contaminación por emisiones industriales<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> Guidelines for drinking-water Quality. Vol 2. Geneva 1984. Pag 91



## **2.4 TOXICIDAD DEL CROMO HEXAVALENTE EN HUMANOS**

El cromo hexavalente es más tóxico que el cromo trivalente ya que este tiene un alto rango de absorción a través del tracto intestinal, en el ambiente natural el cromo hexavalente es más propenso a ser reducido a cromo trivalente.<sup>5</sup>

Basados en evidencia experimental el cromo hexavalente posee propiedades mutagénicas. Sales solubles de cromo hexavalente, específicamente el cromato de calcio, son potentemente carcinógenos.

### **2.4.1 Sus efectos sobre la salud**

El cromo <sup>+3</sup> es un nutriente esencial, necesario para el metabolismo de los azúcares y para muchas reacciones enzimáticas. El gobierno federal de California, EEUU, recomienda una ingesta diaria de 50 a 200 microgramos de cromo total para una persona adulta. El cromo es un ingrediente muy común en muchos suplementos vitamínicos y minerales.

Si bien la forma trivalente presenta muy baja toxicidad, la Environmental Protection Agency a nivel nacional y la Environmental Protection Agency de California han determinado que el cromo hexavalente es un metal cancerígeno. Debido a las propiedades carcinógenas de algunos compuestos de cromo se ha establecido que el agua potable no debe contener más de 50 microgramos de cromo por litro. La EPA ha propuesto incrementar dicho tope a 100 microgramos por litro, pero hasta ahora no se ha tomado ninguna medida al respecto.

Los efectos potenciales del cromo sobre la salud dependen de una diversidad de factores, tales como la forma química en que se presente, la cantidad, el tiempo de exposición y la forma de incorporación del cromo al organismo (ingestión, inhalación o absorción a través de la piel). Las reacciones y sus efectos potenciales dependen en gran medida de factores tales como la edad, el sexo, el peso corporal y el estado de salud del individuo.

Se sabe que el cromo <sup>+6</sup> es cancerígeno por inhalación. Los riesgos potenciales del cromo <sup>+6</sup> en la actividad industrial han sido ampliamente documentados. Muchos estudios han

---

<sup>5</sup> James W. More, S. Ramamoorthy. Heavy metals in natural waters. Segunda edición. Pag 58.



revelado altas tasas de cáncer de pulmón en operarios expuestos a la inhalación de cromo hexavalente, así como un incremento de la tasa de cáncer del tracto gastrointestinal.

Los análisis de laboratorio también han arrojado evidencias contundentes de que el cromo <sup>+6</sup> puede dañar el ADN e inducir mutaciones genéticas. En cuanto al cáncer de tracto gastrointestinal, hay una evidencia sólo limitada proveniente de un solo experimento realizado con ratones de que pueda ser causado por la ingestión de altas dosis de cromo <sup>+6</sup>.

## **2.5 TRANSPORTE EN AGUAS NATURALES**

Por otra parte, todavía no se sabe con certeza si el cromo <sup>+6</sup> es carcinógeno a los niveles en los que se halla en el agua potable. Hasta el momento, la evidencia científica indica que el cromo <sup>+6</sup> es probablemente mucho más tóxico por inhalación que por ingestión. Si bien se ha fijado el contenido máximo de cromo en el agua corriente en 50 mg/l, no se han identificado los efectos a largo plazo sobre la salud por el consumo de agua con un contenido de cromo que superan dicho valor.

Una de los más importantes estados de oxidación del cromo en aguas naturales es el cromo hexavalente. En aguas bien oxigenadas el cromo hexavalente es una especie termodinámicamente estable. El cromo hexavalente es fácilmente reducido por hierro (<sup>+2</sup>), sulfitos disueltos y compuestos orgánicos con grupos sulfídrilos.



## 2.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV/VIS

La espectrofotometría de absorción, implica la medida de la fracción de luz de una longitud de onda dada que pasa a través de la muestra. La muestra (como solución coloreada) no emite luz por sí misma, por lo que se debe incluir una fuente de radiación, esta fuente produce luz con longitudes de onda no deseadas además de la deseada. El paso de luz a través de un monocromador selecciona la longitud de onda para el análisis.

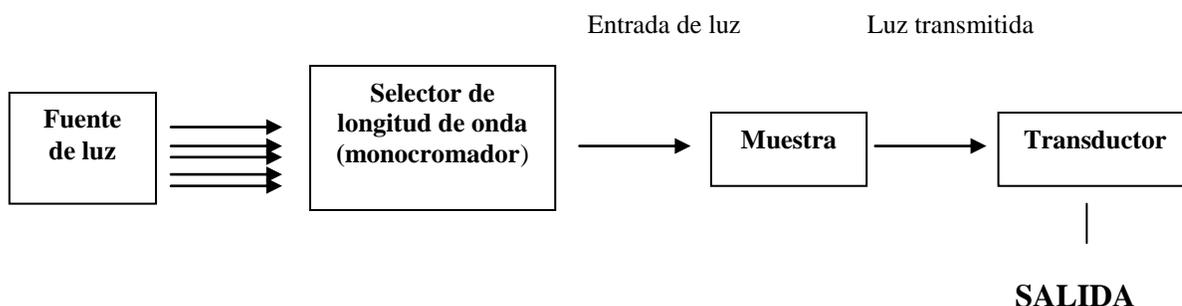


Figura No.1. Diseño de un equipo experimental para medir absorción o transmitancia a una única longitud de onda

Para los análisis químicos, se hacen dos medidas de la cantidad de luz absorbida, en la primera se mide la cantidad de luz (a la longitud de onda elegida) que llega al transductor cuando se coloca un blanco y se denomina intensidad  $P_0$  del blanco, es cuando la concentración del material analizado es cero.

La medida final se obtiene comparando la medida de las muestras o los patrones de calibración con la medida del blanco. Llamamos  $P$  a la intensidad que se mide con las muestras o con el estándar. La comparación que siempre se hace implica la relación  $P/P_0$ , con ambas intensidades medidas en las mismas condiciones del instrumento.

Se utilizan tres términos diferentes para expresar esta relación. El primero es simplemente la relación  $P/P_0$  y se denomina transmitancia. El símbolo habitual para la transmitancia es  $T$ .



$$T = \frac{P}{P_0}$$

El segundo es el porcentaje de transmitancia

$$\%T = T \times 100$$

El tercero es el logaritmo negativo de T, que se denomina Absorbancia y se abrevia como A y se expresa algebraicamente como:

$$A = -\log \frac{P}{P_0} = -\log T$$

### **2.6.1. Ley de Lambert-Beer**

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente (c) y con la longitud de la trayectoria (b) de la radiación en el medio absorbente. Es decir,

$$A = \log \left( \frac{P_0}{P} \right) = abc$$

Donde a es una constante de proporcionalidad denominada absortividad. Puesto que la absorbancia es una cantidad adimensional, la absortividad debe tener unidades que cancelen las unidades de b y c.



## **2.7 VALIDACIÓN**

Confirmar, mediante el examen y el suministro de evidencia objetiva, que se están cumpliendo los requerimientos particulares para un uso deseado específico.<sup>6</sup>

### **2.7.1 Validación de un método analítico**

Es el proceso que permite establecer las características de rendimiento y limitaciones de método así como la identificación de las influencias que pueden cambiarlas y la medida en que pueden hacerlo.

### **2.7.2 Herramientas de validación**

**Blancos:** el uso de diferentes tipos de blancos permite determinar cuanto de la señal medida es atribuible al analito y cuanto a otras causas. Existen diferentes tipos de blancos disponibles para el analista encargado de la validación.

**Blanco con reactivo:** los reactivos usados durante el proceso analítico, se analizan de manera aislada para ver si contribuyen a la señal de medición de esa manera, se puede corregir apropiadamente la señal de medición que surge del analito.

**Blanco de matriz:** son en esencia matrices sin analito, son difíciles de obtener pero dichos materiales son necesarios para dar un estimado realista de las interferencias que se podrían encontrar en el análisis de muestra de ensayos.

---

<sup>6</sup> ISO 8402:1994



**Muestras de ensayo:** los materiales de ensayo tomados de muestras reales son útiles debido a la información que brindan sobre interferencias, que podrían encontrarse en el trabajo cotidiano. Si se conoce con exactitud el contenido verdadero de analito de un material de ensayo, se le puede usar como una manera de evaluar la exactitud del método. Sin embargo, el contenido verdadero del analito es generalmente difícil de determinar a menos que exista la posibilidad de usar otros métodos que se sepa que tengan sesgos insignificantes.

**Materiales fortificados:** son materiales o soluciones que se han fortificado con el analito de interés. El fortalecimiento se realiza generalmente mediante adiciones. Estos materiales o soluciones pueden contener desde antes el analito de interés, por lo cual es necesario tener cuidado para que el fortalecimiento no lleve inadvertidamente a niveles fuera del rango de aplicabilidad del método.

El fortalecimiento con una cantidad conocida de analito permite el incremento en la respuesta del analito que se va a medir y a calcular en una cantidad equivalente a la cantidad agregada (bajo el supuesto del 100% de recuperación), aun cuando no se conozca la magnitud absoluta de analito presente antes y después del fortalecimiento.

Nótese que la mayoría de métodos de fortalecimiento agrega analito de tal manera que no esté tan firmemente unido a la matriz de la muestra como lo estaría si su presencia fuera natural. Por lo tanto, puede esperarse que los valores de recuperación obtenidos mediante su fortalecimiento sean excesivamente optimistas.

**Materiales de referencia:** es común confundir materiales de referencia con materiales de referencia certificados. Los materiales de referencia pueden incluir prácticamente cualquier material que se use como base de referencia, como reactivos de laboratorio de pureza conocida, productos químicos industriales y otros. Es necesario que la propiedad o el analito de interés sean estables y homogéneos, pero el material no necesita tener el alto grado de caracterización, trazabilidad y certificación asociados con los materiales de referencia certificados.



**Materiales de referencia certificados:** La caracterización de un material de referencia certificado generalmente se controla de manera más estricta que en el caso de un material de referencia y, además, se certifica el valor verdadero con una incertidumbre determinada por una institución reconocida. La caracterización normalmente se realiza a través de diferentes métodos, de manera que, en lo posible, se reduzca o incluso se elimine cualquier sesgo en la caracterización.

## **2.8 PARÁMETROS DE EFICIENCIA**

### **Límite de detección**

El límite de detección expresa la mínima concentración de analito que se puede detectar en una muestra, pero no necesariamente cuantificar bajo las condiciones estipuladas para el ensayo.

### **Límite de cuantificación**

El límite es estrictamente la más baja concentración del analito que puede ser determinada con un nivel de repetibilidad, precisión y exactitud. Es también definido como la concentración del analito correspondiente al valor de la muestra blanco más 5,6 o 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Este es conocido también como límite de determinación. El límite de cuantificación es un valor indicativo y no debe de ser normalmente usado en la toma de decisiones.

### **Linealidad**

Define la capacidad del método para obtener resultados de ensayos proporcionales a la concentración del analito, por inferencia el rango lineal es el rango de concentraciones del analito a lo largo del cual el método da, en el ensayo, resultados proporcionales a la concentración del analito.



### **Exactitud**

Es el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado, el termino exactitud aplicado a un conjunto de resultados de ensayos, implica una combinación de componentes aleatorios y un componente común de sesgo o error sistemático.<sup>7</sup>

### **Precisión**

Es el grado de concordancia entre los resultados independientes de un ensayo obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión depende solo de la distribución de errores aleatorios y no se relacionan con el valor verdadero. El grado de precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y se calcula como la desviación estándar de los resultados del ensayo. Por resultados independientes de un ensayo se entiende los resultados obtenidos de una manera que no esta influenciada por ningún resultado previo relativo al mismo objeto u objetos similares. Las medidas cuantitativas de la precisión dependen principalmente de las condiciones estipuladas. Repetibilidad y reproducibilidad son conjuntos específicos de condiciones extremas.<sup>8</sup>

### **Precisión Intermedia**

Grado de dispersión de los resultados de un método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra obtenidos en diferentes condiciones en un mismo laboratorio. (variaciones entre analistas y días)

### **Repetibilidad**

Precisión en condiciones de repetibilidad, es decir condiciones en las que se obtienen resultados independientes aplicando el mismo método para ensayos idénticos, en el mismo laboratorio, a cargo del mismo operador, usando el mismo equipo, en intervalos cortos de tiempo.

---

<sup>7</sup> ISO 3534-1 (Eurachem Guide - The fitness for purpose of analytical methods)

<sup>8</sup> ISO 3534-1 (Eurachem Guide - The fitness for purpose of analytical methods)



### **Reproducibilidad**

Proximidad entre los resultados de mediciones de un mismo mensurando, realizado bajo distintas condiciones de medición.

### **Sesgo**

Diferencia entre el valor esperado del resultado del test y el valor de referencia aceptado.



## **3. Hipótesis**



### **3.1 HIPÓTESIS**

- Aplicando tratamiento estadístico a los datos generados en las mediciones analíticas de 3 muestras con presencia de Cromo hexavalente, es posible evaluar el desempeño del método para la determinación de Cromo hexavalente en aguas naturales por Colorimetría.



## **4. Diseño metodológico**



#### **4.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO**

El estudio experimental, se llevó a cabo en el Laboratorio de Contaminantes Metálicos del Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos de Nicaragua, CIRA/UNAN. Ubicado en el municipio de Managua, Departamento de Managua.

#### **4.2 TIPO DE ESTUDIO**

El estudio está ubicado en la categoría de analítico experimental este comprende la evaluación estadística de los datos generados en los análisis de muestras de agua natural fortificadas y de material de referencia certificado.

#### **4.3 TIEMPO DE EJECUCIÓN**

La investigación se llevó a cabo durante un período de doce meses. Del cual se emplearon 2 meses para la recolección de información y elaboración del protocolo de validación, 7 meses para el desarrollo de la parte experimental del proceso de validación y 3 meses para procesamiento estadístico de los datos generados en la validación y elaboración del informe de validación.

#### **4.4 UNIVERSO**

El universo para la realización del estudio abarcó una muestra de agua natural de grifo fortificada, muestras de agua destilada fortificada y una muestra de referencia certificada de cromo hexavalente.



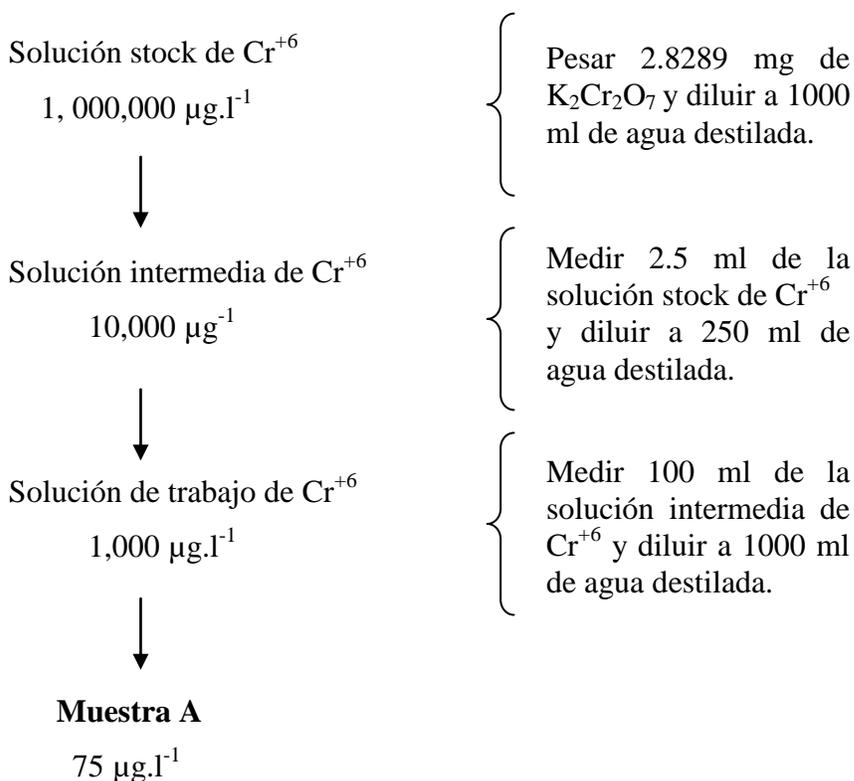
#### 4.5 MUESTRAS

Para el desarrollo de los ejercicios correspondientes al proceso de validación se utilizaron 3 tipos de muestras.

##### Muestra A

##### Blanco de muestra fortificado

Se preparó con agua del grifo y se fortificó agregando un volumen conocido del analito ( $\text{Cr}^{+6}$ ). Las soluciones se prepararon a partir de una solución stock de  $1\,000\,000\ \mu\text{g.l}^{-1}$  de cromo hexavalente de la cual se hicieron las diluciones respectivas.



La muestra A fue preparada a una concentración de  $75\ \mu\text{g.l}^{-1}$ , se tomó un volumen de  $150\ \text{ml}$  de la solución de trabajo y se diluye a  $2000\ \text{ml}$  con agua de grifo, esto con el objetivo de simular una muestra real con presencia del analito.

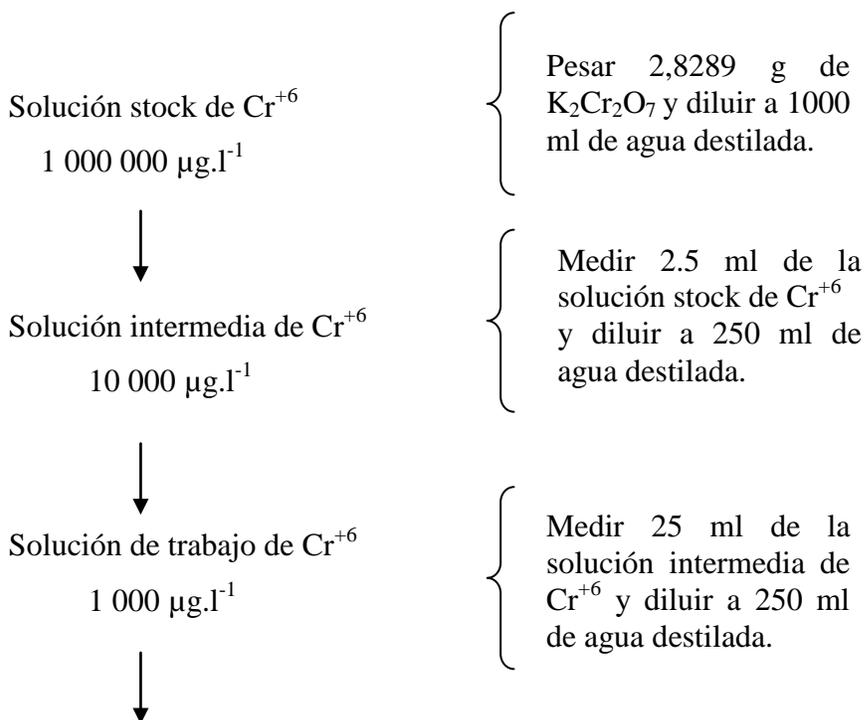
Con esta muestra se realizaron los ensayos para la evaluación de la *precisión* en condiciones de *precisión intermedia* y de *repetibilidad*.



## Muestra B

### Blanco de muestra fortificado

Se preparó con agua destilada y se fortificó agregando un volumen conocido del analito ( $\text{Cr}^{+6}$ ). Las soluciones se prepararon a partir de una solución stock de  $1\,000\,000\ \mu\text{g.l}^{-1}$  de cromo hexavalente de la cual se hicieron las diluciones respectivas.



### Muestra B

La muestra B fue preparada a diferentes concentración tales como  $10, 25, 50, 75, 100, 200\ \mu\text{g.l}^{-1}$ , para esto se tomaron los volúmenes correspondientes a la concentración deseada ( $1, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 20\ \text{ml}$  respectivamente) a partir de la solución de trabajo y se diluyeron a  $100\ \text{ml}$  con agua destilada.

Con esta muestra se realizaron los ensayos para la evaluación del *límite de detección*, *linealidad*, *rango de trabajo* y *la preparación de las curvas de calibración* respectivas.



### Muestra C

La muestra C es un estándar de Cromo Hexavalente de referencia certificado, para estudios de contaminación de agua por Cromo Hexavalente.

Este estándar diluido contiene Cromo Hexavalente en un rango de 45 a 880  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

### Estándar de Cromo Hexavalente

ERA Waters Company acreditado por A2LA código de certificado 1539.01

Presentación: ampolla de 14 ml

Lote P197-984

Valor verdadero de la concentración de Cromo Hexavalente en  $\mu\text{g.l}^{-1}$

**268±1,17**

Se preparó con agua ultrapurificada, se agregó 200 ml de esta agua a un balón volumétrico de 1000 ml (clase A, tolerancia 0.4 ml), luego se midió con una pipeta volumétrica 5.0 ml y se agregaron al balón, se agitó y luego se aforó a 1000 ml con agua ultrapurificada.

Solución estándar de  $\text{Cr}^{+6}$

45 a 800  $\mu\text{g.l}^{-1}$



Solución diluida de  $\text{Cr}^{+6}$



**Muestra C**

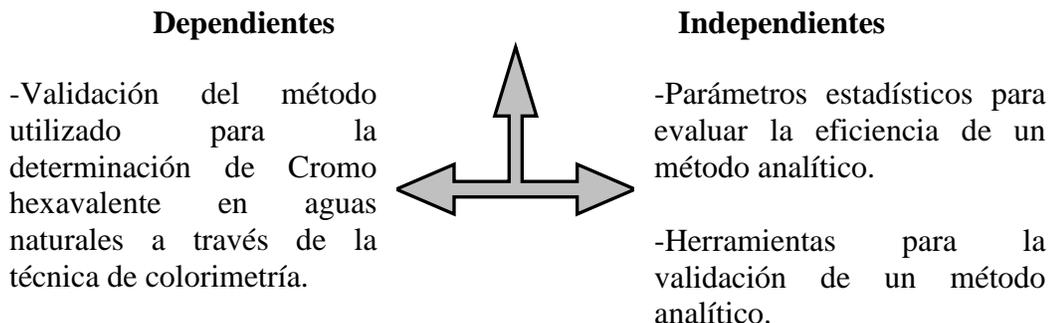
Se midieron 5,0 ml de la solución estándar de  $\text{Cr}^{+6}$  y se diluyeron a 1000 ml de agua ultrapurificada.

Con esta muestra se realizaron los ensayos para la evaluación de la *exactitud* y *precisión en condiciones de reproducibilidad*.



#### 4.6. VARIABLES

##### Variables



##### 4.6.1. Operacionalizacion de variables

Tipo de variable	Variables	Definición	Indicador
Dependiente	Validación de métodos analíticos	Es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso en específico.	<div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Procedimientos de calibración</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Estandarización del método</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Tratamiento de las muestras</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Tratamiento estadístico de los resultados</div>
Independientes	Evaluación del desempeño del método aplicado a muestras de aguas naturales	Parámetros estadísticos que evalúan la eficiencia de un método analítico	<div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Límite de detección</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Límite de cuantificación</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Rango de trabajo</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Linealidad</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Exactitud</div> <div style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">Precisión</div>



## **4.7 MATERIAL Y MÉTODO**

### **4.7.1 Método de recolección de la información**

Para la elaboración de esta monografía se llevó a cabo una revisión exhaustiva y minuciosa de la literatura relacionada al propósito de la investigación, esto en centros de documentación tales como: **Biblioteca de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN), Sala de documentación del Centro para la Investigación de Recursos Acuáticos (CIRA – UNAN).**

Para llevar a cabo la validación se realizaron análisis de laboratorios a las muestras A, B y C en el Laboratorio de Contaminantes Metálicos del Centro para la Investigación en Recursos Acuáticos (CIRA – UNAN).

### **4.7.2 Análisis estadístico de la información**

Para el procesamiento y análisis de datos se utilizaron las siguientes pruebas estadísticas:

- Media de los resultados
- Desviación estándar de los resultados
- Coeficiente de variación
- Coeficiente de correlación  $r$
- Coeficiente de determinación
- Límite de confianza
- Test de Fisher
- $t$  Student
- Test de Grubbs
- Test de Hartley
- Test de Z-score
- Test de significancia estadística de la varianza de la pendiente  $b$  y el intercepto.
- Test de proporcionalidad
- Análisis de varianza de dos factores.



## **4.8 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

### **4.8.1 Linealidad**

- El coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0.98 y 1.00.
- El coeficiente de determinación debe ser mayor de 0,995.
- El coeficiente de variación del método debe ser  $< 5\%$ .
- Homocedasticidad de las varianzas.
- El análisis de varianza de la regresión lineal debe demostrar:
  - a. Paso del intercepto por 0 mediante la aplicación del t de student o mediante el intervalos de confianza con un  $\alpha$  de 0,05.
  - b. Desviación no significativa con respecto a la regresión.
- Distribución aleatoria de los residuos.
- La precisión del modelo de la curva de calibración debe ser  $< 5\%$ .

### **4.8.2 Rango de trabajo**

- El F calculado debe ser menor que la f tabulada para 4 grados de libertad en el numerador y 4 grados de libertad para el denominador con esto se acepta la hipótesis nula y se verifica la linealidad de la curva de calibración.

### **4.8.3 Exactitud**

- La t calculada debe ser menor que la t tabulada para 9 grados de libertad con esto se acepta la hipótesis nula.

### **4.8.4 Precisión en condiciones de:**

#### **4.8.4.1 Repetibilidad**

- El valor calculado del coeficiente de variación debe ser menor de 5%.



#### **4.8.4.2 Precisión intermedia**

- Coeficiente de variación por día entre analistas debe ser menor de 5%.
- Al aplicar el test de Grubbs demostrar si existen o no valores aberrantes.
- Las varianzas deben de ser Homogéneas.  $r_{\text{calc}} > r_{\text{tab}}$  para demostrar la homocedasticidad de las varianzas.
- El análisis de varianza debe presentar varianzas menores al 5%.

### **4.9 MATERIALES**

#### **4.9.1 Materiales**

##### **Material volumétrico clase A**

- Beakers de 100 ml  $\pm$  5%
- Balón de 50 ml  $\pm$  0.08 ml
- Balón de 100 ml  $\pm$  0.08 ml
- Balón de 250 ml  $\pm$  0.15 ml
- Balón de 1000 ml  $\pm$  0.4 ml
- Probeta de 100 ml  $\pm$  0.75 ml
- Pipetas de 1 ml  $\pm$  0.006 ml
- Pipeta de 2  $\pm$  0.006 ml
- Pipeta de 2.5  $\pm$  0.006 ml
- Pipeta de 5  $\pm$  0.010 ml
- Pipeta de 10  $\pm$  0.02 ml
- Pipeta de 20 ml  $\pm$  0.03 ml

**Observación: ver certificados de calibración de material volumétrico en Anexo**

**1.**



#### **4.9.2 Instrumentación**

Para desarrollar el proceso de la validación del método están implicados los equipos detallados a continuación:

1. Balanza analítica Sartorius TE214S

Repetibilidad máxima = 0.0001 g

Excentricidad máxima = 0.0002

2. Espectrofotómetro ultravioleta-visible Lambda XLS

Marca: Perkin Elmer

Modelo: Lambda XLS

Serie: L 7110190

Lot: B 0190L-1517

Observación: Ver certificados de calibración en Anexos 2 y 3 respectivamente.

#### **4.10 MÉTODO DE ANÁLISIS**

##### **4.10.1. Reactivos**

**1. Dicromato de potasio**

Formula:  $K_2CrO_7$

Grado analítico: reactivo

Pureza: 99.9%

Marca: Merck

Presentación: 500 gr

Lote: 4865

**2. 1,5-difenilcarbazona**

Formula:  $C_{13}H_{14}N_4O$

Grado analítico: reactivo

Marca: Sigma Aldrich

Presentación: 25 gr

Lote: 029K1319

**3. Acetona grado reactivo**

Formula:  $CH_3COCH_3$

Grado analítico: reactivo

Marca: Merck

Presentación: 5 litros

Lote: K40314914934

**4. Ácido Ortofosfórico concentrado**

Formula:  $H_3PO_4$  Grado analítico: reactivo Pureza: 85 %

Marca: Merck Presentación: 5 litros



#### **4.10.2. Preparación de soluciones**

- Solución stock de cromo

Disolver 2,8289 g de dicromato de potasio  $K_2Cr_2O_7$  en agua y diluya a 1,000 ml.

- Solución estándar de Cromo [ $10,000 \mu g.l^{-1}$  de Cr]:

Diluir 2,5 ml de la solución stock de cromo a 250 ml con agua destilada

- Solución estándar de Cromo [ $1000 \mu g.l^{-1}$  de Cr]:

Diluir 25 ml de la solución estándar de Cromo [ $10,000 \mu g$  de Cr] a 250 ml con agua destilada.

- Solución intermedia de referencia para muestra control [ $10,000 \mu g.l^{-1}$ ].

Diluir 5,0 ml de solución de referencia de Cromo Fisher [ $1,000,000 \mu g.l^{-1}$ ] a 500 ml con agua destilada.

- Solución para muestra control de Cromo [ $100 \mu g.l^{-1}$ ]

Diluir 10 ml de solución de intermedia de referencia de Cromo [ $10,000 \mu g.l^{-1}$ ] a 1000 ml con agua destilada.

- Ácido ortofosfórico  $H_3PO_4$  concentrado 85% pureza, grado reactivo.

- Solución de difenilcarbazida ( $C_{13}H_{14}N_4O$ ).

Disolver 0,250 g de 1,5-difenilcarbazida en 50 ml de Acetona

Almacene en una botella de color Ámbar. Descarte cuando la solución comience a decolorarse. (El color de la solución es amarillo pálido).



#### 4.10.3. Calibración del método

##### Preparación de la curva de calibración [0 – 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]

Para la calibración del método [0 – 200  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ] se preparan 6 estándares que permitirán obtener la curva de calibrado.

La solución madre debe tener una concentración de [1,000,000  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de Cr].

La solución Intermedia debe tener una concentración de [10,000  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de Cr].

La solución patrón debe tener una concentración de [1 ,000  $\mu\text{g.l}^{-1}$  de Cr].

##### Volúmenes de la solución patrón del analito.

Concentración ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	Volumen (ml)
--	--------------

10-----	1,0
---------	-----

25-----	2,5
---------	-----

50-----	5,0
---------	-----

75-----	7,5
---------	-----

100-----	10
----------	----

200-----	20
----------	----

Estos estándares serán diluidos a un volumen de 100 ml para obtener sus respectivas concentraciones.

Para elaborar la curva de calibración se deben de seguir los siguientes pasos:

##### **Paso1:**

Medir con pipeta volumétrica (clase A) los volúmenes correspondientes para cada estándar y transferirlos a un balón de 100 ml, agregar agua destilada hasta llevarlo a un volumen de 80 ml aproximadamente. Preparar también un blanco de reactivo y una muestra control.

##### **Paso 2:**

Ajustar el pH de los estándares a  $2,0 \pm 0,5$ , adicionar 0,25 ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  o su equivalente en gotas (5 gotas).



**Paso 3:**

Una vez acidificada la solución, aforar con agua destilada.

**Paso 4:**

Adicionar 2 ml de solución de difenilcarbazida y agitar, dejar por 10 min para un máximo desarrollo del color.

**Paso 5:**

Transferir una porción apropiada a una celda de 1 cm de absorción y medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Utilizar Blanco de reactivo como referencia.

Se realiza la lectura de la curva de calibración a una longitud de onda de 540 nm.

**Procedimiento del análisis.**

Para compensar las posibles pérdidas de cromo durante las operaciones analíticas, trate los estándares de cromo y las muestras con el mismo procedimiento.

- Medir aproximadamente 80 ml de la muestra con una Probeta y trasvasarla a un balón de 100 ml.
- Ajustar el pH de las muestras a  $2.0 \pm 0.5$ , por adición de  $H_3PO_4$  concentrado (agregar 0.25 ml de ácido para ajustarlo o su equivalente en gotas). Una vez ajustado el pH aforar con la muestra.
- Adicionar 2 ml de solución de difenilcarbazida y agitar, dejar por 10 min para un máximo desarrollo del color.
- Transferir una porción apropiada a una celda de 1 cm de absorción y medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Utilizar Blanco de reactivo como referencia.



- Leer de igual manera la muestra cruda, dicha lectura es utilizada para corregir posibles efectos de turbidez en la lectura de la muestra
- Corregir la lectura de la absorbancia de la muestra sustrayendo la absorbancia del blanco.

**Observación:**

Para realizar corrección de turbidez, tomar 25 ml de la muestra y transferir a un balón de 25 ml. Esta no debe de contener ningún reactivo que sea utilizado en el análisis, solamente la muestra cruda acidificada. (pH= 2.0)

**Preparación del blanco.**

Preparar para cada lote de muestras, un blanco con la misma agua destilada con que se preparan los patrones o la dilución de las muestras. Tomar el mismo volumen que se toma para las muestras (100 ml), adicionar los reactivos, agitar y leer en el espectrofotómetro.

**Preparación de muestra control.**

Preparar para cada lote de muestras, una solución control de concentración conocida, esta debe tener una concentración que se encuentre en el rango de trabajo [0-200  $\mu\text{g/l}^{-1}$ ], y debe de ser preparada con una sal o una solución de referencia certificada, diferente a la que es utilizada para la preparación de los estándares de calibración.

**Preparación de una muestras con agregado (% de Recuperación)**

Preparar para cada lote de muestras, una muestra con agregado para corroborar el % de recuperación del analito. La concentración de esta muestra es decidida basada en el criterio del analista siendo recomendable que dicha concentración se encuentre en un rango medio de la curva de calibración.



#### **4.11 METODOLOGÍA PARA DETERMINAR LIMITE DE DETECCIÓN Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN**

##### **Límite de detección**

- Se preparan los estándares de calibración.
- Se preparan diez blancos de reactivo
- Se realiza la lectura de los estándares de calibración y luego se realizan 10 mediciones independientes de los blancos.

Preparación del blanco:

Medir una alícuota de 90 ml de agua destilada y agregarla a un balón volumétrico de 100 ml clase A, añadir 0,25 ml de ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ) concentrado o su equivalente en gotas (5 gotas), aforar con agua destilada luego agregar 2 ml de difenilcarbazida y agitar.

##### **Con los datos obtenidos:**

- Calcular la media y la desviación estándar de las mediciones.
- Expresar el límite de detección como la concentración del analito correspondiente al valor promedio de los blancos más tres veces la desviación estándar de los mismos.

##### **Límite de cuantificación**

- El límite de cuantificación se expresa como la concentración del analito correspondiente al valor promedio de los blancos más 10 veces la desviación estándar.



#### **4.12. RANGO DE TRABAJO**

Este rango se determina especialmente el límite superior del rango ya que el límite inferior corresponde al límite de detección a evaluar.

- Se realizan 5 mediciones independientes de la concentración del estándar de menor concentración.
- Se realizan 5 mediciones independientes de la concentración del estándar de mayor concentración.

#### **Con los datos obtenidos**

- Calcular la desviación estándar de cada grupo de medición de los estándares.
- Calcular las varianzas.
- Aplicar el test de Fisher para una prueba de dos colas.

#### **4.13. LINEALIDAD**

Se preparan los estándares de la curva de calibración, en forma independiente al menos 5 veces para evaluar estadísticamente la regresión lineal del método.

#### **Con los datos obtenidos:**

- Calcular el coeficiente de correlación y determinación.
- Calcular la pendiente y su desviación estándar.
- Calcular el intercepto y su desviación estándar.
- Calcular los límites de confianza del intercepto y de la pendiente.
- Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal.
- Calcular el coeficiente de regresión con la totalidad de los datos.
- Calcular y graficar los residuales.
- Precisión del modelo de la curva de calibración.
  - a. Desviación estándar del procedimiento.
  - b. Coeficiente de variación del procedimiento relacionado al centro de trabajo.
  - c. Precisión del modelo.



#### **4.14. EXACTITUD**

Se realizan 10 mediciones independientes de la concentración del estándar de referencia certificado. (Muestra C)

##### **Con los datos obtenidos:**

- Calcular la media del grupo de datos
- Calcular la desviación estándar del grupo de datos
- Aplicar el Test de Student para una prueba de dos colas.

#### **4.15. PRECISIÓN**

##### **4.15.1 Precisión en condiciones de precisión intermedia**

###### **Metodología de evaluación:**

- Se realiza el análisis por triplicado de la muestra A, por tres analistas, en cinco días diferentes.
- Se entregó a cada analista un volumen de 2000 ml de muestra fortificada A con una concentración de  $75 \mu\text{g.l}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{+6}$ .
- Se prepararon los estándares de la curva de calibración del método y se prepararon tres réplicas de la muestra A.
- Seguido se realizaron las lecturas de las absorbancias de los estándares de calibración y las lecturas de las concentraciones de las muestras A.

###### **Con los datos obtenidos:**

- Calcular los promedios, desviación estándar, las varianzas y el coeficiente de variación de las mediciones por día y entre analistas.
- Aplicar el test de Grubbs a todos los datos de las mediciones de la muestra A para establecer si existen valores aberrantes.
- Aplicar el test de Hartley para comprobar la Homogeneidad de las varianzas.



- Realizar el análisis de varianza de dos factores (analista y día) con varias muestras por grupo:
  - a. Varianza entre días.
  - b. Varianza entre analista.
  - c. Varianza de la precisión intermedia.
  - d. Precisión intermedia.
  - e. Varianza de la repetibilidad.
  - f. Porcentaje de la precisión intermedia del método.

#### **4.15.2 Repetibilidad**

- Se realizaron 10 mediciones independientes de 10 alícuotas de la *muestra A*. estas mediciones se realizaron el mismo día, con el mismo analista en intervalo corto de tiempo.

#### **Con los datos obtenidos:**

- Con los datos se calcula el coeficiente de variación de las mediciones de la concentración de la muestra A.



## **5. Resultados**



## 5.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

### Tratamiento estadístico de los datos

Tabla 1. Curva de calibración utilizada para determinar el límite de detección.

Estándar	Lectura 1	Lectura 2	Media
Blanco de reactivo	-0,001	-0,002	-0,001
Estándar 1 (10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,007	0,006	0,007
Estándar 2 (25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,018	0,019	0,019
Estándar 3 (50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,038	0,038	0,038
Estándar 4 (75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,060	0,057	0,059
Estándar 5 (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,079	0,078	0,079
Estándar 6 (200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,159	0,160	0,160



**Resultados de las lecturas de absorbancia de blancos de reactivo para determinar el límite de detección.**

**Tabla 2. Mediciones de absorbancia de los blancos independientes.**

Muestra	Absorbancia	Concentración
Blanco 1	0,000	1,670
Blanco 2	-0,001	0,428
Blanco 3	0,003	5,395
Blanco 4	-0,001	0,428
Blanco 5	0,002	4,153
Blanco 6	0,000	1,670
Blanco 7	0,000	1,670
Blanco 8	0,000	1,670
Blanco 9	-0,001	0,428
Blanco 10	0,001	2,911
X=		2,0423
S=		1,6607

**Calculo del límite de detección**

$$\begin{aligned}LD &= \bar{X} + 3S \\ &= 2,0423 + 3(1,6607) \\ &= 7,0245 \mu\text{g.l}^{-1}\end{aligned}$$



### 5.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

$$LC = \bar{X} + 10S$$

$$LC = 2.0423 + 10 (1.6607)$$

$$LC = 18.6493$$

### 5.3 RANGO DE TRABAJO

Tabla 3. Lectura de absorbancias de estándares de calibración de 10 y 200  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

	Estándar 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Estándar 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$
E <sub>1</sub>	0,0070	0,1640
E <sub>2</sub>	0,0070	0,1620
E <sub>3</sub>	0,0080	0,1640
E <sub>4</sub>	0,0080	0,1640
E <sub>5</sub>	0,0070	0,1640
<i>Media</i>	0,007400	0,163600
<i>Desv.est</i>	0,000548	0,000894
<i>Varianza</i>	0,0000003	0,0000008



### Tratamiento estadístico de los resultados

Calcular  $f$  calculada de dos colas para 4 grados de libertad al 95% de confianza

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

$$F_{\text{cal}} = 0.0000008/0.0000003$$

$$= 2,6667$$

$$F_{\text{calc}} = 2,6667 < F_{\text{tab}} = 6,388$$

#### 5.4 LINEALIDAD

En la tabla No.4 se presentan los resultados de 5 curvas de calibración realizadas en diferentes días

Tabla 4. Lecturas de los estándares de calibración.

	Blanco	Estándar 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Estándar 25 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Estándar 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Estándar 75 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Estándar 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Estándar 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$
Curva No.1	-0,001	0,007	0,018	0,040	0,060	0,084	0,164
Curva No.2	0,000	0,007	0,018	0,039	0,063	0,084	0,162
Curva No.3	-0,001	0,008	0,020	0,044	0,062	0,083	0,164
Curva No.4	-0,001	0,008	0,020	0,044	0,062	0,083	0,164
Curva No.5	-0,001	0,007	0,018	0,040	0,0600	0,0840	0,164



**Tabla 5. Curva de calibración promedio.**

<b>Estándares</b>	<b>Absorbancias</b>
<b>Blanco de reactivo</b>	<b>-0,0008</b>
<b>Estándar 1 (10 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>0,0074</b>
<b>Estándar 2 (25 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>0,0188</b>
<b>Estándar 3 (50 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>0,0414</b>
<b>Estándar 4 (75 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>0,0614</b>
<b>Estándar 5 (100 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>0,0836</b>
<b>Estándar 6 (200 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>0,1636</b>



Tabla 6. Tratamiento estadístico de los resultados.

$X_i$	$Y_i$
0.0000	-0.0008
10.0	0.0074
25.0	0.0188
50.0	0.0414
75.0	0.0616
100.0	0.0836
200.0	0.1636
<b>Promedio</b> 65,714286	0,053629

$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
-65,714286	4318,367347	-0,054429	0,002962	3,566735
-55,714286	3104,081633	-0,046229	0,002137	2,575592
-40,714286	1657,653061	-0,034829	0,001213	1,418020
-15,714286	246,938776	-0,012229	0,000150	0,192163
9,285714	86,224490	0,007771	0,000160	0,072163
34,285714	1175,510204	0,029971	0,000898	1,027592
134,285714	18032,653061	0,109971	0,012094	14,767592
<b>Suma</b> 0,000000	28621,428571	0,000000	0,019515	23,629857



$x_i^2$	$\hat{y}$	$ y_i - \hat{y} $	$(y_i - \hat{y})^2$
0,000000	-0,000625	0,000175	0,000000
100	0,007631	0,000231	0,000000
625	0,020015	0,001215	0,000001
2500	0,040655	0,000745	0,000001
5625	0,061295	0,000105	0,000000
10000	0,081935	0,001665	0,000003
40000	0,164495	0,000895	0,000001
Suma			0,000006

**Coefficiente de correlación**

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{\frac{1}{2}}}$$

r=0,9999

**Coefficiente de determinación**

r<sup>2</sup>= 1,0000

**Pendiente**

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

b= 0,000826



### **Intercepto**

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = -0,00063$$

### **Límites de confianza de la pendiente**

$$b_1 + t \cdot S_b$$

$$0,000838$$

$$b_1 - t \cdot S_b$$

$$0,000813$$

### **Límites de confianza del intercepto**

$$a + t \cdot S_{b_a}$$

$$0,007557$$

$$a - t \cdot S_{b_a}$$

$$-0,008807$$

### **Varianza de la regresión de y sobre x**

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_{y,x} = 0,001068$$

### **Desviación estándar de la ordenada en el origen**

$$S_a = S_{y,x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_a = 0,004051$$



### Desviación estándar de la pendiente

$$S_b = \frac{S_{y,x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_b = 0,000006$$

### Calculo de residuales

Tabla 7. Cálculo de los residuales.

	X	Y	Y predictivo	$\epsilon$ residual
Blanco	0,0000	-0,0008	-0,0006	-0,0002
Estándar 1	10,0000	0,0074	0,0076	-0,0002
Estándar 2	25,0000	0,0188	0,0200	-0,0012
Estándar 3	50,0000	0,0414	0,0407	0,0007
Estándar 4	75,0000	0,0614	0,0613	0,0001
Estándar 5	100,0000	0,0836	0,0820	0,0016
Estándar 6	200,0000	0,1636	0,1646	-0,0010
Promedio	65,7143	0,0536		

$$b_0 = -0,000630$$

$$b_1 = 0,000826$$

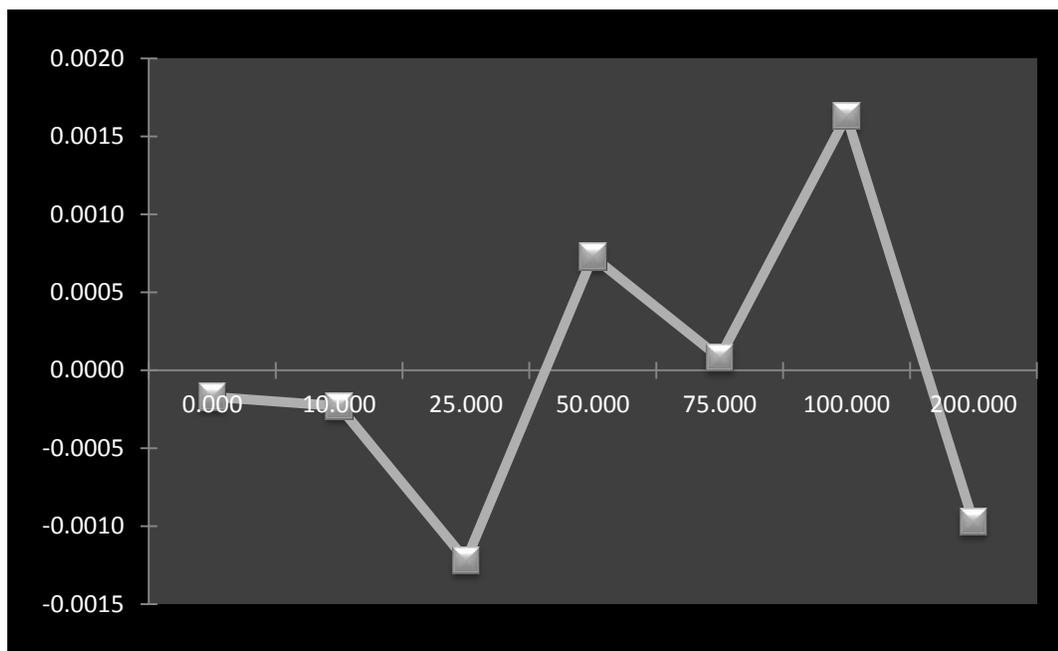


Gráfico No.2 Gráfico de los residuales

#### Desviación estándar del método

$$S_{x0} = \frac{S_{y,x}}{b}$$

$$= 1,29$$

#### Coefficiente de variación del método relacionado al centro del intervalo de trabajo

$$CV_{metodo} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 100$$

$$= 1,96$$

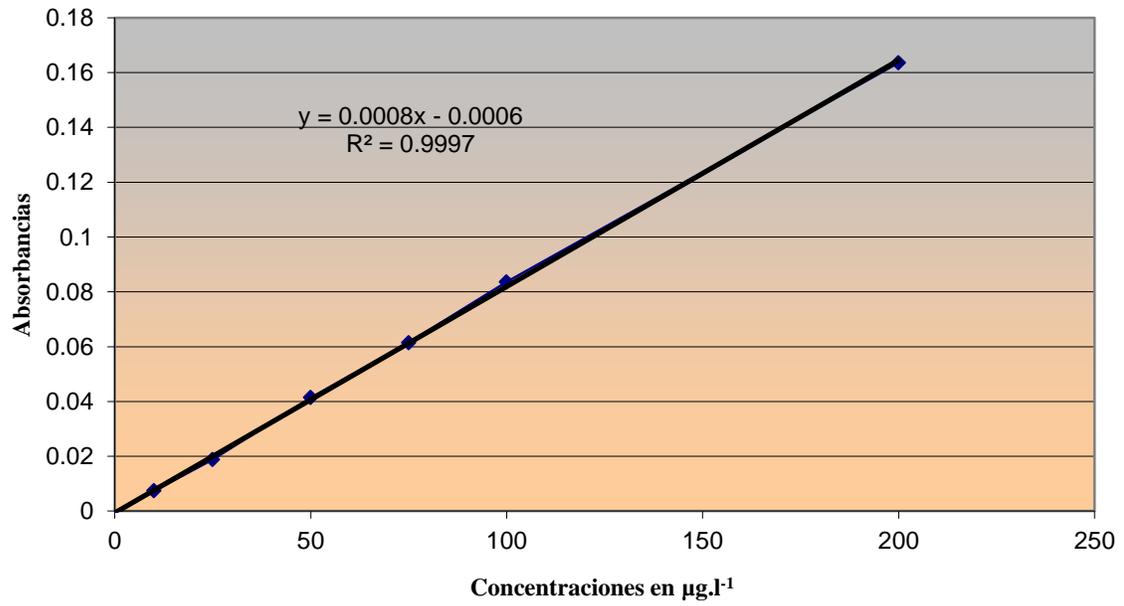
#### Precisión del modelo

$$RSD\% = \frac{S_{y,x}}{\bar{y}} \times 100$$

$$= 1,99$$



### Curva de calibración de Cromo Hexavalente





### 5.5 EXACTITUD

En la tabla No.8 se presenta la curva de calibración utilizada para determinar la exactitud del método.

**Tabla 8.Lectura de curva de calibración.**

Estándar	Absorbancias de los estándares de calibración		
	Replica 1	Replica 2	media
Blanco de reactivo	-0,001	0,000	0,000
Estándar 1(10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,008	0,007	0,008
Estándar 2 (25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,020	0,019	0,020
Estándar 3 (50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,040	0,040	0,040
Estándar 4 (75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,061	0,059	0,060
Estándar 5 (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,081	0,079	0,080
Estándar 6( 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,161	0,159	0,160



En la tabla 9 se presentan los resultados de las absorbancias y concentraciones obtenidas de las mediciones de la muestra C. En el anexo 4 se encuentra el reporte oficial emitido por Era Water con el valor verdadero de la muestra.

**Tabla 9. Resultados de las concentraciones de las absorbancias y concentraciones obtenidas de las mediciones de la muestra C.**

<i>Muestra C</i>	<i>Absorbancias</i>	<i>Concentración (<math>\mu\text{g.l}^{-1}</math>)</i>
Muestra C <sub>1</sub>	0,161	267,66
Muestra C <sub>2</sub>	0,161	267,66
Muestra C <sub>3</sub>	0,163	270,99
Muestra C <sub>4</sub>	0,162	269,33
Muestra C <sub>5</sub>	0,161	267,66
Muestra C <sub>6</sub>	0,161	269,33
Muestra C <sub>7</sub>	0,163	270,99
Muestra C <sub>8</sub>	0,162	269,33
Muestra C <sub>9</sub>	0,161	269,33

### Tratamiento estadístico de los resultados

Hipótesis:

$$H_0 = \bar{X} = \mu, H_1 = \bar{X} \neq \mu$$

**Media**

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^n X_i / n$$

$$=269,16$$



**Desviación estándar**

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

**=1,2269**

**Calcular t calculada de dos colas**

$$T_{calc} = \frac{|\bar{X} - \mu|}{S} * \sqrt{n}$$

**t<sub>calc</sub>=0,30 < t<sub>tab</sub>= 2,093**

**μ=268 ± 1,17**

**Sesgo del método**

$$E = \bar{X} - \mu$$

**= 1,16**



## 5.6 PRECISIÓN

Precisión intermedia

### Tratamiento estadístico de los datos

#### Precisión en condiciones de Precisión intermedia

#### ANALISTA A

#### Resultados de la curva de calibración del analista A

Tabla 10. Curva de calibración del analista A

Estándar	Absorbancias de los estándares de calibración		
	Replica 1	Replica 2	media
Blanco de reactivo	-0,001	0,000	0,000
Estándar 1 (10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,008	0,007	0,008
Estándar 2 (25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,020	0,019	0,020
Estándar 3 (50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,040	0,040	0,040
Estándar 4 (75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,061	0,059	0,060
Estándar 5 (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,081	0,079	0,080
Estándar 6 (200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,161	0,159	0,160



## Resultados de la lectura de concentración de la muestra A del analista A

Tabla 11. Resultados de la concentración de la muestra A del analista A.

Muestra A 75 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Concentración en $\mu\text{g.l}^{-1}$				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
ANALISTA A	70,6	69,5	67,5	70,0	70,0
	70,2	69,5	67,5	68,7	70,0
	70,6	69,5	67,9	68,7	70,1

## Analista B

### Resultados de la curva de calibración del analista B

Tabla 12. Curva de calibración del analista B.

Estándar	Absorbancia de los estándares de calibración		
	Replica 1	Replica 2	media
Blanco de reactivo	-0,001	-0,001	-0,001
Estándar 1 (10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,005	0,005	0,005
Estándar 2 (25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,017	0,018	0,018
Estándar 3 (50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,038	0,038	0,038
Estándar 4 (75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,058	0,057	0,058
Estándar 5 (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,077	0,077	0,077
Estándar 6 (200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,156	0,154	0,155



## Resultados de la lectura de concentración de la muestra A del analista B

Tabla 13. Resultados de la concentración de la muestra A del analista B.

Muestra A 75 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Concentración en $\mu\text{g.l}^{-1}$				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
ANALISTA B	70,8	73,4	64,4	69,5	68,3
	69,5	74,6	65,7	68,3	68,3
	69,5	74,6	67,0	68,3	70,8

## Analista C

### Resultados de la curva de calibración del analista C

Tabla 14. Curva de calibración del analista C.

Estándar	Absorbancia de los estándares de calibración		
	Replica 1	Replica 2	media
Blanco de reactivo	-0,002	-0,002	-0,002
Estándar 1 (10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,008	0,007	0,008
Estándar 2 (25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,023	0,022	0,023
Estándar 3 (50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,042	0,041	0,042
Estándar 4 (75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,063	0,061	0,062
Estándar 5 (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,082	0,082	0,082
Estándar 6 (200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,161	0,159	0,160



### Resultados de la lectura de concentración de la muestra A del analista C

**Tabla 15. Resultados de la concentración de la muestra A del analista C.**

Muestra A 75 $\mu\text{g.l}^{-1}$	Concentraciones en $\mu\text{g.l}^{-1}$				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
ANALISTA C	69,8	68,2	69,8	69,3	70,1
	69,8	68,7	69,8	69,8	70,1
	69,8	68,7	69,8	69,3	70,1



### Tratamiento estadístico de los datos

#### Resultados de la aplicación del Test de Grubbs

Tabla 16. Resultados del Test de Grubbs.

	Valor Mínimo	Valor Máximo	Datos por día $G_{(0,05 \text{ y } 9)}$	Existe valor Aberrante
$G_{c1}$	1.139043	1.474055	2.21	No
$G_{c2}$	0.959466	1.453863	2.21	No
$G_{c3}$	1.747267	1.102303	2.21	No
$G_{c4}$	1.276939	1.436556	2.21	No
$G_{c5}$	1.691731	1.213914	2.21	No

#### Resultados de la Homogeneidad de las varianzas aplicando el Test de Hartley

Tabla 17. Resultados del Test de Hartley.

	Dia No.1	Dia No.2	Dia No.3	Dia No.4	Dia No.5
<b>Analista A</b>	0,10666667	0,00000000	0,10666667	1,12666667	0,00666667
<b>Analista B</b>	7,46	0,96	3,38	0,96	4,16666667
<b>Analista C</b>	0,000000	0,166667	0,000000	0,166667	0,000000
<b>Suma</b>	7,566667	1,126667	3,486667	2,253333	4,173333
<b>GL</b>	6	6	6	6	6
<b>Var</b>	1,261111	0,187778	0,581111	0,375556	0,695556

$$r_c = \frac{S_{\max}^2}{S_{\min}^2}$$

$$r_c = \frac{1,2611}{0,1877}$$

$$=6,715976$$

$$r_{\text{tab}}, k=5, v=8$$



### 5.7 PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD

#### Resultados de la curva de calibración para el ejercicio de precisión intermedia en condiciones de Repetibilidad

Tabla 18. Resultados de curva de calibración utilizada para evaluar Precisión en condiciones de repetibilidad.

Estándar	Absorbancia de los estándares de calibración		
	Replica 1	Replica 2	media
Blanco de reactivo	0,000	0,000	0,000
Estándar 1 (10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,007	0,008	0,008
Estándar 2 (25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,020	0,021	0,021
Estándar 3 (50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,039	0,039	0,039
Estándar 4 (75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,061	0,061	0,061
Estándar 5 (100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,082	0,082	0,082
Estándar 6 (200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,160	0,158	0,159



## Resultados de la lectura de concentración de la muestra A

Tabla 19. Resultados de la concentración de la muestra A.

Muestra A	Absorbancias	Concentración ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )
Muestra A <sub>1</sub>	0,055	74,80
Muestra A <sub>2</sub>	0,054	73,40
Muestra A <sub>3</sub>	0,054	73,40
Muestra A <sub>4</sub>	0,051	73,40
Muestra A <sub>5</sub>	0,053	73,40
Muestra A <sub>6</sub>	0,053	72,10
Muestra A <sub>7</sub>	0,055	74,80
Muestra A <sub>8</sub>	0,053	73,40
Muestra A <sub>9</sub>	0,055	74,80
Muestra A <sub>10</sub>	0,053	72,10

### Tratamiento estadístico de los datos

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^n X_i / n$$

$$= 73,56$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$= 1,00022$$

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

$$= 1,35$$

$$CV < 5\%$$



## **6. Discusión de Resultados**



## **6.1 Discusión de los resultados**

- El límite de detección instrumental es de  $7.0245 \mu\text{g.l}^{-1}$  esta metodología para evaluar el límite de detección presupone que una señal mayor a  $3s$  por encima del valor del blanco probablemente sea del mesurando. Esta metodología es útil puesto que las lecturas del blanco dan una desviación estándar distinta de cero y el límite de cuantificación es de 18.6493.
- El rango de trabajo para realizar las determinaciones del analito de interés es de  $10\text{-}200 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Este rango fue verificado mediante la aplicación del test de Fisher para comparar las varianzas de los extremos del rango de determinación. Al no encontrarse diferencias significativas se demuestra que el rango establecido es lineal.
- La curva de calibrado del método presenta una relación lineal entre la señal analítica y las concentraciones. La linealidad del método fue verificado realizando los cálculos de: coeficiente de correlación ( $r=0.9999$ ), coeficiente de determinación ( $r^2=1.0000$ ), pendiente ( $b=0.000826$ ), el intercepto ( $a=-0.00063$ ), sus respectivas desviaciones estándares  $S_b=0.000006$ ,  $S_a=0.004051$ . con estos cálculos y aplicando el test de significancia al intercepto se demostró que no es significativamente diferente de 0. Los coeficientes de correlación y determinación se encuentran dentro del rango establecido.  
Se realizó el cálculo de los residuales y su gráfico respectivo donde se observa que el número de residuales positivos es aproximadamente igual al número de residuales negativos, los residuales se encuentran distribuidos aleatoriamente y no muestran tendencia.



- El método es exacto esto se determinó con la utilización de un estándar de referencia certificada de cromo hexavalente, con un valor certificado de  $268 \pm 1.17$  obteniéndose en el ejercicio de validación una media de los datos de 269.16 a estos valores se les aplicó un test de comparación de medias (t de student) donde se demostró que no son significativamente diferentes.

- **La precisión del método fue evaluado en dos condiciones:**

#### **Precisión en condiciones de repetibilidad**

Los datos de concentración de cromo hexavalente reportados por este método son repetibles, se determinó realizando una serie de mediciones bajo las mismas condiciones de operación con una muestra natural que contenía el analito de interés, estas mediciones presentaron un coeficiente de variación de 1.35 cumpliendo con el criterio de aceptación.

#### **Precisión en condiciones de precisión intermedia**

- La precisión intermedia se realizó para evaluar las fuentes de variación en el análisis, en este caso los factores de interés son el analista que realiza la medición y el día en que se realiza la medición, se aplicó el test de Grubbs y se demostró que no existen valores aberrantes en el conjunto de datos, se aplicó el test de Hartley comprobándose la homogeneidad de las varianzas, con estos test aplicados se realizó un análisis de datos, que es el análisis de las varianzas de los datos obteniéndose las varianzas entre analista (-0.152532) varianza entre días (3.562407) aplicándose a estos datos el Test de Fisher para pruebas de una cola a un nivel de confianza de 0.05 para comparar las varianzas demostrándose que no existen diferencias significativas entre días y entre analistas. Se calculó la precisión intermedia del método que fue de 2.8918 cumpliendo con el criterio de aceptación.



## **7. Conclusiones**



## **Conclusiones**

- Para la evaluación del desempeño del método para determinar Cromo hexavalente en aguas naturales a través de la técnica de colorimetría se evaluaron parámetros tales como: Limite de detección, Limite de cuantificación, Linealidad, Rango de trabajo, Exactitud, Precisión en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia.
- Todos los parámetros evaluados cumplen con los criterios de aceptación establecidos en el protocolo para la validación del método para determinar Cromo hexavalente en aguas naturales a través de la técnica de Colorimetría.
- Una vez evaluado el desempeño del método se ha confirmado mediante mediciones analíticas y provisión de datos objetivos que se cumplen los requisitos particulares para su uso específico y determinado.
- El método para la determinación de Cromo hexavalente en aguas naturales a través de la técnica de colorimetría es adecuado para su finalidad.



## **8. Recomendaciones**



## **Recomendaciones**

- El método para determinar Cromo hexavalente en aguas naturales a través de la técnica de colorimetría debe ser revalidado en caso de que se le haga alguna modificación que implique influencia en el comportamiento del método.
- Este método es aplicable para determinaciones en aguas naturales, el comportamiento del método en otra matriz varia por lo que si se pretende determinar el analito en una matriz diferente tal como aguas residuales debe realizarse nuevamente el proceso de validación en esta matriz.
- Realizar la estimación de la incertidumbre para este método.



### **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods.
- Procedimiento operativo normalizado para la Determinación de Cromo Hexavalente en Aguas naturales. PON-CM-14.
- Protocolo de validación del método para la Determinación de Cromo Hexavalente en Aguas naturales. PROT-CM-01
- Mongay Fernández Carlos .Quimiometria. Edición 2005.
- Miller J.C y J.N Miller. Estadística para Química analítica. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Edición 1993.
- Miller J.C y J.N Miller. Estadística y Quimiometria para Química analítica. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Cuarta edición 2002.



# **ANEXO 1**

*Certificados de calibración del material  
volumétrico*



## **ANEXO 2**

*Certificado de calibración de la balanza analítica*

*Sartorius TE214S*



# **ANEXO 3**

*Registro de calibración de espectrofotómetro con  
filtros Hellma*



# **ANEXO 4**

*Certificado de muestra de referencia de cromo  
hexavalente*

**ERA Waters Company**