



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA**

FACULTAD DE INGENIERÍA

***SEGUIMIENTO EN LÍNEA DE CONTAMINANTES DE AGUAS
RESIDUALES POR MEDIO DE ESPECTROFOTOMETRÍA***

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERIA**

P R E S E N T A

BERENICE LEÓN CORREO

TUTOR

DR.ALEJANDRO VARGAS CASILLAS

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Gabriela Moeller Chávez

Secretario: Dr. Gerardo Espinosa Pérez

Vocal: Dr. Alejandro Vargas Casillas

1er. Suplente: Dr. Alfonso Durán Moreno

2do. Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, gracias por darme todas las herramientas para terminar este proyecto.

Al apoyo del **CONACyT** (proyecto DGAPA-UNAM IN116209), sin el cual no hubiera podido terminar este trabajo.

A mi tutor el Dr. Alejandro Vargas Casillas, por su apoyo, asesoría y dirección.

Al Dr. Alfonso Durán Moreno y al Dr. Gerardo Espinosa Pérez por sus comentarios y sugerencias a lo largo de la maestría.

A la Dra. Gabriela Moeller, por la revisión de esta tesis

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, mil gracias por las observaciones de cada seminario

A todo el personal de LIPATA, de manera especial al Dr. Iván Moreno Andrade, por su asesoría en el congreso del IWA, a la M.C. Blanca P. Gamboa Rocha, por su guía en el congreso de AIDIS y al M.B. Jaime Pérez Trevilla, por su ayuda tanto dentro como fuera de laboratorio.

A mi querido amigo y compañero de proyecto, gracias Dorian por todas las veces que acudiste a mi auxilio.

A la ternura de persona, Xitlalli, por el tiempo, risas y platicas y a Christian por todos los comentarios y sugerencias.

A las niñas Aurora y Lili, por los momentos compartidos.

A Fabian y Leo, por ayudarme con variedad de trámites escolares.

A mi familia por apoyarme siempre.

Y por último a mi esposo, por su paciencia, cariño y apoyo.

CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract	2
1 Introducción.....	3
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Objetivo general del proyecto	4
1.3 Objetivos particulares del proyecto	4
1.4 Metas del proyecto	4
1.5 Alcances y limitaciones.....	5
1.6 Aportes	5
2 Antecedentes	6
2.1 Espectrofotometría como técnica de medición de contaminantes.....	8
2.2 Validación del método.....	21
3 Metodología.....	24
3.1 Etapa I.- Programación y calibración del espectrofotómetro	28
3.2 Etapa II.- Evaluación de las técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de una mezcla	33
3.3 Etapa III.- Adaptación del sistema de absorbancia en línea	37
3.4 Etapa IV.- Evaluación de las técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes, absorbancia en línea en un proceso foto-Fenton.....	42
4 Capítulo IV.- Resultados	48
4.1 Etapa I.- Programación y calibración del espectrofotómetro	48
4.2 Etapa II.- Evaluación de las técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes en una mezcla.....	53

4.3	Etapa III.- Sistema para medición de absorbancia en línea.....	56
4.4	Etapa IV.- Evaluación de las tres técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes en una mezcla, midiendo la absorbancia en línea en un proceso foto-Fenton	62
4.5	Propuesta de automatización	69
4.6	Conclusiones	71
4.7	Trabajo futuro.....	72
5	Bibliografía.....	73
6	ANEXOS.....	78
6.1	Validación del método de HPLC para concentraciones en una mezcla	78
6.2	Base de datos de las técnicas de calibración multivariable	79
6.3	Experimentos para búsqueda de rango de operación, aplicación de las tres técnicas para mezclas de colorantes.....	81
6.4	Evaluación de las técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes.....	81
6.5	Perturbaciones por cambio de celda.....	84
6.6	Concentraciones calculadas por los tres métodos a 9 mezclas en metanol	84
6.7	Gráficas de resultados, mezcla foto-Fenton	87
6.8	Gráficas de resultados, mezcla foto-Fenton, rango adaptado a cada colorante	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1	Proceso de análisis en laboratorio de contaminantes.....	6
Figura 2-2	Tipos de toma de muestras en sitio.....	7
Figura 2-3	Espectro UV/Vis y ejemplos de absorbancias características.	9
Figura 2-4	Espectro electromagnético.....	12
Figura 2-5	Interacción de la radiación electromagnética con la materia.....	13
Figura 2-6	Clasificación de los métodos cuantitativos de exploración UV-Visible.....	14
Figura 3-1	Estructura de los colorantes NA7, RA151 y AA113.....	25
Figura 3-2	Esquema del reactor.	27
Figura 3-3	Sistema de medición en línea	40
Figura 3-4	Colocación del equipo para medición en línea.....	40
Figura 4-1	Pantalla de medición del espectro de absorbancia.....	49
Figura 4-2	Relación lineal entre la absorbancia y la concentración de los colorantes	51
Figura 4-3	Concentraciones de colorantes individuales en mezclas calculadas.....	54
Figura 4-4	Pantalla de medición del espectro de absorbancia en línea	57
Figura 4-5	Comparación de absorbancias medidas en línea y fuera de línea, mezcla	59
Figura 4-6	Comparación de absorbancias medidas en línea y fuera de línea, colorantes	61
Figura 4-7	Cambio de espectro de absorbancia por variación de pH.....	62
Figura 4-8	Diagrama de flujo de propuesta de automatización.....	70
Figura 6-1	Resultados de la validación HPLC	79
Figura 6-2	Concentraciones de colorantes en mezclas diluidas con metanol.....	87
Figura 6-3	Concentraciones encontradas por DL, proceso foto-Fenton.....	88
Figura 6-4	Concentraciones encontradas por DNL, proceso foto-Fenton.....	89
Figura 6-5	Concentraciones encontradas por MCP, proceso foto-Fenton	90
Figura 6-6	Concentraciones encontradas por DL, foto-Fenton, rango personalizado.....	91

Figura 6-7 Concentraciones encontradas por DNL, proceso foto-Fenton, rango personalizado.....	92
Figura 6-8 Concentraciones encontradas por MCP, proceso foto-Fenton, rango personalizado	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1 Comparación: método de análisis en laboratorio y medición en línea.....	7
Tabla 2-2 Mediciones cuantitativas usando espectrofotometría UV/Vis	10
Tabla 3-1 Concentración usada de reactivo para un proceso foto-Fenton	27
Tabla 3-2 Características del espectrofotómetro USB4000	29
Tabla 3-3 Características espectrofotómetro <i>Lambda 25</i> (Perkin-Elmer).....	30
Tabla 3-4 Datos de la curva de calibración en una sola longitud de onda	34
Tabla 3-5 Rango de operación para cada técnica.....	35
Tabla 3-6 Análisis de las concentraciones de colorantes para encontrar el rango de operación	36
Tabla 3-7 Error cuadrático medio de cada técnica, colorantes sin mezclar	36
Tabla 3-8 Características del HPLC.....	43
Tabla 3-9 Gradiente de elución HPLC.....	44
Tabla 3-10 Longitud de onda y tiempo de retención de los colorantes. Método HPLC	44
Tabla 3-11 Rango de operación para cada técnica, foto-Fenton	45
Tabla 3-12 Análisis de las concentraciones de colorantes para encontrar el rango de operación	45
Tabla 3-13 Error cuadrático medio de cada técnica, proceso de foto-Fenton	46
Tabla 4-1 Informe de datos de absorbancia medidos en el espectrofotómetro USB4000.....	48
Tabla 4-2 Regresión lineal de las absorbancias medidas por el espectrofotómetro <i>Lambda 25</i> y las medidas por el espectrofotómetro USB4000.....	50
Tabla 4-3 Coeficiente de variación de absorbancias en el punto de máxima absorbancia de cada colorante.....	50
Tabla 4-4 Absorbancia a diferentes concentraciones de cada colorante	51
Tabla 4-5 Linealidad de la absorbancia de los tres colorantes medida con el espectrofotómetro USB4000	52
Tabla 4-6 Limite de detección y cuantificación del espectrofotómetro USB4000.....	52
Tabla 4-7 CV de cada técnica (%)	53
Tabla 4-8 Análisis de las concentraciones calculadas por DL, DNL y MCP.....	55

Tabla 4-9 Error cuadrático medio de cada técnica	55
Tabla 4-10 ANOVA de cada técnica.....	55
Tabla 4-11 Informe de absorbancia medida en línea	56
Tabla 4-12 Análisis de las concentraciones calculadas por DL, DNL y MCP, metanol.....	58
Tabla 4-13 Error cuadrático medio de cada técnica	58
Tabla 4-14 ANOVA de cada método, mezcla diluida en metanol	58
Tabla 4-15 Análisis de las concentraciones encontradas por DL, proceso foto-Fenton.....	63
Tabla 4-16 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DL, foto-Fenton.....	63
Tabla 4-17 Análisis de las concentraciones encontradas por DNL, proceso foto-Fenton.....	64
Tabla 4-18 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DNL, proceso foto-Fenton	64
Tabla 4-19 Análisis de las concentraciones encontradas por MCP, proceso foto-Fenton	64
Tabla 4-20 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por MCP, proceso foto-Fenton	65
Tabla 4-21 Análisis de las concentraciones encontradas por DL, proceso foto-Fenton, rango personalizado.....	66
Tabla 4-22 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DL, proceso foto-Fenton, rango personalizado.....	66
Tabla 4-23 Análisis de las concentraciones encontradas por DNL, proceso foto-Fenton, rango personalizado.....	67
Tabla 4-24 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DNL, proceso foto-Fenton, rango personalizado.....	67
Tabla 4-25 Análisis de las concentraciones encontradas por MCP, proceso foto-Fenton, rango personalizado.....	67
Tabla 4-26 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DNL, proceso foto-Fenton, rango personalizado.....	68
Tabla 6-1 Experimentos para validación HPLC.....	78
Tabla 6-2 Correlación datos HPLC, error cuadrático medio.....	79
Tabla 6-3 Base de datos de las técnicas de calibración multivariable.....	80

Tabla 6-4 Experimentos para la búsqueda del rango de operación de los métodos multivariados.	81
Tabla 6-5 Mezclas para la evaluación de DL, DNL y MCP	82
Tabla 6-6 Concentraciones calculadas para el colorante NA7 por los tres métodos.....	82
Tabla 6-7 Concentraciones calculadas para el Colorante RA151 por los tres métodos	83
Tabla 6-8 Concentraciones calculadas para el colorante AA113 por los tres métodos.....	83
Tabla 6-9 Concentraciones de 19 experimentos para la evaluación del cambio de celda.....	84
Tabla 6-10 Concentraciones calculadas para el colorante NA7 por los tres métodos.....	85
Tabla 6-11 Concentraciones calculadas para el colorante RA151 por los tres métodos	85
Tabla 6-12 Concentraciones calculadas para el colorante AA113 por los tres métodos.....	86

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	longitud de onda
ε	coeficiente de absorptividad molar
l	distancia que la luz atraviesa por un cuerpo
m	pendiente de la recta
b	intercepto de la ecuación de la recta
c	concentración
r^2	coeficiente de determinación
y	concentración
\mathbf{y}	vector de concentraciones
\mathbf{A}	matriz de absorbancias
x	absorbancia
\mathbf{x}	vector de absorbancias
β	error o residual
$\boldsymbol{\beta}$	vector error o residual
\mathbf{S}	matriz de absorbancias de experimentos
\mathbf{Z}	matriz con espectros base o coeficientes de la deconvolución
\mathbf{C}	matriz de concentraciones de experimentos
\mathbf{W}	matriz de pesos

LISTA DE ABREVIATURAS

AA113	colorante azul ácido No. 113
ACP	análisis de componentes principales
COD	carbono orgánico disuelto
COT	carbono orgánico total
CV	coeficiente de variación
DBO	demanda bioquímica de oxígeno
DL	deconvolución lineal
DNL	deconvolución no lineal
DQO	demanda química de oxígeno
K	nivel de confianza
LD	límite de detección
LC	límite de cuantificación
MCP	mínimos cuadrados parciales
NA7	colorante naranja ácido No. 7
NTK	nitrógeno total Kjeldahl
RA151	colorante rojo ácido No.151
RCP	regresión de componentes principales
S	desviación estándar
SST	sólidos suspendidos totales
UV/Vis	ultravioleta visible

Resumen

El objetivo de este trabajo fue adaptar un sistema óptico de seguimiento en línea de la absorbancia y concentración de contaminantes sometidos a un tratamiento de degradación.

Las herramientas empleadas en el seguimiento en línea fueron: un espectrofotómetro portátil (USB400, Ocean Optics), con el cual se midió el cambio de absorbancia en línea; una bomba de pistón, con la cual se tomó la muestra del efluente a tratar, y por último una computadora, donde se hizo el análisis de los datos.

Los datos de absorbancia en la región UV/Vis permiten conocer en tiempo real el cambio de la concentración del contaminante a lo largo del proceso, aplicando para ello técnicas quimiométricas multivariantes, como fueron: la deconvolución lineal, la deconvolución no lineal y los mínimos cuadrados parciales.

El desarrollo de este método de medición en línea ofrece las ventajas de proporcionar información acerca de las reacciones y subproductos que se forman durante el proceso de degradación de contaminantes, facilitar la automatización del proceso y permitir la identificación de perturbaciones en menor tiempo que una medición fuera de línea.

Como parte complementaria del trabajo se propuso un modelo de automatización usando información obtenida en línea, mostrando con ello un ejemplo de aplicación del método de medición desarrollado.

Palabras clave: absorbancia, colorantes azo, medición de concentración, deconvolución, medición en línea, mínimos cuadrados parciales.

Abstract

The aim of the project was to adapt an online monitoring of the absorbance and concentration of pollutants into one degradation process

The tools that were used in the on line monitoring were: one portable spectrophotometer (USB400, Ocean Optics), the spectrophotometer was used to on line measurement of the absorbance, one piston pump to take the sample of the effluent and finally a computer was used to analyzed the data

The absorbance data in the UV/Vis region allows, by multivariable chemometric techniques (linear deconvolution, nonlinear deconvolution and partial least squares), to known the change of the pollutant concentration in real time along the degradation process.

The development of this on line measurement technique offers the advantage of providing information of the reactions and the byproducts that are formed during the degradation process of pollutants, makes the automation easy to implement and allows the identification of perturbations in the process in less time than the usual laboratory measurement.

As a complementary part of the paper an automation model based on the on line information was proposed in order to show an application of the on line measurement developed

Key words: absorbance, azo dyes, concentration measurement, deconvolution, on line monitoring, partial least squares.

1 Introducción

1.1 Planteamiento del problema

En una planta de tratamiento el análisis de la calidad del agua es indispensable durante el proceso. Este tipo de análisis se lleva a cabo principalmente para dos fines. El primero de ellos está orientado al cumplimiento de la normatividad de descarga y se lleva a cabo principalmente bajo esquemas de muestreo establecidos donde el análisis de la muestra se realiza en un laboratorio con equipo especializado. El segundo fin del análisis del agua de una planta de tratamiento está dirigido al control del proceso. Para este fin no es necesaria una alta exactitud y precisión en el análisis; lo más importante es la rapidez de respuesta ante la presencia de perturbaciones en el proceso. Es por ello que los sistemas de medición en línea con una exactitud y precisión moderadas son más adecuados que los sistemas de análisis en laboratorios (Thomas y Pouet, 2005).

Entre los sistemas de análisis existentes, los más populares son los espectrofotométricos. Este tipo de métodos debe su popularidad a ventajas tales como la versatilidad y flexibilidad de usos, el mínimo de mantenimiento que requiere y la casi ausencia de reactivos necesarios para la preparación de la muestra a analizar. En el mercado existen variedad de equipos espectrofotométricos; algunos de ellos son especializados para mediciones en línea, sumergibles, dotados con sistemas de autolimpieza, con software especializado para su uso (Langergraber *et al.* 2004a) y cuya adquisición se encuentra fuera de las posibilidades de una planta de tratamiento pequeña. Otro tipo de espectrofotómetros son más económicos, pero requieren el uso de técnicas quimiométricas de calibración multivariable para la identificación y cuantificación de sustancias. Entre las técnicas más usadas para el análisis de espectros se encuentran la de mínimos cuadrados parciales, la deconvolución y el análisis de componentes principales, por mencionar algunas. Este tipo de técnicas han sido usadas por diferentes investigadores para el estudio de variedad de parámetros logrando mediciones directas e indirectas de diversos compuestos de interés (Dahlén *et al.*, 1999; Espinosa-Mansilla *et al.*, 1996; Ghasemi y Niazi, 2001; Hemmateenejad *et al.*, 2007; Khorassani *et al.*, 1998; Peralta-Zamora *et al.*, 1998; Pham *et al.*, 2008; Roig y Thomas., 2003; Şahin *et al.* 2007). Aún cuando existen varios estudios usando técnicas quimiométricas, son escasos los estudios aplicados a mediciones en línea y aún más escasos los aplicados a mediciones en línea donde el analito cambia su estructura, es decir, el espectro de absorbancia a lo largo del proceso.

En este proyecto se desarrolló un método económico, en comparación con los equipos especializados encontrados en el mercado, de medición en línea de la absorbancia y concentración de contaminantes. Para la medición en línea de la absorbancia se hace uso de un espectrofotómetro portátil usado en el

rango ultravioleta/ visible (UV/Vis), el procesamiento de la información recabada por el espectrofotómetro se realiza por medio de tres técnicas de calibración multivariable, que son: la deconvolución lineal (DL), la deconvolución no lineal (DNL) y los mínimos cuadrados parciales (MCP). Estas técnicas se aplican para la cuantificación individual de contaminantes(colorantes) evitando el uso de un sistema previo de separación de los componentes de la muestra. El sistema desarrollado, por ser un método óptico de análisis, no requiere el uso de muestras sacrificables, eliminando los desechos producto de la preparación de la muestra, además de que al ser un sistema de medición en línea, la información que proporciona es fácilmente usada para la implementación de controles de proceso. Otro aporte importante del trabajo es que aunque el desarrollo de la metodología fue enfocada a la cuantificación de colorante presente en una mezcla sin un proceso previo de separación, los pasos pueden ser seguidos como guía para la cuantificación de otro tipo de contaminante identificable por espectrofotometría. Cabe destacar que las técnicas quimiométricas se aplicaron a muestras sometidas a diferentes tiempos de un proceso de degradación foto-Fenton, siendo esto importante debido a que hasta la fecha no se encuentran muchos estudios dedicados a la aplicación de estas para cuantificar contaminantes que van cambiando su estructura conforme avanza el proceso de degradación.

1.2 Objetivo general del proyecto

Proponer un método de seguimiento en línea de contaminantes en aguas residuales usando espectrofotometría y técnicas quimiométricas de calibración multivariable, usando como modelo de contaminantes una mezcla de tres colorantes tipo azo.

1.3 Objetivos particulares del proyecto

- Medir el cambio de absorbancia en línea en un proceso foto-Fenton.
- Inferir la concentración de contaminantes en línea por medio de técnicas quimiométricas multivariable.
- Proponer un algoritmo de control usando la información recabada en línea.

1.4 Metas del proyecto

Se plantean las siguientes metas a alcanzar durante el desarrollo del proyecto:

- Programar y validar el método de medición de absorbancia en línea.
- Evaluar la aplicación de las técnicas quimiométricas de calibración multivariable al cálculo de concentraciones individuales en una mezcla.
- Adaptar el sistema a mediciones en línea.

- Evaluar la aplicación de las técnicas quimiométricas de calibración multivariable al cálculo de concentraciones individuales en una mezcla midiendo la absorbancia en línea.
- Proponer un sistema de automatización basado en el método de medición en línea desarrollado.

1.5 Alcances y limitaciones

El presente proyecto busca la medición en línea del cambio del espectro de absorbancia y la concentración de contaminantes en un proceso de tratamiento. La aplicación del método desarrollado se probó en un sistema fotoquímico empleado para la remoción de color en agua residual sintética con altas concentraciones de tres colorantes azo.

1.6 Aportes

Se desarrolló un sistema de medición del cambio de absorbancia de contaminantes en línea en un proceso foto-Fenton. El sistema resultante es portátil y fácil de instalar, muestra los cambios de absorbancia en intervalos de tiempo que, de hacerse fuera de línea, requerirían un enorme esfuerzo y gran cantidad de muestras sacrificables.

Se aplicaron técnicas quimiométricas multivariadas para la medición individual de contaminantes sin necesidad de un tratamiento de las muestras para la separación de contaminantes.

Se realizó una comparación del desempeño de tres técnicas quimiométricas multivariadas.

Se desarrolló una metodología a seguir para la cuantificación de otros contaminantes identificables por espectrofotometría.

2 Antecedentes

El método de análisis de laboratorio de contaminantes (método usual) en aguas residuales normalmente está conformado por los pasos mostrados en la Figura 2-1 :



Figura 2-1 Proceso de análisis en laboratorio de contaminantes

Fuente: Schatzlein y Thomsen 2008 (adaptación)

Este método es usado principalmente en la verificación del cumplimiento de normas ambientales. Sin embargo, el cumplimiento de normas sólo es el resultado de un adecuado seguimiento y control de las variables del proceso de una planta de tratamiento. Un sistema deseable de seguimiento y control requiere que el proceso siga un modelo adecuado, que tenga sensores en línea que permitan tener un seguimiento de parámetros (Tabla 2-1) y que se implementen estrategias de control con sus respectivos actuadores (Vanrolleghem y Lee, 2003). En esta cadena, un punto crítico de control del proceso son los sensores, los cuales permiten obtener la información necesaria para la programación del controlador. Dependiendo de la ubicación del sensor con respecto a la corriente a analizar se le puede clasificar como medición en línea, fuera de línea y en sitio (ver Figura 2-2). En la medición en línea, el sensor se coloca en la corriente a caracterizar, de tal manera que no existe un paso de toma de muestra. En el segundo método, fuera de línea, el sensor se localiza en un bucle con flujo continuo que toma la muestra y la regresa después de analizarla. El tercer método, que es considerado el más simple, consiste en tomar una muestra y analizarla fuera del proceso con un sistema portátil localizado lo más cerca posible de la corriente a caracterizar. De estas mediciones, las llamadas mediciones en-línea y

fuera de línea son comúnmente agrupadas y consideradas como mediciones continuas (Thomas y Pouet, 2005).

Tabla 2-1 Comparación: método de análisis en laboratorio y medición en línea

Aspecto	Método análisis de muestras en laboratorio	Medición continua
Número de muestras	Limitado por el tamaño del reactor y el tiempo de análisis de la muestra	Las muestras se retornan al sistema
Preparación de la muestra	Requiere preparación	Ninguna
Generación de contaminantes	La muestra analizada se convierte en un residuo indeseable	Ninguna
Control de proceso	Respuesta lenta a perturbaciones en el proceso	Respuesta rápida a perturbaciones en el proceso
Exactitud y precisión	Alta	Moderada

Fuente: Armenta *et al.*, 2008; Thomas y Pouet, 2005 (adaptación)

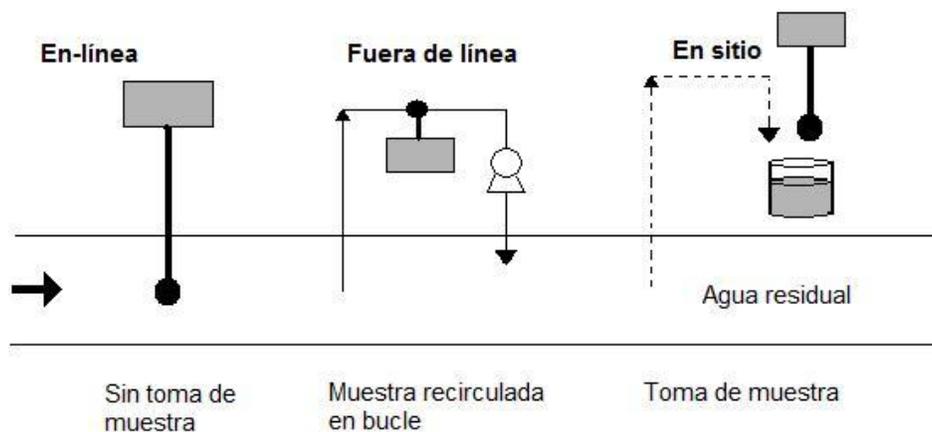


Figura 2-2 Tipos de toma de muestras en sitio

Fuente: Thomas y Pouet, 2005

Los sistemas de medición continua tienen la ventaja de que recirculan la muestra al efluente evitando que ésta, una vez analizada, se convierta en un nuevo contaminante. Además, estos sistemas de medición son más accesibles a adaptaciones para la automatización del proceso de muestreo, cubriendo con ello dos aspectos: medición directa evitando el uso de reactivos y automatización (Armenta *et al.*, 2008).

Con respecto al tipo de sensor, es deseable que éste sea resistente al ensuciamiento, obstrucción y requiera un mínimo de mantenimiento. Para la elección del tipo de sensor se debe tomar en cuenta cuál será el uso final de la información; es decir, si el sensor se empleará para el control del proceso, será usado en auditorías o para la calibración de modelos (Vanrolleghem y Lee, 2003).

Generalmente, la adaptación de los métodos de análisis usados en el laboratorio a un seguimiento en línea no es posible, por lo que se debe recurrir a métodos equivalentes o alternativos y al uso de modelos matemáticos o estadísticos para la estimación indirecta de los parámetros de interés (Thomas y Pouet, 2005). Actualmente, el desarrollo de instrumentos de medición de tamaños compactos han permitido que el espectrofotómetro UV/Vis sea el instrumento que domina el campo de pruebas en sitio, cuya información de la absorbancia medida en varias longitudes de onda específicas permite el seguimiento de diversas variables de respuesta tales como la concentración de nutrientes, la concentración de compuestos orgánicos y la turbiedad, entre otros (Van den Broeke *et al.* 2006), además de que es posible la medición indirecta de otros parámetros de interés mediante técnicas quimiométricas de calibración multivariable.

2.1 Espectrofotometría como técnica de medición de contaminantes.

En una planta de tratamiento existen variedad de parámetros a controlar, tales como temperatura, presión, nivel de líquido, flujo, conductividad, pH, biomasa suspendida, etc. De los diferentes tipos de sensores desarrollados para el seguimiento de estos parámetros destaca el uso de métodos que incluyen el uso de instrumentos ópticos de medición. Las técnicas de medición ópticas son económicas y aplicables a gran variedad de análisis gracias a que diversos componentes absorben luz en el rango UV/Vis (ver Figura 2-3). En la mayoría de los casos no necesitan reactivos para la preparación de la muestra, lo que hace de esta una técnica muy usada para la cuantificación y calificación de contaminantes (Pavia *et al.*, 1996; Schatzlein y Thomsen, 2008; Vanrolleghem y Lee, 2003).

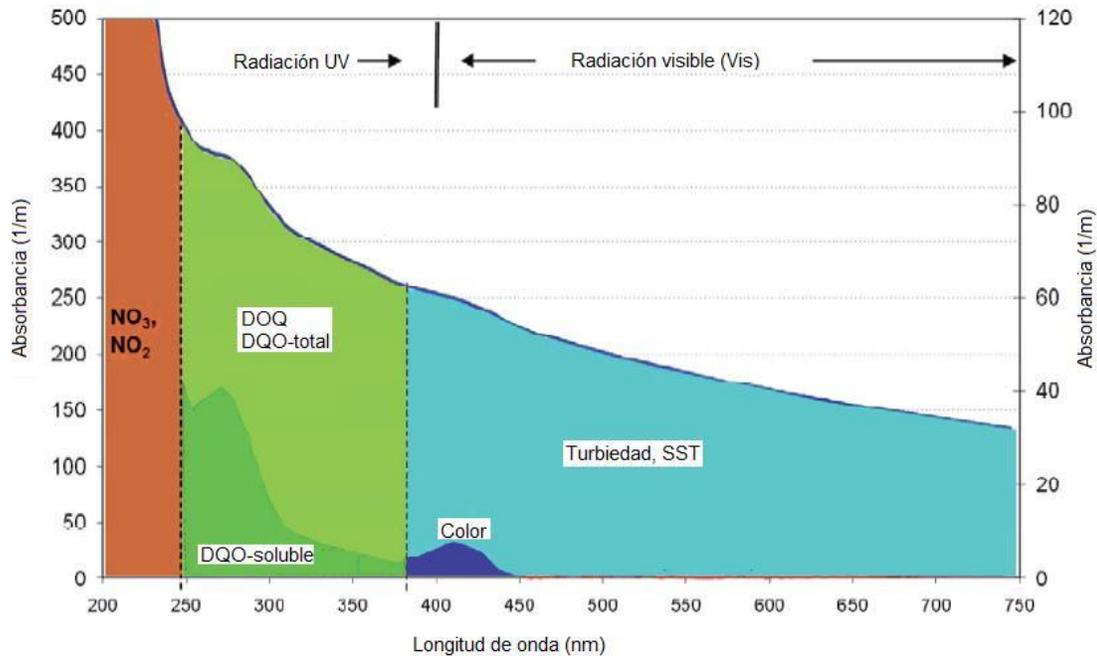


Figura 2-3 Espectro UV/Vis y ejemplos de los parámetros derivados con sus respectivas absorbancias características.

Fuente: Van den Broeke *et al.* (2006)

Gracias a los avances de la tecnología actualmente es posible medir todo el rango de absorbancia UV/Vis en muy poco tiempo, lo que convierte al espectrofotómetro en una herramienta de cuantificación muy útil para la medición directa e indirecta de diferentes parámetros del agua, ya sea en laboratorio, en sitio o adaptado a mediciones en línea (ver Tabla 2-2).

Debido a la gran información que ofrece la espectrofotometría y su facilidad para la adaptación al seguimiento de un proceso en línea, existen en el mercado diversos sistemas de seguimiento con espectrofotómetros especializados tales como el *spectro::lyser*TM, *carbo::lyser*TM, *nitro::lyser*TM, *color::lyser*TM, o el *multi::lyser*TM. Este tipo de espectrofotómetros se especializan en mediciones en línea de DBO, DQO, COT, NO₃, NO₂, SST, turbiedad y color; sin embargo, aún cuando la calibración viene de fábrica, muchas veces es necesario realizar una calibración con el efluente al que se le va a aplicar el seguimiento y esta nueva calibración local aumenta significativamente el desempeño del análisis (Langergraber *et al.* 2004a, Langergraber *et al.* 2004b). Si bien el sistema de limpieza y su fácil adaptación son una ventaja, esta ventaja tiene un alto costo económico. En este proyecto se busca un sistema de medición en línea económico y versátil que pueda adaptarse a la medición de diferentes parámetros usando el mismo equipo y siguiendo la metodología propuesta para la medición del contaminante cambiando únicamente el tipo de contaminante a buscar.

Tabla 2-2 Mediciones cuantitativas usando espectrofotometría UV/Vis

Parámetro	Medida			Referencia
	En laboratorio	En sitio	En línea	
Cloruro, sulfito	✓	✓		Roig y Thomas (2003)
DQO	✓	✓	✓	Langergraber <i>et al.</i> (2004a); Langergraber <i>et al.</i> (2004b); Roig y Thomas (2003); Vanrolleghem y Lee (2003); van den Broeke <i>et al.</i> (2006)
DBO	✓	✓	✓	Vanrolleghem y Lee (2003); van den Broeke <i>et al.</i> (2006)
Nitrato	✓	✓	✓	Dahlén <i>et al.</i> (2000); Khorassani <i>et al.</i> (1998); Langergraber <i>et al.</i> (2004a); Langergraber <i>et al.</i> (2004b); Pinheiro <i>et al.</i> (2004); Roig y Thomas (2003); Thomas <i>et al.</i> (1993); Vanrolleghem y Lee (2003); van den Broeke <i>et al.</i> (2006)
Nitrito	✓	✓	✓	Langergraber <i>et al.</i> (2004a); Langergraber <i>et al.</i> (2004b); Roig y Thomas (2003); van den Broeke <i>et al.</i> (2006)
Amonio, Cromo, Ortofostato, fosforo total	✓			Roig y Thomas (2003)
Fenol	✓	✓	✓	Roig y Thomas (2003)
Azucares , NTK (nitrogeno total Kjeldahl)	✓		✓	Roig y Thomas (2003)
Surfactantes	✓	✓	✓	Pinheiro <i>et al.</i> (2004); Roig y Thomas (2003)

Carbono organico total (COT)	✓	✓	✓	Dahlén <i>et al.</i> (2000); Dobbs <i>et al.</i> (1972); Khorassani <i>et al.</i> (1998); Langergraber <i>et al.</i> (2004a); Langergraber <i>et al.</i> (2004b); Roig y Thomas (2003); Thomas <i>et al.</i> (1993); Vanrolleghem y Lee (2003)
Carbono organico disuelto (COD)	✓			Escalas <i>et al.</i> (2003); Langergraber <i>et al.</i> (2004a); Langergraber <i>et al.</i> (2004b)
Solidos suspendidos	✓		✓	Azema <i>et al.</i> (2002); Langergraber <i>et al.</i> (2004a); Langergraber <i>et al.</i> (2004b); Pinheiro <i>et al.</i> (2004); Roig y Thomas (2003); Vanrolleghem y Lee (2003); van den Broeke <i>et al.</i> (2006)
pH en agua de mar	✓		✓	Tapp <i>et al.</i> (2000)
Benceno, fenol y anilina	✓			Hemmatenejad <i>et al.</i> (2007); Langergraber <i>et al.</i> (2004a); Langergraber <i>et al.</i> (2004b); Pinheiro <i>et al.</i> (2004)
Colorantes azo en mezcla	✓			Cristóvão <i>et al.</i> (2004); Peralta-Zamora <i>et al.</i> (1998); Şahin <i>et al.</i> (2007); Sayar y Özdemir (1998); Vidotti <i>et al.</i> (2005)
Colorantes azo sin mezclar	✓			Kumar <i>et al.</i> (2009); Naimabadi <i>et al.</i> (2009); Sponza y Işık (2002)
Aminas aromaticas	✓			Pinheiro <i>et al.</i> (2004)
Cobalto y níquel	✓			Ghaseemi y Niazi, (2001)
p-nitrofenol y p-aminofenol	✓			Vargas y Buitrón (2006)

2.1.1 Generalidades de espectroscopia

La espectroscopia estudia las interacciones de la radiación con la materia. Los métodos analíticos espectroscópicos se fundamentan en medir la cantidad de radiación que producen o absorben las especies moleculares o atómicas de interés. Se clasifican según el espectro electromagnético utilizado para la medida, abarcando los rayos gamma, los rayos X, la radiación ultravioleta (UV) y visible, la radiación infrarroja, las microondas y las radiofrecuencias. (Skoog, 2005).

La radiación electromagnética es una forma de energía que se transmite por el espacio a enorme velocidad; se denomina luz a la radiación electromagnética en las regiones del UV/Vis (ver Figura 2-4) (Skoog, 2005), que es la región que se usa en este proyecto.

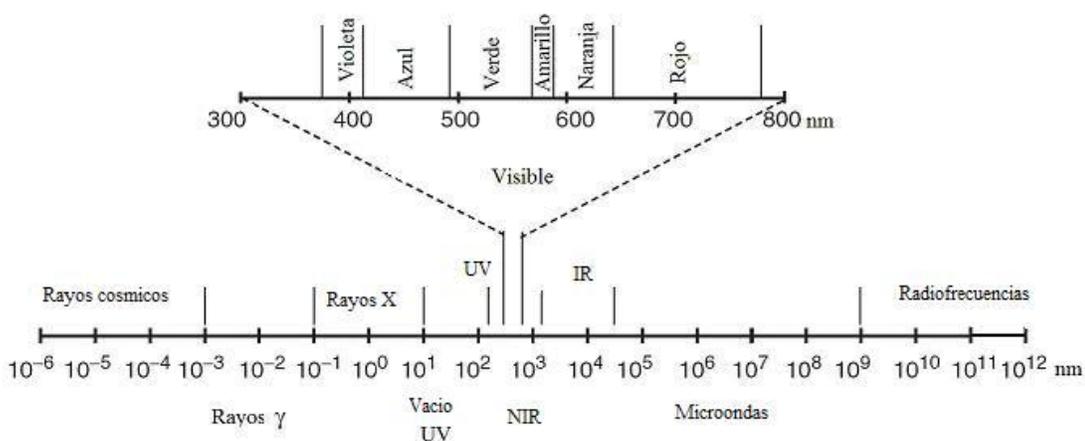


Figura 2-4 Espectro electromagnético.

Fuente: Burgess (2007)

Un espectro de absorción es la representación gráfica de la distribución de intensidad de la radiación electromagnética absorbida por una muestra de sustancia, en función de la longitud de onda de dicha radiación (Morcillo y Orza, 1972). Se pueden distinguir los siguientes tipos de espectros:

- Espectro de emisión
- Espectro de absorción

En los átomos los electrones ocupan estados o niveles de unos determinados valores energéticos. La emisión de luz está causada por el electrón que cae de un nivel de energía elevado (E_a) a uno más bajo (E_b), un fotón es emitido cuando se lleva a cabo una transición de un estado de mayor nivel de energía a uno inferior. De lo contrario, el átomo absorbe un fotón cuando salta del estado electrónico inferior a uno superior (ver Figura 2-5). La transición entre estos dos estados de distintos niveles de energía da lugar a la emisión o absorción de radiación

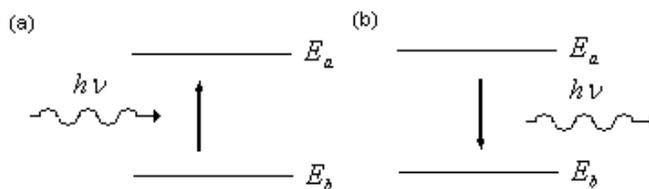


Figura 2-5 Interacción de la radiación electromagnética con la materia.
a) Absorción, b) Emisión. Fuente: Chang (1977)

En este proyecto se hace uso de la espectrofotometría de absorción en el rango UV/Vis; en la espectroscopia de absorción se mide la cantidad de luz absorbida en función de la longitud de onda, cada especie molecular puede absorber sus propias frecuencias características de radiación electromagnética, lo que proporciona información cuantitativa y cualitativa sobre la muestra. En este proceso se transfiere energía a la molécula y disminuye la intensidad de la radiación electromagnética incidente; es decir, la absorción de la radiación atenúa el haz en concordancia con la ley de absorción de Beer-Lambert. (Skoog, 2005)

La ley de **Beer-Lambert** establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente y a la longitud del trayecto que viaja la luz al atravesar el medio de absorción:

$$x = \varepsilon l y \quad 2-1$$

donde:

- x absorbancia
- ε coeficiente de absorptividad molar
- l distancia que la luz atraviesa por el cuerpo
- y concentración de la especie absorbente

Esta ley resulta válida para cada longitud de onda del haz de luz incidente en la muestra, siempre y cuando no existan interferencia con otros compuestos. La absorbancia de un compuesto a cada longitud de onda es directamente proporcional a la concentración del soluto, siempre y cuando la fuente de luz sea constante.

2.1.2 Espectrofotometría como técnica de análisis cuantitativo de una muestra

Aún cuando la mayoría de métodos cuantitativos usados en espectrofotometría se basan en la ley de Beer-Lambert, la elección del método de análisis depende del tipo de interferencia y complejidad que se presente en la muestra a analizar. En el caso de no existir interferencia, el análisis cuantitativo se realiza con métodos basados en la medición de absorbancia en una o varias longitudes de onda; sin

embargo las muestras libres de interferencia raramente se encuentran en el análisis de aguas residuales. La superposición de espectros de las diferentes sustancias que componen la muestra hacen inadecuado el uso de un sistema de medición basado en la lectura de una sola longitud de onda. En este caso el sistema de calibración univariable se vuelve deficiente y, para este tipo de análisis, se han desarrollado métodos cuantitativos más robustos.

La Figura 2-6 presenta una clasificación de los métodos cuantitativos existentes por espectrofotometría. En caso de mezclas de compuestos, cabe resaltar la diferenciación entre aquellos que consideran interferencias entre los compuestos y aquellos que no.

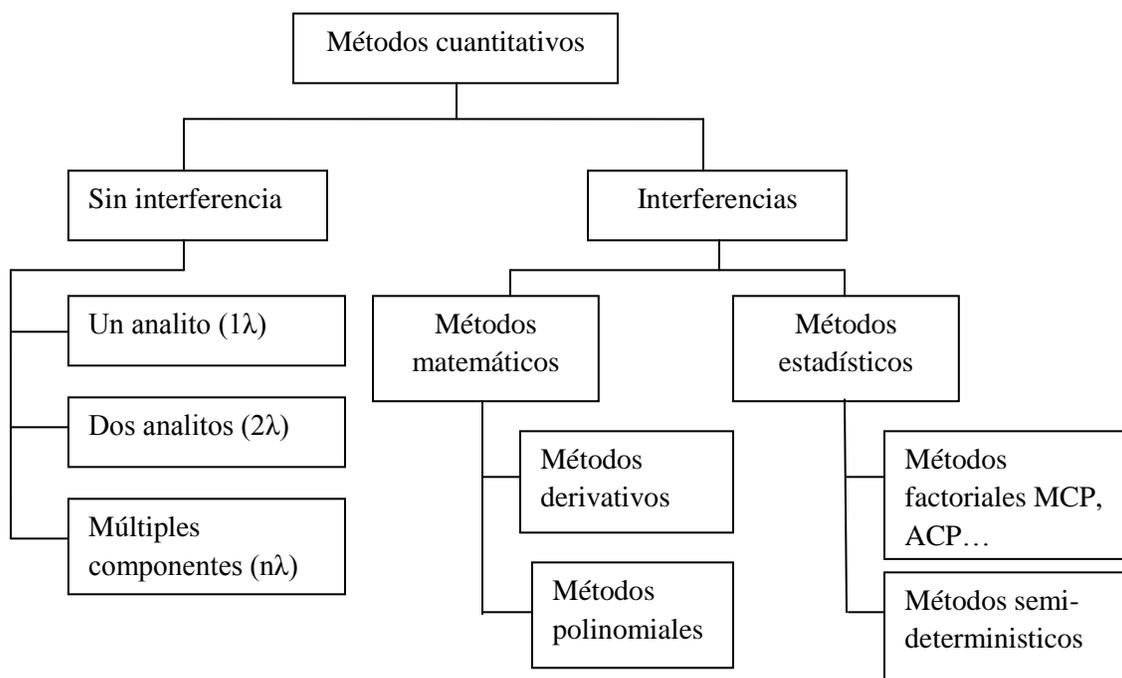


Figura 2-6 Clasificación de los métodos cuantitativos de exploración UV-Visible.

Fuente: Thomas y Cerda (2007)

Para el caso ideal (sin interferencias), para la cuantificación de una solución con un solo analito es suficiente una simple curva de calibración en una sola longitud de onda. En el caso de encontrarse dos analitos en la misma solución se buscan dos longitudes de onda diferentes de tal manera que la medición de un analito no interfiera con la medición del otro. En este caso es necesaria la creación de una curva de calibración para cada uno de los analitos; el método anterior podría extenderse para n componentes siguiendo el mismo razonamiento. Sin embargo la exactitud disminuye conforme aumenta el número de componentes involucrados y por ello es preferible el uso de técnicas de análisis multicomponentes para la cuantificación de los n analitos (Thomas y Cerda, 2007).

En el caso de presentarse interferencias, es necesario el uso de técnicas que permitan compensar la presencia de esas interferencias. Entre los métodos matemáticos se encuentran los métodos derivativos, que derivando el espectro de absorbancia, permiten la diferenciación de los compuestos cuyos espectros se encuentran sobrepuestos; sin embargo cada diferenciación numérica ocasiona una pérdida importante de sensibilidad. Otra manera de compensar el efecto de las interferencias es por medio de la búsqueda de funciones matemáticas que expliquen el espectro observado, de las cuales las más usadas son las polinomiales. El uso de diferentes grados del polinomio permiten considerar diferentes tipos de interferencias; por ejemplo el grado cero corresponde a una interferencia constante tal como suciedad en la celda, el primer grado es equivalente a interferencias que tienen una respuesta lineal, cuya solución es equivalente al uso del método de la segunda derivada. El uso de un grado mayor del polinomio toma en cuenta variedad de interferencias, sin embargo hay que tener cuidado de no caer en la sobre-modelación de las interferencias y los analitos (Thomas y Cerda, 2007).

Los métodos estadísticos para la compensación de interferencias incluyen métodos factoriales y semi-determinísticos. Entre los métodos factoriales, los más aplicados para el análisis de espectros son los mínimos cuadrados parciales (MCP) y el análisis de componentes principales (ACP) seguido de la regresión de componentes principales (RCP). El ACP consiste en la identificación y descomposición del espectro en factores seguido por una regresión de los mismos para la estimación de la concentración (RCP). Otro método factorial frecuentemente usado son los mínimos cuadrados parciales (MCP), que se diferencia del ACP y RCP porque los pasos de descomposición y regresión son llevados a cabo al mismo tiempo y porque en el proceso de descomposición también se incluye la información de la concentración. Este método posee un grado de complejidad mayor al de RCP pero presenta la ventaja de que puede ser usado para el estudio de mezclas complejas. En lo que se refiere a métodos semi-determinísticos constan de una parte determinística (compuestos que pueden ser encontrados en la muestra) y una estocástica, que puede ser de naturaleza experimental o matemática, como por ejemplo la diferencia de espectros (Thomas y Cerda, 2007).

En este trabajo en particular se ensayaron tres posibilidades: la deconvolución lineal (DL), que no considera interferencias y es multicomponente, la deconvolución no lineal (DNL), que sí las considera y es un método matemático polinomial, y los mínimos cuadrados parciales (MCP), que consideran posibles interferencias y son un método estadístico factorial.

2.1.3 Fundamentos matemáticos

Para el caso ideal de la cuantificación de un analito por medio del espectro de absorbancia sin interferencia se parte de la ecuación 2-1 de Beer-Lambert. Para cada longitud de onda, λ , se tiene que

la absorbancia medida, x , es el producto de tres cantidades: el coeficiente de absorptividad molar, ε , (característico de cada sustancia, independiente de su concentración y dependiente de λ), el ancho de la celda o cubeta donde se realiza la medición, l , (un valor generalmente constante y equivalente a la distancia recorrida por el haz de luz al atravesar la muestra), y la concentración del analito, y . Es decir, si no se cambia la celda ni el analito, se puede suponer que la concentración y la distancia recorrida por el haz de luz son constantes y no dependen de la longitud de onda:

$$x(\lambda) = \varepsilon(\lambda)ly \quad 2-2$$

Lo anterior implica que al variar la longitud de onda del haz de luz, se tendrán diferentes valores de absorbancia, constituyendo lo que se conoce como el espectro de absorbancia de la muestra, $x(\lambda)$. Para el caso un solo compuesto en la muestra este espectro es como una huella digital del mismo y toda la función $x(\lambda)$ será proporcional a su concentración. Es decir,

$$x(\lambda) = a(\lambda)y = \left(\frac{1}{m(\lambda)}\right)y \quad 2-3$$

con

$$a(\lambda) = \varepsilon(\lambda)l, \quad m(\lambda) = \frac{1}{a(\lambda)} \quad 2-4$$

Despejando la ecuación anterior para encontrar la concentración se aprecia que ésta es el resultado de un coeficiente de proporcionalidad más un coeficiente representativo de valores no explicados por el método (error o residual):

$$y = mx(\lambda) + \beta \quad 2-5$$

En el caso de una calibración univariable, se escoge una longitud de onda (generalmente aquella donde la absorbancia es mayor) y para hallar los coeficientes m y β , se realiza una regresión lineal con datos de concentración conocidos.

En el caso de una mezcla, si se supone que no existen interacciones, se parte del supuesto de que el espectro medido $x(\lambda)$ es la suma de los espectros individuales de los n componentes de las mezclas y entonces se tiene que:

$$x(\lambda) = y_1a_1(\lambda) + y_2a_2(\lambda) + \dots + y_n a_n(\lambda) \quad 2-6$$

donde las $a_i(\lambda)$ representan los *espectros base* de cada componente; es decir, los espectros que se medirían si la muestra sólo contuviera el compuesto respectivo en una concentración unitaria.

Los espectrofotómetros actuales permiten medir y registrar la absorbancia de un gran número de longitudes de onda proporcionando mayor información de la muestra, resultando en infinitas soluciones para la solución del sistema (Alciaturi *et al*, 2003).

En la práctica la absorbancia se mide sólo en ciertas longitudes de onda, por lo que el espectro medido se puede expresar como un vector de $m \times 1$, x . Lo que buscan los métodos multivariados es estimar el vector de concentraciones y , de $n \times 1$, a partir de este espectro medido, donde $m > n$ dando como resultado un sistema de ecuaciones con más ecuaciones que incógnitas cuya solución se debe buscar por medio de métodos de calibración multivariable tales como deconvolución lineal, deconvolución no lineal y mínimos cuadrados parciales.

En el método de deconvolución lineal se parte de la relación expresada en la ecuación 2-6, mientras que el método de deconvolución no lineal agrega otros términos no lineales a esta misma ecuación. En cambio, el método de mínimos cuadrados parciales intenta hallar directamente las concentraciones de los compuestos a partir de una transformación lineal del vector del espectro medido.

Deconvolución lineal

La ecuación 2-6, se puede expresar también de forma matricial:

$$x = Ay + \beta \quad 2-7$$

donde

- x es el vector de $m \times 1$ que contiene el espectro de la mezcla (m es el número de longitudes de onda en las cuales se midió la absorbancia).
- A es la matriz de $n \times m$ que contiene las absorbancias de los espectros base que componen la mezcla (donde n es el número de sustancias involucradas en la mezcla y m es el número de longitudes de onda en las cuales se midió la absorbancia); cada columna de la matriz corresponde a un espectro base.
- y es un vector que contiene las concentraciones de cada componente de la mezcla, de tamaño $n \times 1$ (n es el número de componentes de la mezcla).
- β es un vector de error de medición o residual de $m \times 1$.

El concepto de deconvolución parte de dos suposiciones importantes:

- La absorbancia es una combinación lineal de unos cuantos espectros base (coeficientes de deconvolución).

- La concentración es una combinación lineal de los coeficientes de deconvolución.

El procedimiento de deconvolución calcula el mejor ajuste entre la absorbancia medida y los espectros base que la componen, lo cual se logra mediante el método de mínimos cuadrados, ya que en este caso se trata de un sistema de ecuaciones con más ecuaciones que incógnitas. Por lo tanto generalmente no tiene solución y debe buscarse aquella que minimice el error cuadrático entre el espectro estimado con el modelo, $Ay+\beta$, y el espectro medido, x :

El método de estimación por mínimos cuadrados queda expresado por la siguiente ecuación:

$$\hat{y} = (A^T A)^{-1} A^T (x - \beta) \quad 2-8$$

Sin embargo, primero se requiere obtener la matriz A de espectros base. Para ello se crea una base de datos de calibración con r experimentos a concentraciones conocidas. Se pueden encontrar los coeficientes de deconvolución, es decir, la matriz A , mediante una serie de r experimentos con concentraciones conocidas resolviendo la siguiente relación (Vargas y Buitrón, 2006). Es importante que el número de experimentos sea mayor al número de sustancias que conforman la muestra mas uno ($r > n+1$), y que cada experimento sea con condiciones de concentración distintas:

$$S = AC + B \quad 2-9$$

Las matrices involucradas son las siguientes:

- S contiene las absorbancias de los r experimentos; es una matriz de tamaño $m \times r$, donde cada columna contiene el espectro medido de los r espectros de calibración; m es el número de longitudes de onda donde se tomó el espectro y r es el número de espectros resultantes de los diferentes experimentos.
- A son los espectros base a encontrar; es una matriz de $m \times n$. donde m son las longitudes de onda que se tomaron y n es el número de sustancias que conforman la mezcla
- C es una matriz cuyas columnas son las concentraciones de calibración de cada compuesto en la mezcla probada; es una matriz de $n \times r$.
- B es una matriz cuyas columnas son todas iguales al vector b , que es el espectro que indica la línea base de donde parten los espectros de la matriz. Nótese que $B = \beta u^T$, donde u^T es un vector renglón de unos (1's)

Expresado de manera matricial queda:

$$\begin{bmatrix} S_{1\lambda_1} & S_{2\lambda_1} & S_{3\lambda_r} \\ S_{1\lambda_2} & S_{2\lambda_1} & S_{3\lambda_r} \\ S_{1\lambda_n} & S_{2\lambda_1} & S_{3\lambda_r} \end{bmatrix} = \mathbf{Z} \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & c_{1r} \\ c_{21} & c_{22} & c_{2r} \\ c_{m1} & c_{m2} & c_{mr} \end{bmatrix} + [\beta \ \beta \ \beta]$$

Reacomodando la ecuación se tiene que

$$\mathbf{S} = [\mathbf{A} \ \beta] \begin{bmatrix} \mathbf{C} \\ \mathbf{u}^T \end{bmatrix} \quad 2-10$$

En esta expresión matricial, los valores desconocidos son los valores de \mathbf{A} y β , los cuales se pueden encontrar si se considera que:

$$\mathbf{Q} = [\mathbf{A} \ \beta] \quad 2-11$$

y

$$\mathbf{W} = \begin{bmatrix} \mathbf{C} \\ \mathbf{u}^T \end{bmatrix} \quad 2-12$$

quedando:

$$\mathbf{S} = \mathbf{QW} \quad 2-13$$

Entonces para encontrar el valor de $\hat{\mathbf{A}}$ y $\hat{\beta}$, se debe encontrar la matriz \mathbf{Q} que contiene esos valores:

$$\hat{\mathbf{Q}} = \mathbf{SW}^T(\mathbf{WW}^T)^{-1} \quad 2-14$$

De la ecuación anterior se aprecia por qué se pide que $r > n+1$ y que cada experimento de calibración sea con un conjunto distinto de concentraciones en la mezcla. Eso garantiza que la matriz \mathbf{WW}^T no sea singular y que exista su inversa, puesto que entonces el rango de la matriz \mathbf{W} es $n+1$. Con los valores obtenidos, se pueden ahora encontrar las concentraciones de cada una de las sustancias que conforman una mezcla con un espectro medido \mathbf{x} (ecuación 2-7).

Deconvolución no lineal

En la deconvolución no lineal se aumentan términos cuadráticos para tomar en cuenta las posibles interacciones entre compuestos. Esto se basa en considerar que a cada longitud de onda la aportación de cada componente de la mezcla a la absorción medida es una combinación lineal de las concentraciones individuales, sino también de las interacciones entre ellas. Agrega entonces otros espectros base, que corresponden a los de las interacciones.

$$x(\lambda) = y_1\alpha_1(\lambda) + y_2\alpha_2(\lambda) + y_n\alpha_n(\lambda) + \dots + \sqrt{y_1y_2}\alpha_{1,2}(\lambda) + \sqrt{y_1y_3}\alpha_{1,3}(\lambda) + \sqrt{y_2y_3}\alpha_{2,3}(\lambda) + \dots$$

2-15

El procedimiento es similar al de la deconvolución lineal, pero ahora requiere técnicas de optimización no lineal para hallar un estimado del vector de concentraciones a partir del vector de absorbancias medido, pues ya no es posible usar el método de mínimos cuadrados lineal.

La calibración del método, en cambio, se puede realizar de manera muy similar a la anterior, agregando las columnas correspondientes a la matriz C en la ecuación 2-9. El procedimiento se detalla en el artículo de Vargas y Buitrón (2006).

Mínimos cuadrados parciales

Al igual que los métodos anteriormente mencionados, el método de mínimos cuadrados parciales es un método de calibración multivariable empleado para la determinación simultánea de varios analitos en una muestra dada sin la necesidad de la separación de los mismos (Al-Degs, 2009). Su objetivo es predecir un conjunto de variables dependientes de un conjunto de variables independientes o predictores. Estas variables para predicción son obtenidas mediante la extracción de un conjunto de factores ortogonales llamados variables latentes, con los cuales se puede obtener la mejor predicción. (Abdi, 2007). En términos prácticos lo que hace el método de mínimos cuadrados parciales es hallar una matriz de pesos W , de tamaño $n \times m$, y un vector de compensación β , de tamaño $n \times 1$, con los cuales se obtiene el vector de concentraciones, y , directamente a partir del vector del espectro medido, x .

Este método supone que el espectro medido $x(\lambda)$, es en realidad un conjunto de m datos de absorbancia y a cada dato el método le asigna un peso específico $w_{i,j}$, dependiendo de la relevancia de la información en cada longitud de onda.

$$y_1 = \beta_1 + \sum_i w_{i1} x(\lambda_i) \quad y_2 = \beta_2 + \sum_i w_{i2} x(\lambda_i) \quad y_3 = \beta_3 + \sum_i w_{i3} x(\lambda_i)$$

2-16

En forma matricial esto es:

$$y = Wx + \beta \quad 2-17$$

Cabe resaltar que en el procedimiento de calibración del mismo, es decir, el hallar la matriz W y el vector β , lo que se hace es generar r espectros de absorbancia para r mezclas con concentraciones conocidas, de la misma manera que para la calibración de los métodos anteriores. En el modelo esto puede expresarse sustituyendo el vector x por una matriz X de $m \times r$ cuyas r columnas corresponden a

los espectros medidos de las r mezclas, y sustituyendo el vector y por otra matriz Y de $n \times r$, cuyas r columnas son las concentraciones conocidas de las r mezclas usadas para calibración:

$$Y = WX + [1 \quad \dots \quad 1]\beta \quad 2-18$$

El problema radica en que la matriz W no puede hallarse por mínimos cuadrados, puesto que en general $r < m$. El procedimiento de mínimos cuadrados parciales (MCP) es un algoritmo iterativo que busca esta matriz procurando maximizar la varianza entre Y y X en cada iteración y con ello al final se encuentran tanto la matriz W como el vector β .

Estas técnicas, junto con la espectrofotometría UV/Vis, han demostrado su efectividad para la determinación de parámetros de calidad del agua tales como DQO, nitrato y carbono orgánico, la cuantificación de colorantes, y la determinación de colorantes en bebidas (Al-Degs, 2009; Dahlén *et al.*, 2000; Escalas *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2008; Şahin. *et al.*, 2007; Vargas y Buitrón, 2006).

El uso de estas herramientas hace posible el desarrollo de nuevos métodos, cuyos resultados deben ser validados con respecto a métodos estándar. En el capítulo siguiente se repasan los parámetros mayormente evaluados para la validación de un nuevo método.

2.2 Validación del método

La validación es la evaluación del desempeño de un nuevo instrumento o metodología con relación al instrumento o la metodología que está actualmente en uso con el fin de proporcionar evidencias objetivas que demuestren que el método evaluado presentará una reproducibilidad y exactitud aceptables tanto como el método que está en uso (Walton, 2001). En este trabajo se revisaron algunos parámetros que son frecuentemente usados para la validación del método: exactitud, precisión o repetitividad, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación.

La finalidad de llevar a cabo una validación del método es proporcionar evidencia objetiva de que el nuevo método presenta buena reproducibilidad y exactitud. La **exactitud** es el grado de concordancia entre los valores obtenidos en una prueba y los valores aceptados como verdaderos (Mansilha *et al.*, 2010); la exactitud del nuevo método puede ser obtenida mediante la comparación del desempeño del nuevo método con respecto a un método de referencia, midiendo materiales de referencia o comparando el nuevo método con el que será reemplazado (Walton, 2001). La **precisión** es la medida de la reproducibilidad del nuevo método, donde la imprecisión es un reflejo de la cantidad de variación que es inherente al mismo (Walton, 2001), la precisión se expresa generalmente en términos de desviación estándar o coeficiente de variación y puede considerarse en dos niveles, un nivel es la

precisión intra-días que expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo y la precisión entre-días que es evaluada en un periodo más largo de tiempo (Mansilha *et al.*, 2010).

Otro parámetro de evaluación es la **linealidad**. En la evaluación de este parámetro se comprueba la capacidad del método para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito contenido en la muestra. Un sistema es lineal cuando cumple una relación matemática entre las variables “y” y “x” del tipo

$$y_i = mx_i \quad 2-19$$

siendo y_i los valores predichos (variable dependiente) y x_i los predictores (variable independiente) para cada una de las i medidas realizadas, m es la pendiente de la recta y b es el intercepto, esta forma es la manera habitual de representar un modelo de regresión clásico; es por ello que una forma usual de verificar la linealidad de una técnica de medición es realizar un regresión lineal donde se evalúa la relación entre las dos variables. En el modelo de regresión lineal se determinan los parámetros por medio de la ecuación general de la recta. Para medir el grado de dependencia de las variables evaluadas se usa del coeficiente de determinación (r^2), que se calcula como lo muestra la ecuación 2-20 (Amigo, 2007, Herrera *et al.*, 2008)

$$r^2 = \left(\frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}} \right)^2 \quad 2-20$$

Una vez que se estudia la linealidad del método se puede obtener el rango de operación, se puede establecer que si una muestra es analizada dentro o al extremo de este rango de operación los resultados del análisis tendrán un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión (Mansilha *et al.*, 2010).

Otros parámetros importantes que se evalúan son el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC); el límite de detección es la mínima concentración del analito que puede ser distinguido del ruido de fondo de una manera confiable y puede ser calculado basándose en los parámetros de una curva de calibración, sin embargo los resultados de este cálculo no necesariamente poseen una exactitud aceptable; para encontrar la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificado con una precisión y exactitud aceptable se calcula el límite de cuantificación, este valor también es calculada con base en los parámetros de la curva de calibración (Mansilha *et al.*, 2010).

Los parámetros anteriormente mencionados complementando los análisis con análisis ANOVA son usados para la revisión de las limitaciones y diferencias de un método nuevo con respecto a otro tomado como referencia. A lo largo de la metodología se menciona la aplicación de cada parámetro para la medición en línea así como la manera en que se evaluó.

3 Metodología

Como modelo de contaminante se tomaron los colorantes tipo azo. Los colorantes tipo azo representan el 70% de los colorantes producidos mundialmente; son usados tanto para alimentos, impresiones y en la industria textil, donde representan del 60% al 70% del colorante usado (Coughlin *et al.* 2002, Kumar *et al.* 2009)

Con respecto a su estructura, ésta se caracteriza por la presencia de un grupo cromóforo ($-N=N$) unido por un lado a un núcleo aromático o heterocíclico, y por el otro lado puede estar unido a una molécula insaturada de tipo carbocíclica, heterocíclica o alifática.

Los colorantes usados para este trabajo son los colorantes: naranja ácido No. 7 (NA7), rojo ácido 151 (RA151) y azul ácido 113 (AA113), cuyas estructuras se muestran en la Figura 3-1. El agua contaminada por este tipo de colorantes presenta problemas estéticos y daños en la vida acuática debido a que esta se ve perjudicada por la obstrucción de la penetración de oxígeno disuelto debido al color del contaminante (Manu y Chaudhari, 2002). El agua contaminada con colorantes azo es difícilmente biodegradable (la relación de DBO_5/DQO varía entre 0.2 a 0.4), originando en un proceso de degradación subproductos tales como aminas aromáticas, peligrosos para la salud humana y el medio ambiente. Por lo anterior, este tipo de efluente requiere ser tratado completamente antes de ser liberado al medio ambiente (Benigni y Passerini 2002; Li *et al.* 2009, Lu *et al.* 2009).

Este tipo de contaminantes no son removidos por lodos activados (Kumar *et al.* 2009); para la decoloración del efluente se pueden usar técnicas físico-químicas (coagulación, floculación, absorción y filtración con membranas), pero presentan la desventaja de la generación de lodos y ensuciamiento de membranas (Lu *et al.*, 2009). Otro tipo de tratamiento es el uso de cultivos puros (algas, hongos y bacterias), lo cual resulta impráctico debido a la dificultad de la conservación de la pureza del cultivo (Manu y Chaudhari, 2002). Los tratamientos que han sido reconocidos como eficientes son los tratamientos biológicos y de oxidación avanzada; ambos son eficientes, pero el tratamiento biológico presenta la desventaja de tiempos de retención largos y los procesos de oxidación avanzada, aunque no tienen esta desventaja, el costo de reactivos para la generación del radical hidroxilo ($HO\bullet$) hace que su funcionamiento no sea tan económico como un proceso biológico (van der Zee y Villaverde, 2005).

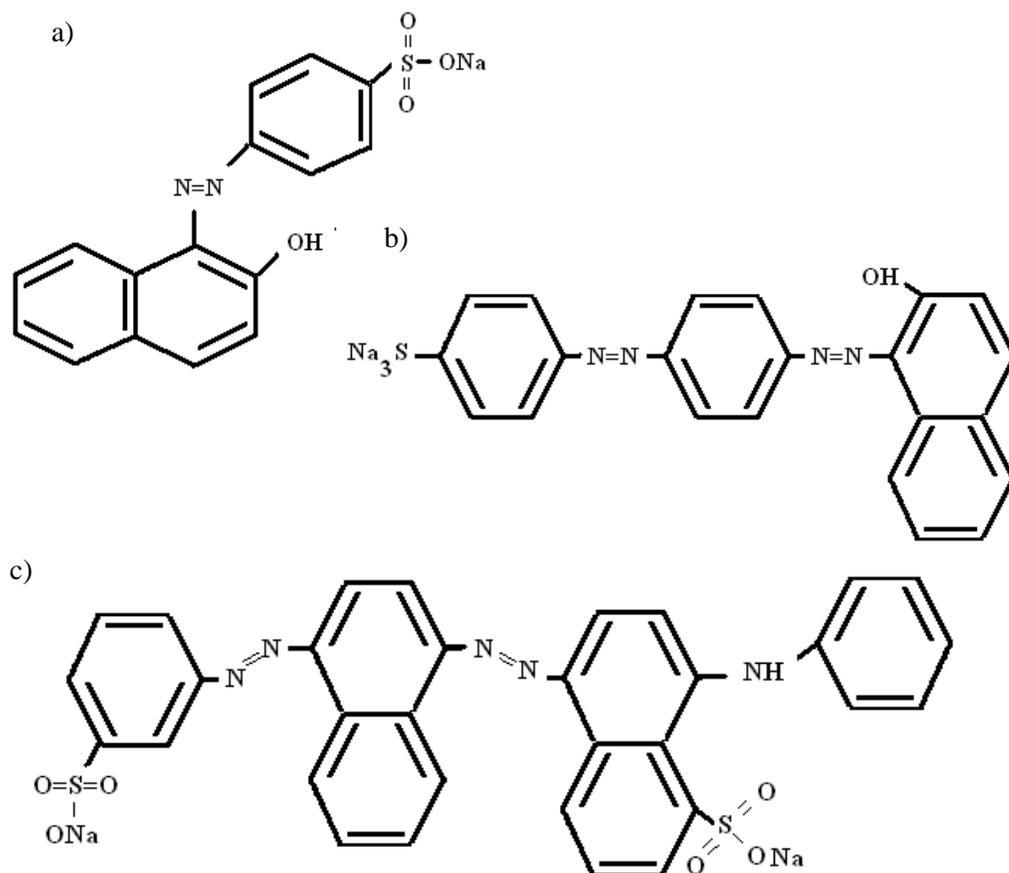


Figura 3-1 Estructura de los colorantes Naranja ácido 7, Rojo ácido 151 y Azul ácido 113

Un proceso de oxidación avanzada (POA) se basa en la generación de especies reactivas como es el radical hidroxilo (HO•), que lleva a cabo la mineralización parcial o completa de varios químicos orgánicos (Kumar *et al.* 2009). No genera lodos (evitando un tratamiento posterior) y, aunque se encuentran entre los procesos de mayor costo, son fáciles de operar (Paradowska 2004; Prato-García, 2010). Este tipo de tratamiento es el que finalmente se usó para la instalación del sistema de seguimiento en línea.

Proceso de degradación.- El proceso de degradación al cual se le aplicó el seguimiento en línea de contaminantes (colorantes) es un proceso foto-Fenton. Este proceso ha demostrado su efectividad en efluentes provenientes de industrias químicas, petroquímicas y farmacéuticas que contienen compuestos orgánicos como fenoles, bencenos, alcoholes, aminas, éteres y derivados aromáticos clorados en distintas concentraciones y combinaciones. Este proceso consiste en transformar, por

medio de agentes químicos, contaminantes orgánicos en compuestos inocuos, dióxido de carbono y agua, por un proceso de oxidación. (Martínez y López, 2001). La oxidación del contaminante involucra un gran número de intermediarios y reacciones elementales y el responsable de la oxidación es el radical hidroxilo HO (Martínez y López, 2001). Existen diferentes maneras para generar radicales hidroxilo, pero en este proyecto se usa la reacción entre H₂O₂ y Fe²⁺. El peróxido de hidrógeno y las sales de hierro reaccionan formando HO[•] y HOO[•] (reacción 1).



Para evitar que se precipite el hierro en forma de hidróxido, Fe(OH)₃ las reacciones entre Fe²⁺ y H₂O₂ se llevan a cabo en un pH preferentemente ácido.

En este proyecto la reacción Fenton es llevada a cabo bajo la irradiación solar, hablando entonces de una reacción foto-Fenton (reacción 2) (Prato-García *et al.*, 2009)



La cinética de remoción del color es hasta cierto punto directamente proporcional a la dosis de H₂O₂ y Fe²⁺. (Sahunin *et al.* 2006).

Foto-reactor CPC (colector parabólico compuesto).- Construido previamente en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) del Instituto de Ingeniería de la UNAM como parte de un proyecto de doctorado, este sistema consta de tres tubos PYREX acoplados a unas secciones semicirculares forradas de una película de papel aluminio, colocados sobre una base triangular. El agua es recirculada del tanque de mezclado al reactor por medio de una bomba a una velocidad de 4L/min (ver Fig 3-2). Los reactivos (Fe²⁺ y H₂O₂) son añadidos en el tanque de mezclado. El volumen del reactor es de 2.5 L. El diseño y operación del reactor, las dosis de reactivo a usar para el tratamiento foto-Fenton, así como el método de muestreo fuera de línea proviene de otro proyecto del grupo de investigación (Prato-García, 2010).

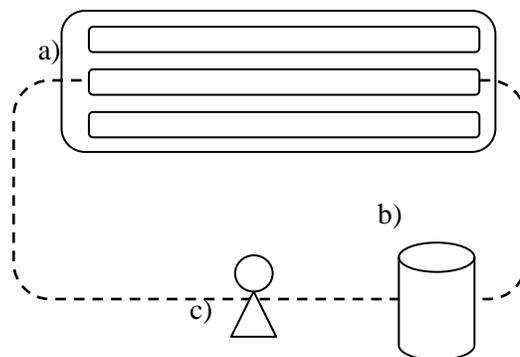


Figura 3-2 Esquema del reactor.
a.- reactor, b.- tanque de mezclado, c.- Bomba

En la Tabla 3-1 se muestra la dosis empleada en el proceso de degradación foto-Fenton de los colorantes.

Tabla 3-1 Concentración usada de reactivo para un proceso foto-Fenton

Colorante (100mg/L)	Concentración (mg/L) H₂O₂	Concentración (mg/L) Fe
NA	100	10
RA	122	10
AA	178	10

La metodología a seguir consta principalmente de cuatro etapas, que se explican a continuación.

- I. Programación y calibración del espectrofotómetro USB4000:
 - Obtener del espectro de absorbancia usando LabView versión 7.1 (National Instruments) como ambiente de programación;
 - Fijar parámetros de operación (rango de longitud de onda a operar, tiempo de integración, promedio de espectros) y seleccionar la celda;
 - Validar la medición del espectro de absorbancia tomando como referencia el espectrofotómetro *Lambda 25* (Perkin-Elmer).
- II. Evaluación de las tres técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes en una mezcla:
 - Crear la curva de calibración de los colorantes;
 - Obtener los rangos de operación de cada técnica multivariable (rango de longitudes de onda a usar y número de factores en el caso de MCP);

- Aplicar las tres técnicas de calibración multivariable para el cálculo de concentraciones de cada colorante en una mezcla;
 - Comparar los tres métodos.
- III. Adaptación del sistema para medición de absorbancia en línea en un proceso foto-Fenton:
- Adaptar el espectrofotómetro a mediciones en línea (acoplamiento bomba-espectrofotómetro-reactor);
 - Validar la celda de flujo continuo con respecto a la celda normal usada para mediciones fuera de línea;
 - Validar la medición de absorbancia en línea.
- IV. Evaluación de las tres técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes en una mezcla midiendo la absorbancia en línea para un proceso foto-Fenton:
- Obtener los rangos de operación de cada técnica multivariable (rango de longitudes de onda a usar y número de factores en el caso de MCP) para un proceso foto-Fenton
 - Aplicar las tres técnicas de calibración multivariable para el cálculo de concentraciones de cada colorante en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, comparar los tres métodos
- V. Conclusiones y propuesta de un algoritmo de control.

3.1 Etapa I.- Programación y calibración del espectrofotómetro

Esta etapa abarca la programación del espectrofotómetro y la evaluación de diferentes parámetros de validación del método como exactitud, precisión, linealidad, límite de detección y de cuantificación; para la evaluación de cada parámetro fue necesaria la preparación de experimentos que permitieran la comparación de estos parámetros con las mediciones tomadas como referencia, con el fin de validar el espectro de absorbancia.

Reactivos y materiales.-Los materiales utilizados fueron los siguientes

- Agua destilada (Elix 3-Millipore[®]) con un pH de 2.8-3.0
- Para ajuste de pH se usó H₂SO₄ 1M (ACS reactivo, 95-98%) y NaOH 1M (ACS reactivo, >98%).
- Colorantes tipo azo
 - Naranja Acido 7 (NA7), Clariant S.A. de C:V. (concentración medida a una longitud de onda de 485nm, pH en el rango 2.8-3.0)
 - Rojo acido 151 (RA151), Clariant S.A. de C:V. (concentración medida a una longitud de onda de 516nm, pH de a 2.8-3.0)

- Azul ácido 113 (AA113), Sigma-Aldrich (concentración medida a una longitud de onda de 549nm, pH de 2.8-3.0)
- Metanol (CH₃OH) J.T. Baker

Preparación de muestras.- Las soluciones de los colorantes fueron preparadas partiendo de una concentración inicial de 1 g/L; la dilución se realizó en matraces aforados de 50mL con agua destilada hasta alcanzar las concentraciones deseadas. El pH fue controlado en el rango 2.8-3.0. La concentración de los colorantes y las absorbancias de referencia fueron medidas en el espectrofotómetro *Lambda 25* (Perkin-Elmer).

Instrumentación.- Se usaron dos espectrofotómetros, el espectrofotómetro portable USB400 (Ocean Optics), que es el espectrofotómetro que realizará las mediciones en línea, y el espectrofotómetro de banco *Lambda 25* (Perkin-Elmer), el cual se tomó como referencia para la calibración del espectrofotómetro USB400. Las características principales del espectrofotómetro USB400 se enlistan en la Tabla 3-2, mientras que las del espectrofotómetro de banco *Lambda 25* (Perkin-Elmer) se pueden ver en la Tabla 3-3.

Tabla 3-2 Características del espectrofotómetro USB4000

Características	
Longitud de onda	200-1100nm
Fuente de luz	lámpara de deuterio y tungsteno
Tamaño	89.1 mm x 63.3 mm x 34.4 mm
Peso	190 g
Software	Desarrollado para este proyecto usando LabView versión 7.1 (National Instruments) como ambiente de programación
Detector	Dispositivo de transferencia de carga (CTD) y dispositivo de carga acoplada (CCD)

Fuente: Información de Ocean Optics Inc. (2008)

La concentración de referencia se obtuvo mediante una curva de calibración del espectrofotómetro *Lambda 25* (Perkin-Elmer), midiendo la absorbancia de cada colorante en su longitud de onda de máxima absorbancia, que son 484, 512 y 564nm para NA7, RA151 y AA113, respectivamente.

Tabla 3-3 Características espectrofotómetro *Lambda 25* (Perkin-Elmer)

Características	
Longitud de onda	Fijado entre 200-800nm
Ancho de banda	Fijado a 4nm
Celda	2 celdas de cuarzo de 10mm
Fuente de luz	Doble haz de luz de lámparas prealineadas de deuterio y halógenas de tungsteno con encendido automático
Tamaño	650mm x 560mm x 233mm
Peso	26kg
Velocidad de scan	240nm/min
Software	UV Winlab

Fuente: Información de Perkin-Elmer (2004)

Software.-El espectrofotómetro USB400 fue adquirido sin ningún tipo de software, por lo que se desarrolló un programa de medición de absorbancia en el ambiente de LabView versión 7.1 (National Instruments) usando los controladores incluidos en el paquete del espectrofotómetro (Omnidriver) y el manual *SpectraSuite* (2007). El análisis de los datos obtenidos fue realizado en Excel versión 2007 (Microsoft)

3.1.1 Programación y validación del espectrofotómetro USB4000

Se fijaron los parámetros de operación del espectrofotómetro de la siguiente manera:

Longitud de onda: el rango de operación del equipo en el espectro UV/Vis es de 200-800nm, abarcando la región de máxima absorbancia de los colorantes que se encuentra de 400 a 600nm.

Ancho de Banda: 4nm.

Tiempo de integración: 2.5 s es el tiempo en el cual se encontró el mayor rango dinámico para los tres colorantes tomando como blanco el agua destilada.

Promedio de espectros: Se tomó un promedio de 50 espectros, que es donde se encontró menor variación en las medidas de absorbancia.

Celda: la celda elegida es de cuarzo de forma estándar (10mm); es el material apropiado para la región ultravioleta y visible (Skoog *et al.* 2005).

Se realizó la programación del espectrofotómetro USB400 (Ocean Optics) para la toma espectros de absorbancia; para ello se usó LabView versión 7.1 (National Instruments) como lenguaje de

programación y se tomaron como guía los tutoriales ofrecidos en la página web del proveedor del equipo. Los parámetros fijados así como el programa resultante se muestran en la sección 4.1.1

Se validó la medida de absorbancia del espectrofotómetro USB400 con respecto a la medida de la absorbancia de espectrofotómetro *Lambda 25* (Perkin-Elmer), el cual se tomó como referencia. Se evaluaron los aspectos de exactitud, precisión y repetitividad, linealidad, límite de detección y el de cuantificación (mencionados en la sección 2.2). El procedimiento para la evaluación de cada uno de los aspectos mencionados es el siguiente:

Exactitud.- Para la evaluación de la concordancia de la absorbancia medida por el espectrofotómetro USB con respecto a la absorbancia medida por el espectrofotómetro de banco *Lambda 25*, se llevó a cabo la siguiente metodología experimental:

1. Se prepararon soluciones en agua destilada de los colorantes NA7, RA151 y AA113 a concentraciones de 20, 40 y 60mg/L.
2. Se midió la absorbancia de cada muestra tomando las longitudes de onda comprendidas en el intervalo de los 248nm a 799nm (los colorantes presentan su máxima absorbancia en el rango de 400 a 600 nm).

Análisis de resultados.- Se graficó la absorbancia medida por el espectrofotómetro USB400 en el eje de las abscisas y la absorbancia de referencia (medida por el espectrofotómetro *Lambda 25*) en el eje de las ordenadas; se realizó una regresión lineal simple y se evaluó el coeficiente de determinación (r^2). Los resultados de la exactitud obtenida se muestran en la sección 4.1.2

Precisión o repetitividad.- La precisión del método fue evaluado con el concepto de precisión entre-días, obteniendo la variación del espectrofotómetro USB400 al medir la absorbancia de una solución preparada en diferentes días con el mismo método; para ello se realizó lo siguiente:

1. Se prepararon 12 replicas de una mezcla de 75mg/L de concentración total de colorantes (NA7, RA151 y AA113 a 25mg/L cada uno).
2. Se leyó la absorbancia en tres longitudes de onda correspondientes a la máxima absorbancia de cada colorante sin diluir, que son 485nm para NA7, 516nm para RA151 y 549nm para AA113.

Análisis de resultados.-Para evaluar el grado de concordancia entre los valores de absorbancia obtenidos en una prueba y los valores aceptados como verdaderos la precisión fue evaluada por medio del coeficiente de variación:

$$CV\% = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100 \quad 3-1$$

donde:

CV% coeficiente de variación expresado en porcentaje

σ desviación estándar

\bar{x} promedio de las repeticiones

Los resultados del análisis de precisión se muestran en la sección 4.1.2

Linealidad.- La linealidad de la absorbancia medida con respecto a la concentración preparada evaluada de la siguiente forma:

1. Se prepararon concentraciones de 1,5,10,20,40 y 60 mg/L de cada colorante sin mezclar (NA7 RA151 y AA113).
2. Se midió la concentración de cada colorante con la curva de calibración del espectrofotómetro *Lambda 25* y se usó esa concentración como medida de referencia.

Análisis de datos.- Para el análisis de la linealidad se graficó la absorbancia medida en el espectrofotómetro USB400 en el eje de las abscisas y la concentración considerada como de referencia (medida en el espectrofotómetro *Lambda 25*) en el eje de las ordenadas; se realizó una regresión lineal simple para el análisis de la linealidad y se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) para evaluar la bondad del ajuste del modelo de regresión lineal obtenido. Los resultados obtenidos se presentan en la sección 4.1.2

Límite de detección y cuantificación.- Para la evaluación del límite de detección (LD) y del límite de cuantificación (LC) se realizó lo siguiente:

1. Se prepararon por triplicado soluciones de los colorantes NA7 en concentraciones de 0,1,3,7, 5 y 10 mg/L, RA151 en concentraciones de 0,7,1 5 y 10 mg/L y AA113 en concentraciones de 1, 2,6, 5 y 10 mg/L.
2. Para calcular el límite de detección se usó la ecuación 3-2 (Herrera *et al*, 2008).
3. Para calcular el límite de cuantificación se usó la ecuación 3-3 (Herrera *et al.*, 2008).

$$LD = KS/b \quad 3-2$$

donde

LD límite de detección

K factor numérico elegido conforme al nivel de confianza deseado (usualmente 3)

S desviación estándar

b pendiente de la recta

$$LC = KS/b$$

3-3

donde

LC límite de cuantificación

K factor numérico elegido conforme al nivel de confianza deseado (usualmente 5)

S desviación estándar

b pendiente de la recta

Los resultados de esta etapa experimental se presentan en la sección 4.1.2

3.2 Etapa II.- Evaluación de las técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de una mezcla

Los experimentos realizados en esta etapa tuvieron como objetivo la comparación del desempeño de cada técnica de calibración para el cálculo de las concentraciones individuales de colorantes presentes en una muestra. Los primeros experimentos tuvieron como objetivo seleccionar el rango de absorbancias en el cual cada técnica tuviera el mejor desempeño, es decir, los resultados que se ajustaran más a las concentraciones preparadas.

Para valorar qué tanto afectan a cada método quimiométrico las pequeñas perturbaciones presentes en la lectura del espectro de absorbancia, se realizaron 12 experimentos para valorar el coeficiente de variación en cada técnica.

Por último se realizaron 9 experimentos para la comparación del desempeño de los tres métodos quimiométricos.

Reactivos e instrumentación.- Los reactivos son los mismos que en la etapa I. Como instrumentos de medición se usa el espectrofotómetro USB4000 mencionado en la etapa I (ver Tabla 3-2)

Software.-El software usado consta de

- El programa desarrollado en la etapa I para la medición del espectro de absorbancia.
- Matlab versión 7.5, R2007b (The Mathworks) para la aplicación y análisis de las técnicas de calibración multivariable (deconvolución lineal, deconvolución no lineal y mínimos cuadrados parciales).
- Excel versión 2007 (Microsoft) para el análisis de datos.

Preparación de muestras.- Los colorantes con concentración inicial de 1 g/L fueron diluidos en matraces aforados de 50mL con agua destilada hasta alcanzar las concentraciones deseadas. El pH fue

controlado en el rango 2.8-3.0. La concentración de los colorantes fue medida con la curva de calibración del espectrofotómetro USB400 (ver Tabla 3-4), para la creación de la curva de calibración se prepararon soluciones de colorantes sin diluir a diferentes concentraciones, se midió la absorbancia de cada solución en su máxima longitud de onda y se realizó una regresión lineal simple.

Tabla 3-4 Datos de la curva de calibración en una sola longitud de onda

Colorante	Longitud de onda de referencia (nm)	Ecuación de la recta
NA7	485	$y=27.97x$
RA151	516	$y=37.788x$
AA113	549	$y=65.558x$

3.2.1 Aplicación de las técnicas de calibración multivariable

Preparación de la base de datos.- Para la aplicación de las técnicas de deconvolución lineal (DL), deconvolución no lineal (DNL) y mínimos cuadrados parciales (MCP) se realizó una base de datos de calibración inicial conformada por 25 experimentos de acuerdo al modelo de Brereton (1997) para un modelo de 5 niveles y 3 factores. De estos experimentos se eliminaron espectros cuya suma de concentraciones individuales sobrepasaba la concentración de 60 mg/L, debido a que concentraciones mayores sobrepasaban el límite de linealidad, es decir, la ley de Beer-Lambert ya no era aplicable; posteriormente se añadieron experimentos ampliando la base de datos a 55 elementos (ver Anexo 6.2).

Rango de operación de las técnicas de calibración multivariable.- La precisión y confiabilidad de cada método multivariable puede aumentar o disminuir de acuerdo a la selección del rango de longitudes de onda a usar para realizar el cálculo (Al-Degs, 2009; Hemmateenejad *et al.*, 2007). Es por ello que, antes de aplicar cada método primero se buscó el rango de longitudes donde la concentración calculada por cada método fuera la más cercana a la preparada.

1. Se prepararon 26 muestras con concentraciones conocidas de colorantes sin mezclar (ver Anexo 6.3 para las concentraciones de los 26 experimentos).
2. Se midió la absorbancia de cada muestra en todas las longitudes de onda del espectro UV/Vis.
3. Se desarrolló un programa para la aplicación de la técnica de DL usando todas las longitudes de onda, obteniendo el error cuadrático medio de cada colorante con respecto al preparado y el error cuadrático medio de predicción del total de la mezcla; el mismo programa recorta el rango de longitudes de onda para calcular nuevamente el error cuadrático medio de predicción

de cada colorante y así sucesivamente hasta analizar diferentes posibilidades de rangos de longitudes de onda.

4. Se desarrolló un programa para la aplicación de la técnica de DNL usando todas las longitudes de onda. De manera similar al punto anterior, se analizaron diferentes posibilidades de rangos de longitudes de onda.
5. Se desarrolló un programa para la aplicación de la técnica de MCP usando todas las longitudes de onda obteniendo el error cuadrático medio de predicción de cada colorante con respecto al preparado. Esta evaluación se llevó variando tanto el número de variables latentes (se consideraron hasta 15), como el rango de longitudes de onda con un procedimiento similar al explicado anteriormente y el rango seleccionado fue aquel que presentó menor error cuadrático medio en las tres concentraciones preparadas.

En total se revisaron 511 intervalos diferentes de rangos de longitudes de onda para la búsqueda de concentraciones por medio de DL, DNL y MCP, los resultados se resumen en la Tabla 3-5.

Tabla 3-5 Rango de operación para cada técnica

Técnica	Rango (nm)	ECM	No. de VL
DL	221 a 787	5.3	NA
DNL	227 a 782	4.9	NA
MCP	402 a 629	3.4	12

No. de VL.- Número de variables latentes.

Para mostrar el ajuste de los resultados obtenidos usando el rango de operación propuesto (Tabla 3-5), se aplicó cada una de las técnicas para calcular la concentración de los 26 experimentos usando el rango propuesto y se analizó la relación de las concentraciones calculadas con respecto a las concentraciones preparadas por medio de una regresión lineal simple. Para realizar este cálculo se graficaron las concentraciones calculadas por cada método con respecto a las concentraciones preparadas (de referencia), la regresión lineal se realizó en Excel versión 2007 (Microsoft). Los resultados obtenidos de la regresión se muestran en la Tabla 3-6; la pendiente cercana a uno indica que la relación es casi lineal para los tres métodos y el coeficiente de determinación (r^2) en los tres métodos es cercano a uno, lo cual indica una calidad de ajuste bastante alta, es decir, la mayor parte de las concentraciones calculadas son explicadas por el modelo de regresión; el buen ajuste de los datos también se confirma obteniendo el error cuadrático medio de predicción (calculado por medio de la ecuación 3-4) donde los resultados mostrados en la Tabla 3-7 indican errores cuadráticos medios de máximo 3.38 mg/L para DL, 3.58 mg/L para DNL y 1.69 mg/L para MCP.

Tabla 3-6 Análisis de las concentraciones de colorantes sin mezclar calculadas por DL, DNL y MCP para encontrar el rango de operación

Colorante	DL			DNL			MCP		
	m	b	r ²	m	b	r ²	M	b	r ²
NA7	0.97	0.11	1.00	0.98	-0.02	1.00	0.93	-0.02	1.00
RA151	0.96	0.33	0.98	0.94	1.09	0.98	0.99	-0.13	1.00
AA113	0.95	0.27	0.97	0.87	0.53	0.97	0.96	0.39	1.00

Tabla 3-7 Error cuadrático medio de cada técnica para calcular concentraciones de colorantes sin mezclar

Colorante	DL	DNL	MCP
NA7	0.82	0.79	1.69
RA151	1.69	2.23	0.54
AA113	3.38	3.58	1.30

Análisis de datos.- Se hizo uso de la técnica de regresión lineal simple y el coeficiente de determinación para la validación del rango de operación propuesto, además se calculó el error cuadrático medio de predicción (ecuación 3-4) (Dahlén *et al.*, 1999).

$$ECM = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad 3-4$$

donde

ECM error cuadrático medio de predicción

n número de datos

y_i.- concentración de referencia

ŷ_i.- concentración calculada

Los resultados usando el rango de operación encontrado se muestra en la sección 4.2.1

Coefficiente de variación.- Los tres métodos de calibración multivariable hacen uso de un rango de longitudes de onda de absorbancia, por lo que la variación de estas mediciones afecta al cálculo de la concentración obtenida. Como medida de variación se calculó el coeficiente de variación, y para ello se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se prepararon 12 mezclas de concentraciones iguales de colorantes (25mg/L de los colorantes NA7, RA151 y AA113)
2. Se calculó por medio de la técnica de DL, DNL y MCP la concentración de cada una de las mezclas, se promediaron los resultados y se obtuvo la desviación estándar para encontrar el coeficiente de variación usando la ecuación 3-1

Los coeficientes de variación para cada técnica se pueden encontrar en la sección 4.2.1

Aplicación de DL, DNL y MCP al cálculo de concentraciones de colorantes individuales en una mezcla.- Una vez obtenido el rango de longitudes de onda para todos los métodos y el número de factores a usar en MCP, se evaluó el desempeño de los tres métodos para el cálculo de la concentración de cada colorante presente en una mezcla. El procedimiento experimental fue el siguiente:

1. Se prepararon 9 experimentos de mezclas de colorantes (ver la tabla de concentraciones en el Anexo 6.4).
2. Se aplicaron las técnicas de DL, DNL y MCP usando el rango de operación propuesto.

Análisis de resultados.-La aproximación de los valores de las concentraciones calculadas con respecto a las preparadas se valoraron por medio de la pendiente dada por la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal y el error cuadrático medio de predicción de los métodos de DL, DNL y MCP en el cálculo de la concentración de cada colorante. Se realizó una comparación de los tres métodos por medio de un análisis de varianza (ANOVA) tomando como hipótesis nula la igualdad de las medias y un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$). Los resultados obtenidos se muestran en la sección 4.2.1

3.3 Etapa III.- Adaptación del sistema de absorbancia en línea

La programación previamente desarrollada para la medición de la absorbancia de una muestra se adaptó para, de manera automática, medir en forma periódica muestras que pasan por una celda de flujo continuo y luego se recirculan al efluente. Los experimentos que se desarrollaron en esta etapa tuvieron primero como objetivo el evaluar las posibles perturbaciones que podrían causar el cambio de celda y la dilución en metanol. Los últimos experimentos fueron efectuados para evaluar la medición de la absorbancia en línea con respecto a la medición de la absorbancia medida fuera de línea

Reactivos y materiales.- Los materiales a usar son los mismos que en la etapa I y II, añadiendo los siguientes:

- Agua proveniente del sistema municipal a la cual se le ajustó el pH entre 2.8-3.0
- Sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Sigma Aldrich, ACS $\geq 99.0\%$
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 50% de pureza en peso, Reproquifin S.A. de C.V.

Sistema de medición en línea.- Se encuentra conformado por:

- **Bomba.-** Para obtener muestras en línea se usa una bomba Sotax de pistón;
- **Espectrofotómetro.-** Espectrofotómetro USB400, celda de flujo continuo *Lambda 25* (Perkin-Elmer) de cuarzo, de 10 mm (número de parte B063-1087);
- **Computadora portátil.-** Sistema operativo Windows XP, con el programa desarrollado para mediciones en línea en LabView versión 7.1 (National Instruments) enlazado a Matlab versión 7.5, R2007b (The Mathworks).

Software.- El software usado fue el mismo que en la etapa I y II, adaptándose el software desarrollado para la medición de absorbancia a la medición del espectro de absorbancia en línea.

Preparación de muestras.- En esta etapa se hace un seguimiento en línea en un proceso foto-Fenton, para la preparación del colorante a tratar se siguen los mismos pasos usados en la etapa II para la preparación de muestras solo que ahora se sustituye el agua destilada con agua de origen municipal a un pH controlado de 2.8-3.0 antes de la reacción.

Método de análisis de muestras en laboratorio.- El método de laboratorio usado para el seguimiento de un proceso de degradación de colorantes sometidos a un tratamiento foto-Fenton es el siguiente (Prato-García, 2010)

Materiales.- Metanol grado HPLC, J.T. Baker

Viales forrados de papel aluminio

Toma de muestra.- Se prepara el número de viales que se vayan a usar (correspondientes al número de muestras) con 4mL de metanol.

Se toma una muestra blanco (sin colorantes) y un testigo (con colorantes sin reactivos)

Se toma 1mL de muestra directamente del tanque de mezclado del reactor CPC y se diluye en los 4mL de metanol previamente preparados.

Se almacenan en un lugar fresco y protegido de luz solar directa.

Análisis de la muestra. El análisis se lleva a cabo en el espectrofotómetro USB4000, con la celda estándar. La longitud de onda de máxima absorbancia a medir es de 485, 516 y 549nm para NA7, RA151 y AA113 respectivamente. La concentración de colorantes sin diluir es obtenida mediante la curva de calibración del espectrofotómetro USB4000

Medición en línea.- La absorbancia es medida en continuo y guardada en un formato compatible con Excel versión 2007 (Microsoft) y Matlab versión 7.5, R2007b (The Mathworks).

3.3.1 Evaluación de la absorbancia en línea

Para llevar a cabo la evaluación de las tres técnicas (DL, DNL y MCP) en el cálculo de concentraciones de colorantes en una mezcla en línea, antes se realizaron unos pasos previos:

1. Modificar el programa y montar del equipo para mediciones en línea;
2. Revisar las perturbaciones ocasionadas por el cambio de celda estándar a celda de flujo continuo y la influencia del metanol en el espectro de las muestras;
3. Buscar del rango de longitudes de onda para la aplicación de las tres técnicas para la búsqueda de concentraciones de colorantes sometidos a un proceso foto-Fenton.

Una vez revisados los puntos anteriores, se evaluaron las tres técnicas (DL, DNL y MCP) para la estimación de las concentraciones de colorantes en la mezcla durante la reacción.

A continuación se desglosa la metodología de los puntos anteriormente mencionados:

Creación de un nuevo módulo en el programa.- El programa creado anteriormente únicamente mide el espectro de absorbancia de una muestra, fue necesario crear un nuevo módulo que midiera el cambio de absorbancia en periodos controlados por el usuario. Para este nuevo módulo se realizó un enlace con Matlab versión 7.5, R2007b (The Mathworks) para la programación del algoritmo de calibración multivariable en LabView versión 7.1 (National Instruments).

Montar el equipo.- Se acopló el espectrofotómetro portátil USB4000 para mediciones de absorbancia en línea de la siguiente manera

1. Se usó una celda de flujo continuo conectada a una bomba de pistón que toma una muestra del tanque de mezclado del foto-reactor CPC.
2. Se acopló la bomba al tanque de mezclado del foto-reactor CPC
3. Se acopló el espectrofotómetro a una computadora portátil.

El equipo se acopló tal como lo muestra la Figura 3-3 y la Figura 3-4. El sistema extrae una muestra de manera continua del tanque de mezclado del reactor por medio de una bomba peristáltica marca Sotax, operada a un flujo de 17.6 ± 0.2 ml/min. La muestra pasa por una celda de flujo continuo de cuarzo de

10mm donde el espectrofotómetro mide la absorbancia de la muestra en un intervalo de tiempo que es controlado por el usuario. El espectro se despliega en la pantalla de una computadora.

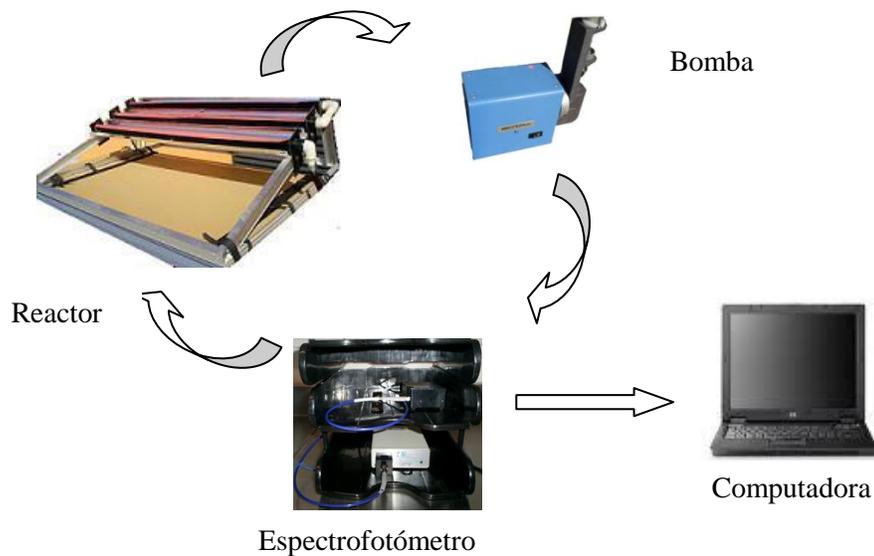


Figura 3-3 Sistema de medición en línea

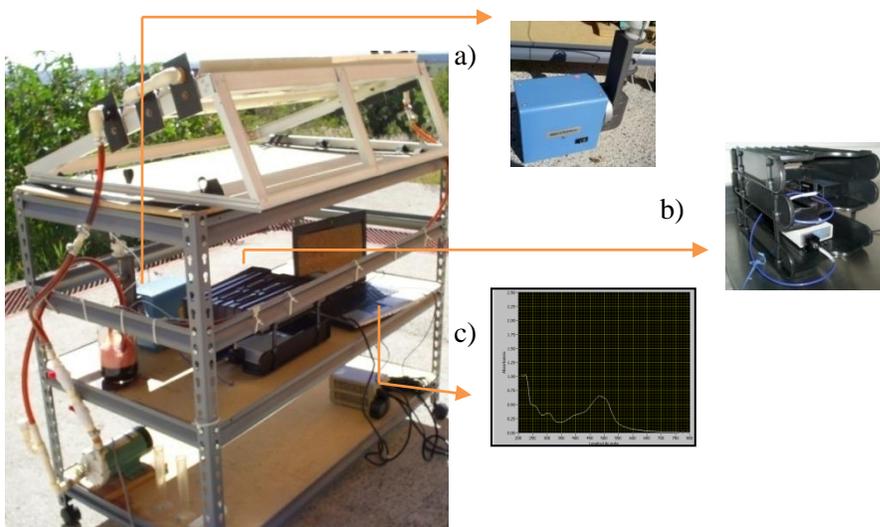


Figura 3-4 Colocación del equipo para medición en línea, a.- Bomba peristáltica, b.- Espectrofotómetro UV/Vis, c.- Computadora

Perturbaciones ocasionadas por el cambio de la celda estándar a una celda de flujo continuo.-

Para la medición en continuo se cambió la celda estándar a una celda de flujo continuo del mismo material y proveedor (Perkin-Elmer). Se realizó una comparación de celdas con el fin de asegurar que

las mediciones realizadas en la celda estándar fueran las mismas que las medidas que en la celda de flujo continuo.

1. Se realizaron 19 experimentos a diferentes concentraciones de cada colorante (ver las concentraciones en el Anexo 6.5)
2. Se midió la absorbancia en todas las longitudes de onda del rango UV/Vis en la celda estándar y en la celda de flujo continuo, estando la muestra estática.

Análisis de datos.- La relación fue evaluada en términos de una regresión lineal simple y el coeficiente de determinación.

Perturbaciones ocasionadas por dilución en metanol. El método de toma de muestras fuera de línea incluye la dilución en metanol; por ello, se evaluó la viabilidad de la aplicación de las técnicas para la búsqueda de concentraciones en muestras con metanol.

1. Se prepararon 9 muestras con concentraciones conocidas diluidas en metanol (ver Anexo 6.6 para concentraciones).
2. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro USB4000 usando la celda estándar, sin flujo.
3. Se aplicaron las técnicas de deconvolución lineal (DL), deconvolución no lineal (DNL) y mínimos cuadrados parciales (MCP) usando el rango de operación encontrado en la sección 4.2.1 de resultados.

Análisis de resultados.- Se usó regresión lineal simple, el coeficiente de determinación, el error cuadrático medio y un análisis ANOVA¹ para ver la correlación de los datos.

Medición de la absorbancia en línea.- Para la evaluación del cambio de absorbancia del colorante medida en línea en un proceso foto-Fenton se tomó como referencia la absorbancia medida por el método de análisis en laboratorio.

1. Se prepararon por triplicado soluciones de los colorantes NA7, RA151 y AA113 a una concentración de 50mg/L individualmente y una mezcla compuesta por 25mg/L de cada colorante (75mg/L de concentración de la mezcla).
2. Se sometieron los colorantes sin mezclar a un proceso foto-Fenton con una duración de una hora y la concentración de reactivos (H_2O_2 y Fe^{2+}) fue inyectada al inicio del proceso con una concentración de acuerdo a la señalada en la Tabla 3-1.
3. Se sometió la mezcla de colorantes a un proceso foto-Fenton con una duración de una hora y la concentración de reactivos (H_2O_2 y Fe^{2+}) fue inyectada al inicio del proceso con una concentración de acuerdo a la señalada en la Tabla 3-1 para 25mg/L de cada colorante.

¹ Hipótesis nula: igualdad de medias, nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$)

4. Se realizó un seguimiento en línea por medio del programa desarrollado en LabView versión 7.1 (National Instruments).
5. Se realizó un seguimiento fuera de línea tomando muestras de acuerdo al método usual de preparación de muestras fuera de línea cada 2, 4, 6, 10, 15, 20, 30 y 60 min

Análisis de resultados.- Para el análisis de datos se realizó un paso previo de adimensionalización de valores de absorbancias medidas en línea y fuera de línea. Se usaron los valores de absorbancia de las muestras tomadas para análisis en laboratorio como referencia. El análisis de datos se llevó a cabo con la longitud de onda donde el espectro presentara el mayor valor de absorbancia, para el NA7 se usó la absorbancia medida en la longitud de onda de 485nm, para el RA151 en 516nm, para AA113 en 549nm y por último para la mezcla en 491nm.

Para el análisis de los dos métodos, se graficó el absorbancia medida fuera de línea con respecto a la absorbancia medida en línea, se realizó una regresión lineal simple y se obtuvo el coeficiente de determinación. Los resultados de esta etapa se presentan en la sección 4.3.3

3.4 Etapa IV.- Evaluación de las técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes, absorbancia en línea en un proceso foto-Fenton

En esta etapa se usó un método de medición de concentraciones individuales por medio de HPLC, el cual proporciona los resultados empleados como referencia para la evaluación de las tres técnicas de calibración multivariable. Se realizaron experimentos para la validación del método de HPLC. Fue necesaria otra serie de experimentos para la búsqueda del rango de operación de cada método y el último conjunto de experimentos se destinó a la evaluación del desempeño de las tres técnicas de calibración

Reactivos, materiales e instrumentación.- Los materiales a usar son los mismos que en la etapa III, añadiendo los siguientes para en análisis de la muestra en HPLC:

- Filtro de membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m
- Filtro de membrana de PTFE de 0.45 μ m

Método de análisis de muestras en laboratorio.- El material, el método y el análisis de la toma de muestras fue la misma que en la etapa III. Para el caso de la mezcla, el análisis se llevó a cabo en el sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cuyo procedimiento se explica más adelante.

Medición en línea.-

Toma de muestra.- La absorbancia es medida en continuo y guardada en un formato compatible con Excel versión 2007 (Microsoft) y Matlab versión 7.5, R2007b (The Mathworks).

Análisis de la muestra.- El análisis se realizó con Matlab versión 7.5, R2007b (The Mathworks)

Instrumentación.- Se empleó un foto-reactor CPC (colector parabólico compuesto) para el proceso de foto-tratamiento. El seguimiento de la concentración de colorantes en línea se llevó a cabo por el sistema de medición en continuo del espectrofotómetro USB400. Las características de estos sistemas ya fueron explicados en la etapa anterior.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).- Se usó el cromatógrafo HP modelo Agilent 1100 como técnica de referencia para la medición de la concentración de colorantes individuales en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton. Las características del equipo se muestran en la Tabla 3-8

Tabla 3-8 Características del HPLC-DAD usado para la validación del cálculo de concentraciones de cada colorante en una mezcla

Características del HPLC	
Modelo	HP 110HPLC-DAD (Agilent 1100)
Descripción	Bomba cuaternaria, detector de arreglo de diodos, automuestreador, desgasificador de vacío
Columna	Grace prevail Organic Acid, 5 μ , 250mm, 4.6mm
Pre-Columna	Grace prevail Organic Acid , 5 μ , 7.5mm, 4.6mm
Software	ChemStation

Validación del método.- Las concentraciones de colorantes individuales usadas para la creación de la curva de calibración del HPLC fueron de 2, 4, 8, 12 y 16 mg/L, la concentración fue verificada antes de la preparación de la muestra por medio de espectrofotometría midiendo a la longitud de onda de máxima absorbancia de cada colorante. Los resultados de la validación del método se pueden ver en el Anexo 6.1

Procedimiento de análisis de una muestra en HPLC.-El siguiente método fue desarrollado como método de referencia para la separación y cuantificación de colorantes de manera individual presentes en una mezcla

Preparación de la muestra.-

Disolver 2 ml de colorante en 8ml de metanol

Filtrar en filtros de nitrocelulosa, tamaño de poro 0.45 μ m

Preparación de la fase móvil.-

Filtrado del metanol HPLC en filtros de PTFE, tamaño de poro 0.45 μ m

Filtrado del agua grado HPLC en filtros de nitrocelulosa, tamaño de poro 0.45 μ m

Condiciones cromatográficas

Volumen de inyección.- 2 μ L con lavado

Fase móvil

Fase móvil A.- Agua grado HPLC

Fase móvil B.- Metanol grado HPLC

Gradiente de elución (ver Tabla 3-9)

Tabla 3-9 Gradiente de elución HPLC

Tiempo (min)	Agua (%)	Metanol (%)	flujo (ml/min)
0	90	10	1
11	10	90	1
14	10	90	1
14.9	90	10	1

Tiempo de restablecimiento (post time).- 10min

Flujo post time.- 2ml/min

Longitud de onda y tiempo de retención de colorantes (ver Tabla 3-10).-

Tabla 3-10 Longitud de onda y tiempo de retención de los colorantes. Método HPLC

Colorante	Longitud de onda (nm)	Tiempo de retención (min)
NA7	484	8.58 \pm 0.08
RA151	513	8.86 \pm 0.02
AA113	570	9.48 \pm 0.05

Software.- Se empleó el mismo software que en la etapa II, aumentando el uso de *Agilent ChemStation* para el uso del HPLC.

Evaluación de los métodos para encontrar la concentración en un proceso foto-Fenton en línea.-

Debido a que el proceso foto-Fenton genera productos secundarios tales como aminas aromáticas, el espectro sufre notables modificaciones, por lo que es necesario realizar una nueva búsqueda de un rango de operación de cada técnica. Para encontrar el rango de operación se llevaron a cabo 10 experimentos de colorantes individuales sometidos a un proceso de degradación foto-Fenton tomando 10 muestras del modo usual a 9 intervalos de tiempo, se midió la absorbancia de cada muestra y se obtuvo la concentración por medio de la técnica de calibración univariable (lectura en una sola longitud de onda). Esta medición se tomó como concentración de referencia, se comparó la concentración encontrada por cada técnica (DL, DNL y MCP) y se obtuvo el error cuadrático promedio de predicción (ECM) como parámetro para la elección del rango de operación. Los rangos encontrados para cada técnica se muestran en la Tabla 3-11

Tabla 3-11 Rango de operación para cada técnica, foto-Fenton

Técnica	Rango (nm)	ECM	No. de VL
DL	352 a 647	3.4	NA
DNL	355 a 671	3.63	NA
MCP	428 a 558	3.09	8

No. de VL.- Número de variables latentes.

En la Tabla 3-12 se muestra el buen ajuste de la aplicación de estas tres técnicas (DL, DNL y MCP) a la búsqueda de concentraciones de colorantes sometidos a un proceso foto-Fenton en el rango seleccionado, los errores cuadráticos medios encontrados en la Tabla 3-13 son bajos, no mayores a 1.65 mg/L

Tabla 3-12 Análisis de las concentraciones de colorantes sin mezclar sometidos a un proceso de foto-Fenton, calculadas por DL, DNL y MCP para encontrar el rango de operación

Colorante	DL			DNL			MCP		
	m	b	r2	m	b	r2	m	b	r2
NA7	1.26	-0.34	1.00	1.20	-0.68	0.99	1.17	-0.12	1.00
RA151	1.03	0.09	0.99	1.03	-0.09	0.99	1.04	-0.75	1.00
AA113	0.85	1.15	0.96	0.81	1.84	0.96	1.17	-0.64	0.99

Tabla 3-13 Error cuadrático medio de cada técnica para calcular concentraciones de colorantes sin mezclar sometidos a un proceso de foto-Fenton

Colorante	DL	DNL	MCP
NA7	1.10	0.75	0.79
RA151	0.56	0.49	0.68
AA113	1.24	1.65	0.89

Una vez encontrados los rangos de operación para encontrar las concentraciones de cada colorante sin mezclar sometido a un proceso foto-Fenton en muestras tomadas con el método usual (dilución en metanol para detener la reacción), se procede a aplicar el rango encontrado a la búsqueda de la concentración de colorantes individuales sometidos a un proceso foto-Fenton midiendo la absorbancia en línea

Para la evaluación del desempeño de las técnicas de deconvolución lineal, deconvolución no lineal y mínimos cuadrados parciales en el cálculo de concentraciones de los colorantes individuales sometidos a un proceso foto-Fenton, midiendo la absorbancia en línea, se llevó a cabo lo siguiente:

- 1) Se realizaron tres experimentos de una mezcla de 100 mg/L del colorante NA7, RA151 y AA113;
- 2) La primera muestra se sometió al proceso foto-Fenton, inyectando el 100% del reactivo usado en muestras anteriores (Tabla 3-1); la segunda muestra usó el 80% del reactivo y la tercera el 60% del reactivo a fin de tener condiciones diferentes de concentraciones;
- 3) Se tomaron muestras a los tiempos 0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 30 y 60 min, tal como lo indica el método usual;
- 4) Se prepararon las muestras como se indica la preparación para el análisis de HPLC;
- 5) Se realizó el análisis de concentración en el HPLC. Se midió el espectro de absorbancia de la misma muestra a analizar en el HPLC y se usaron los datos para aplicar las tres técnicas de análisis de concentración.

Análisis de resultados.- Para analizar los datos de esta etapa se evaluó la correlación de las concentraciones calculadas por los métodos de deconvolución lineal, deconvolución no lineal y mínimos cuadrados parciales con respecto a las concentraciones encontradas por medio del método de HPLC, para ello se llevó a cabo una regresión lineal simple y se obtuvo el coeficiente de determinación

para cada colorante, se evaluó el error cuadrático medio de predicción (ECM) y se realizó un análisis ANOVA². Los resultados obtenidos se muestran en la sección 4.4
Con base en los resultados se propone una automatización de la inyección de reactivos (sección 4.5).

² Hipótesis nula: igualdad de medias, nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$)

4 Capítulo IV.- Resultados

Al igual que en la metodología, los resultados se dividen en cuatro etapas, la primera etapa comprende la preparación y calibración del espectrofotómetro para la medición de la absorbancia, la segunda etapa abarca los resultados de la evaluación de las técnicas multivariable para el cálculo de la concentración en una mezcla sin que exista un flujo en la muestra y sin ningún proceso foto-Fenton, y por último las etapas tercera y cuarta muestran los resultados de la adaptación del equipo para la medición en línea en un proceso foto-Fenton y la aplicación de las tres técnicas multivariables para el cálculo de las concentraciones basándose en las mediciones del sistema en línea.

4.1 Etapa I.- Programación y calibración del espectrofotómetro

4.1.1 Programación del espectrofotómetro

Se realizó la programación para medir el espectro de absorbancia de una muestra teniendo como guía el manual del software *SpectraSuite* (2007), usado un rango de 200 a 800nm. El ruido de la señal fue ligeramente suavizado con dos filtros pasobajas de ventana móvil, herramienta incluida de LabView versión 7.1 (National Instruments); con ello se aumentó el nivel de confianza del equipo; se colocó un contador de espectros tomados y se colocaron tres pantallas auxiliares para registrar longitudes de onda puntuales. La pantalla del programa resultante se muestra en la Figura 4-1. En el reporte se presenta la información de la siguiente manera: la primera columna muestra el número de muestra analizada y las siguientes muestran las absorbancias para cada longitud de onda (Tabla 4-1).

Tabla 4-1 Informe de datos de absorbancia medidos en el espectrofotómetro USB4000

No.de muestra	λ_1	λ_2	...	λ_m
1	Abs λ_1 en m_1	Abs λ_2 en m_1	Abs λ_3 en m_1	Abs λ_4 en m_1
2	Abs λ_1 en m_2	Abs λ_2 en m_2	Abs λ_3 en m_2	Abs λ_4 en m_2
.
.
.
<i>n</i>	Abs λ_1 en m_n	Abs λ_2 en m_n	Abs λ_3 en m_n	Abs λ_m en m_n

El programa realizado obtiene el espectro de absorbancia de una sustancia en el rango de 200-800nm de longitud de onda, en aproximadamente 3 segundos obteniendo un ahorro del 99% en tiempo con

respecto al espectrofotómetro de banco *lambda 25* (5 min). El reporte de absorbancia es guardado con el nombre que el usuario decida en un formato de texto separado por tabulaciones (*ascii*), compatible con Excel (Microsoft), Matlab (The Mathworks), LabView (National Instruments).

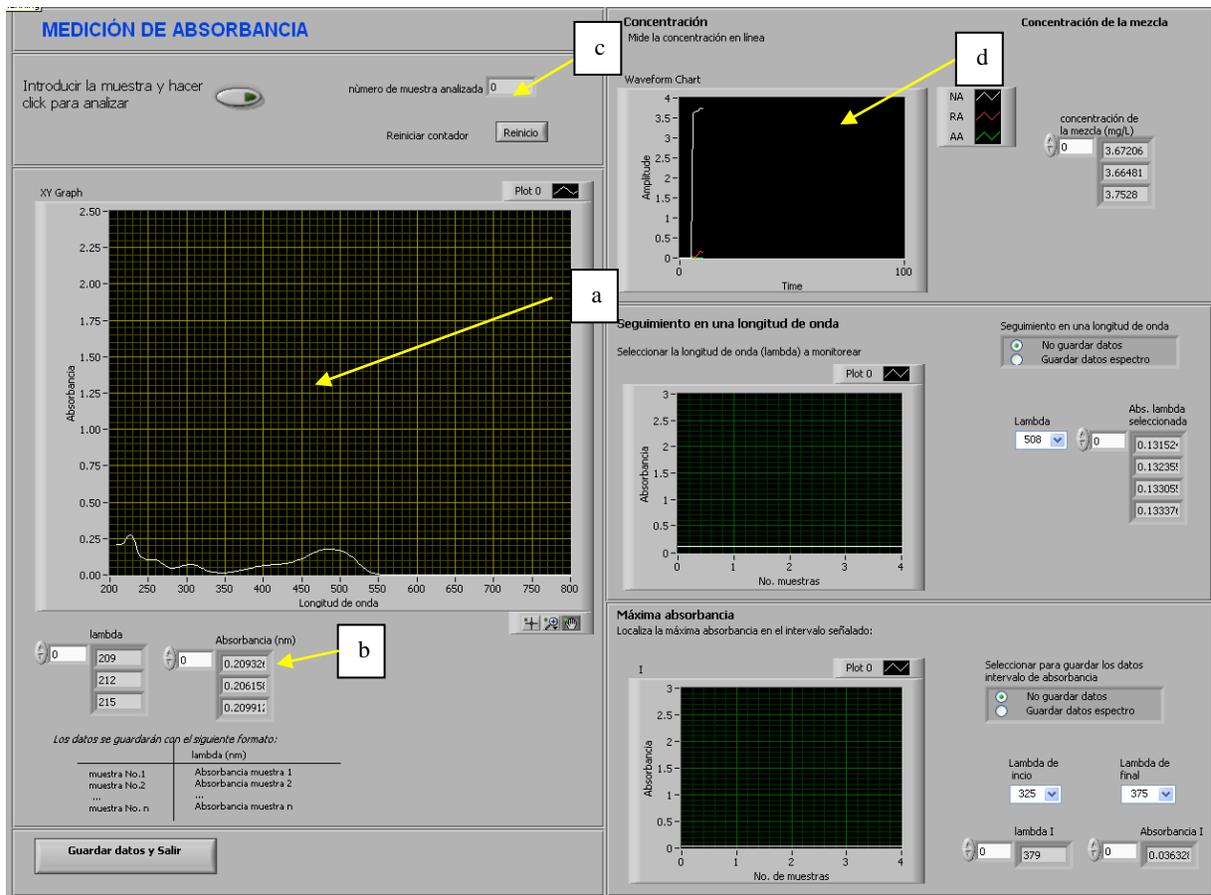


Figura 4-1 Pantalla de medición del espectro de absorbancia, a.-Pantalla del espectro de absorción, b.- Tabla de valores de absorción, c.- Número de muestras analizadas, d.- Pantallas para datos auxiliares

4.1.2 Validación del espectro de absorbancia

Exactitud.- Los resultados de la regresión lineal realizada a tres concentraciones de cada colorante muestran que entre las absorbancias medidas por los espectrofotómetros USB400 y las absorbancias medidas por el espectrofotómetro *Lambda 25* (Perkin-Elmer) existe muy buena correlación (ver Tabla 4-2). La pendiente es casi unitaria y la ordenada al origen es casi cero lo que da como resultado un r^2 de casi uno en todos los casos

Tabla 4-2 Regresión lineal de las absorbancias medidas por el espectrofotómetro *Lambda 25* (Perkin-Elmer) y las absorbancias medidas por el espectrofotómetro USB4000

Colorante	Concentración (mg/L)	m	b	r²
NA7	20	1.02	0.00	1.00
NA7	40	0.97	0.01	1.00
NA7	60	0.83	0.02	0.99
RA151	20	1.00	-0.01	1.00
RA151	40	1.00	-0.01	1.00
RA151	60	1.00	-0.01	1.00
AA113	20	1.05	-0.01	1.00
AA113	40	1.03	0.00	1.00
AA113	60	1.03	-0.01	1.00

Precisión y repetitividad.- Se midieron 12 repeticiones de una mezcla de tres soluciones de colorantes a 25mg/L de concentración de cada colorante. Se obtuvieron los siguientes coeficientes de variación en las tres longitudes de onda de interés (Tabla 4-3), calculados de acuerdo a la ecuación 2-16

Tabla 4-3 Coeficiente de variación de absorbancias en el punto de máxima absorbancia de cada colorante

Muestra	NA7	RA151	AA113
	485nm	516nm	549nm
1	1.64	1.54	0.75
2	1.54	1.44	0.70
3	1.54	1.45	0.71
4	1.64	1.56	0.78
5	1.47	1.44	0.82
6	1.43	1.37	0.69
7	1.53	1.45	0.73
8	1.57	1.48	0.72
9	1.49	1.40	0.71
10	1.47	1.40	0.73
11	1.37	1.28	0.63
12	1.54	1.46	0.73
CV (%)	5.2	5.1	6.4

CV.- Coeficiente de variación

Linealidad.-Para la evaluación de la linealidad se midió la absorbancia por triplicado de cada colorante a 6 concentraciones distintas. (Tabla 4-4). La linealidad se evaluó en la longitud de onda de de máxima absorbancia del espectro de cada colorante, los cuales fueron de 485, 516 y 549nm para los colorantes NA7, RA151 y AA113 respectivamente, la desviación estándar encontrada no superó un máximo de ± 0.02 unidades de absorbancia. Los resultados se muestran en la Figura 4-2 y en la Tabla 4-5

Tabla 4-4 Absorbancia a diferentes concentraciones de cada colorante

Concentración (mg/l)	Absorbancia NA7	Absorbancia RA151	Absorbancia AA113
1	0.05	0.03	0.02
5	0.24	0.11	0.10
10	0.48	0.28	0.20
20	0.94	0.56	0.36
40	1.75	1.11	0.76
60	2.24	1.60	1.09

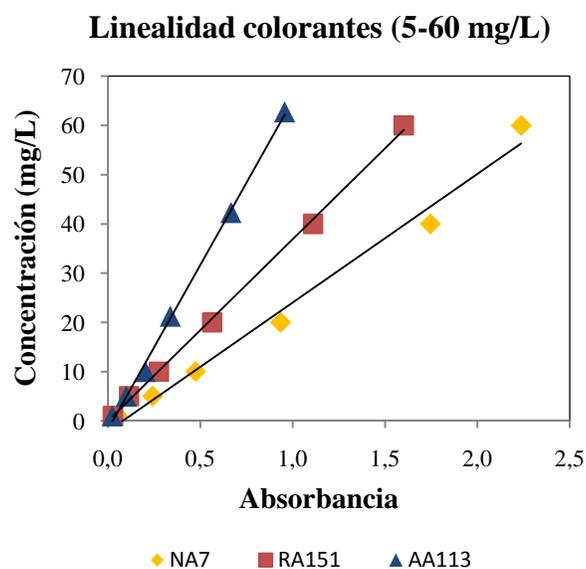


Figura 4-2 Relación lineal entre la absorbancia y la concentración de los colorantes

Tabla 4-5 Linealidad de la absorbancia de los tres colorantes medida con el espectrofotómetro USB4000

Colorante	m	b	r²
NA7	26.14	-2.099	0.987
RA151	36.98	-0.090	0.999
AA113	54.72	-0.523	0.999

m.- pendiente, b.- ordenada al origen.

Límite de detección y cuantificación.-Se encontraron los límites de detección y cuantificación de la de la absorbancia medida por el espectrofotómetro USB400, la desviación estándar de los experimentos no fue mayor de ± 0.006 unidades de absorbancia. Los límites encontrados se resumen en la Tabla 4-6.

Tabla 4-6 Limite de detección y cuantificación del espectrofotómetro USB4000

Colorante	LD (mg/L)	LC (mg/L)
NA7	1.39	2.32
RA151	1.38	2.30
AA113	1.18	1.96

LD.- límite de detección, LC.- Límite de cuantificación.

En la etapa I se logró la programación necesaria para la medición de la absorbancia de una muestra, y se validaron las mediciones de absorbancia medidas por el espectrofotómetro portátil USB4000 con respecto al método de referencia (espectrofotómetro de banco *Lambda 25*, Perkin-Elmer). Se calibró el espectrofotómetro USB400 con respecto al espectrofotómetro Perkin Elmer, obteniendo, por medio de un análisis de regresión lineal, pendientes de casi uno, ordenadas al origen de casi cero y coeficientes de determinación mayores a 0.9 en mediciones de colorantes con concentraciones de 20 a 60 mg/L (ver Tabla 4-2). El equipo, a pesar de ser un equipo portátil y que su finalidad no es efectuar análisis rigurosos, mostró coeficientes de variación bajos, no mayores a un 6.4% (ver Tabla 4-3), lo cual muestra un muy buen grado de precisión del equipo, además de que es capaz de calcular con un buen grado de exactitud y confianza concentraciones de hasta 2.3 mg/L, tal como lo señaló el análisis de límite de cuantificación encontrado (ver Tabla 4-6). El análisis de linealidad de los colorantes calculó que la máxima concentración que deben de tener los colorantes para que su comportamiento se encuentre dentro de la ley de Beer-Lambert es de 60 mg/L (ver Tabla 4-4)

4.2 Etapa II.- Evaluación de las técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes en una mezcla

En la aplicación de las técnicas de deconvolución lineal (DL), deconvolución no lineal (DNL) y mínimos cuadrados parciales (MCP) se usó la misma base de datos de calibración; únicamente se varió el rango de datos de absorbancias con el fin de aumentar el grado de confiabilidad y precisión del análisis (Al-Degs, 2009), los valores de los rangos de operación de cada método se pueden revisar en la sección de metodología en la tabla Tabla 3-5.

4.2.1 Aplicación de DL, DNL y MCP al cálculo de concentraciones de colorantes individuales en una mezcla

Aún cuando un solo laboratorista prepara la misma solución de colorantes con el mismo método, existen variaciones en el espectro de absorbancia, como se vio en la sección 4.1.2, donde la Tabla 4-3 muestra las variaciones en una sola longitud de onda. En la aplicación de los métodos de DL, DNL y MCP se hace uso de las absorbancias medidas en un rango de longitudes de onda, por lo que la variación de estas absorbancias afecta el resultado. Se usó el coeficiente de variación de 12 muestras de igual concentración de colorantes (calculado de acuerdo a la ecuación 3-1). Con el coeficiente de variación obtenido se sabe que la concentración real se encuentra dentro de esos límites de variación. Los resultados se muestran en la Tabla 4-7.

Tabla 4-7 CV de cada técnica (%)

	Coefficiente de Variación (%)		
	DL	DNL	MCP
NA7	8.7	9.1	9.7
RA151	10.0	12.6	7.3
AA113	12.2	12.3	7.9

A continuación se procedió a encontrar las concentraciones de cada colorante presente en una mezcla de colorantes. Vale la pena recordar que, para mezclas, la cuantificación individual de las concentraciones usando una sola longitud de onda no es deseable porque los espectros individuales se traslapan y sus picos no están bien diferenciados. A continuación se presentan los resultados de aplicación de las tres técnicas estudiadas para estimar dichas concentraciones.

Se calcularon las concentraciones individuales de 9 mezclas de colorantes con DL, DNL y MCP (en el Anexo 6.4 se encuentran la tabla con las concentraciones de cada colorante), en el rango propuesto

para cada técnica. La aproximación entre los valores calculados y los preparados se observan en la Figura 4-3, donde la línea diagonal representa el valor de referencia al cual se prepararon los experimentos, los rombos, cuadros y círculos representan los valores obtenidos al aplicar las técnicas quimiométricas para el cálculo de las concentraciones. Por lo tanto, entre más se acerquen a la línea de referencia, mayor será la aproximación de cada técnica. El resumen de los resultados al usar una regresión lineal para el análisis de datos se encuentra en la Tabla 4-8.

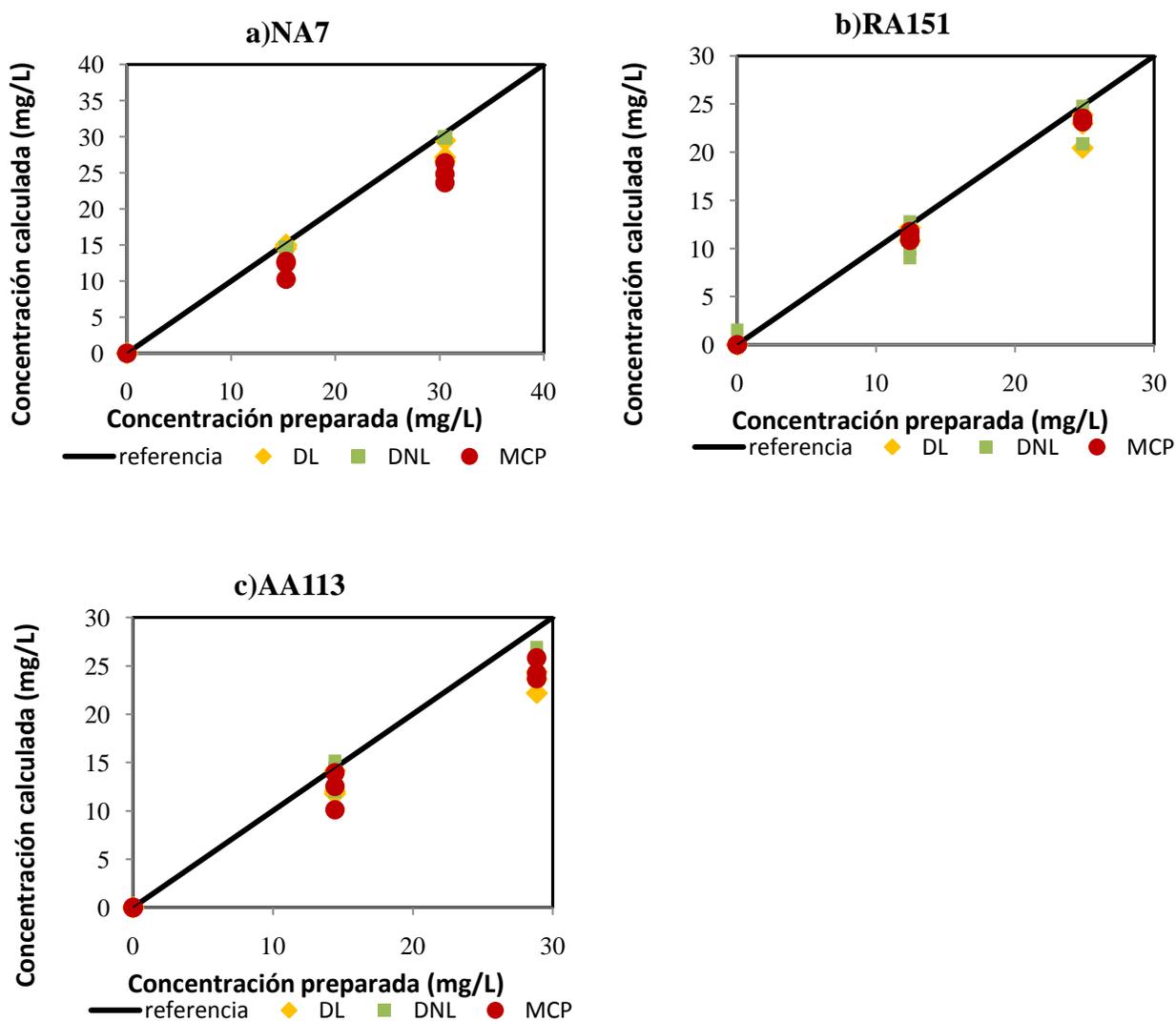


Figura 4-3 Concentraciones de colorantes individuales en mezclas calculadas por DL, DNL y MCP.

Tabla 4-8 Análisis de las concentraciones calculadas por DL, DNL y MCP

Colorante	DL			DNL			MCP		
	m	b	r ²	m	b	r ²	m	b	r ²
NA7	0.91	0.32	0.99	0.87	0.07	0.98	0.82	-0.21	0.99
RA151	0.90	0.02	0.99	0.91	0.12	0.97	0.94	-0.15	1.00
AA113	0.81	0.32	0.99	0.91	0.26	0.99	0.85	-0.03	0.99

Tabla 4-9 Error cuadrático medio de cada técnica para calcular concentraciones de colorantes en una mezcla

Colorante	DL	DNL	MCP
NA7	1.79	2.81	3.89
RA151	1.81	2.08	1.15
AA113	3.39	1.80	2.98

Tabla 4-10 ANOVA de cada técnica para calcular concentraciones de cada colorantes en una mezcla

Colorante	F	Probabilidad	Valor crítico
NA7	0.1	0.96	2.9
RA151	0.03	0.99	2.9
AA113	0.09	0.97	2.9

El hecho de que los resultados del análisis de regresión lineal (Tabla 4-8) calculen valores de r² mayores a 0.9 en las tres técnicas y que los valores de las pendientes sean casi uno indica que las concentraciones calculadas son cercanas a las concentraciones preparadas. Esto se puede corroborar de manera gráfica en la Figura 4-3 donde las marcas de las tres técnicas se encuentran casi sobre la línea de referencia.

La Tabla 4-9 muestra que las técnicas que tienen el menor error cuadrático medio en el cálculo de las concentraciones individuales de los colorantes son las de DL y DNL; sin embargo, el coeficiente de variación indica que estas dos son las técnicas cuyos resultados son más sensibles a pequeñas variaciones en la medida del espectro de absorbancia; en este análisis la técnica de MCP mostró ser una técnica que mejor compensa este tipo de perturbaciones.

Las concentraciones de cada colorante, calculadas por las técnicas de DL, DNL y MCP no presentan diferencias significativas entre ellas ni con respecto a las concentraciones preparadas. Esto se puede comprobar en la Tabla 4-10, donde el análisis ANOVA³ indica que se puede hacer uso de cualquiera de los tres métodos para la predicción de concentraciones en una mezcla, ya que las concentraciones calculadas no serán significativamente diferentes entre ellas.

4.3 Etapa III.- Sistema para medición de absorbancia en línea.

Para medir la absorbancia en línea, se modificó el programa y se acopló el equipo de medición al foto-reactor. Debido al cambio de celda (de estándar a flujo continuo), al análisis usando muestras tomadas de modo usual como referencia (dilución en metanol) y a la presencia de perturbaciones en el espectro de absorbancia en una reacción foto-Fenton (presencia de subproductos de degradación), se revisaron nuevamente las técnicas de calibración multivariable para la búsqueda de concentraciones tomando en cuenta las nuevas condiciones de operación.

4.3.1 Creación de un nuevo módulo en el programa y montaje del equipo

Se creó un módulo para la medición de la absorbancia en línea, con el cual el usuario puede fijar el tiempo entre toma de espectros (ver Figura 4-4).

El informe de almacenamiento de absorbancias se presenta de la Tabla 4-11

Tabla 4-11 Informe de absorbancia medida en línea en el espectrofotómetro USB4000

No.de muestra	Tiempo	λ_1	λ_2	...	λ_m
1	t_1	<i>Abs λ_1 en t_1</i>	<i>Abs λ_2 en t_1</i>	<i>Abs λ_3 en t_1</i>	<i>Abs λ_4 en t_1</i>
2	t_2	<i>Abs λ_1 en t_2</i>	<i>Abs λ_2 en t_2</i>	<i>Abs λ_3 en t_2</i>	<i>Abs λ_4 en t_2</i>
.
.
.
<i>n</i>	t_n	<i>Abs λ_1 en t_n</i>	<i>Abs λ_2 en t_n</i>	<i>Abs λ_3 en t_n</i>	<i>Abs λ_m en t_n</i>

³ Hipótesis nula: igualdad de medias, nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$)

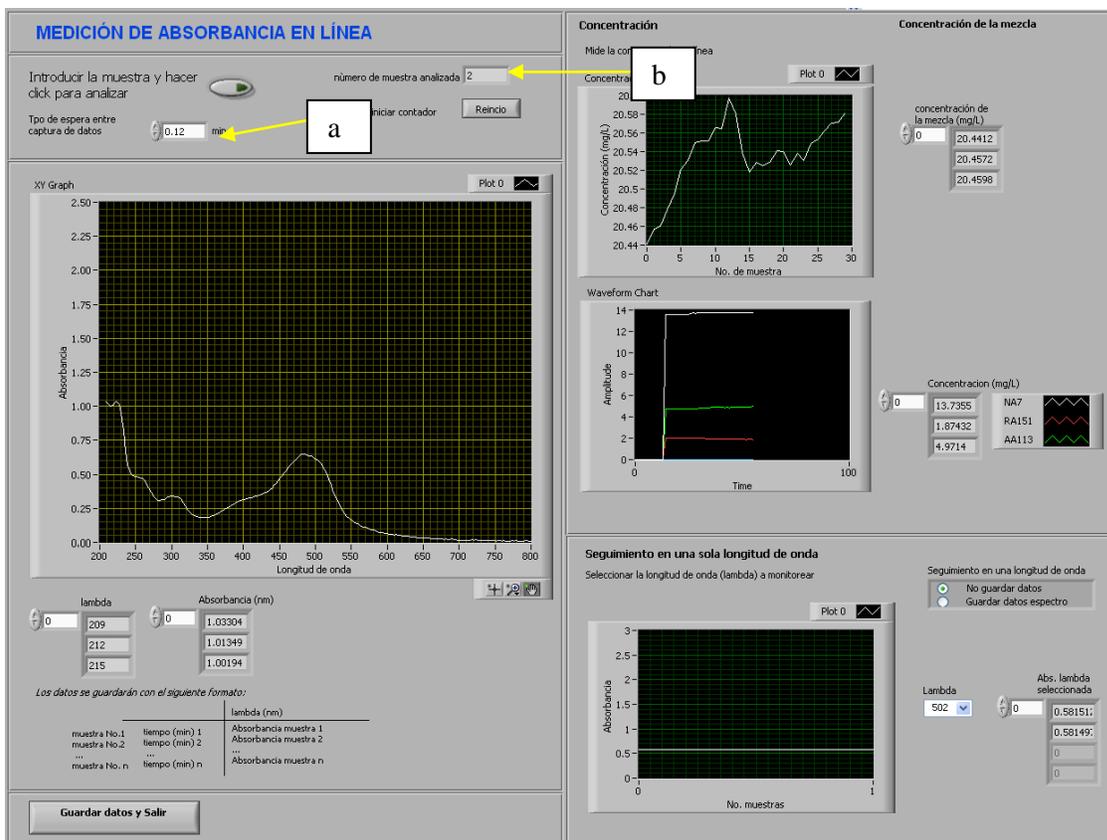


Figura 4-4 Pantalla de medición del espectro de absorbancia en línea, a.-Tiempo entre toma de espectros, b.- Botón para reinicio de contador de muestras

De esta manera es posible manipular los datos para obtener diferente información, de acuerdo a las necesidades del usuario, ya sea para modelar, simular el proceso o evaluar el desempeño del mismo.

4.3.2 Revisión de perturbaciones

Perturbaciones por cambio de celda.- La celda usada para mediciones en línea es de flujo continuo. Se verificó que el cambio de celda no afectara las mediciones y para verificarlo se tomó como parámetro la exactitud de las medidas de absorbancia tomando como referencia la medida con la celda estándar (las concentraciones de los experimentos se encuentran en el Anexo 6.5). Se graficaron los valores de la celda estándar con respecto a los valores de la absorbancia medida con la celda de flujo continuo. Se evaluó la relación por medio de una regresión lineal simple. En todos los casos analizados el cambio de celda estándar a flujo continuo no afecta las mediciones de absorbancia, un análisis de regresión lineal muestra pendientes mayores a 0.99, ordenadas al origen de cero y coeficientes de determinación mayores a 0.99.

Perturbaciones por muestras diluidas en metanol.- Hasta el momento, las tres técnicas de calibración multivariable se habían aplicado a mezclas de colorantes diluidas con agua destilada; sin

embargo, la toma de muestras fuera de línea implica una dilución en metanol. Se aplicaron las tres técnicas (DL, DNL y MCP) para calcular las concentraciones de los colorantes de 9 mezclas con dilución en metanol (ver el Anexo 6.6 para las concentraciones y la tabla de resultados) para observar si las tres técnicas seguían teniendo un buen desempeño. Los resultados de la aproximación entre los valores calculados con respecto a los preparados se analizaron por medio de una regresión lineal simple, el resumen de los resultados se presenta en la Tabla 4-12

Tabla 4-12 Análisis de las concentraciones calculadas por DL, DNL y MCP, muestras con presencia de metanol

Colorante	DL			DNL			MCP		
	m	b	r ²	m	b	r ²	m	b	r ²
NA7	0.87	-0.16	0.97	0.84	-0.47	0.95	0.81	-0.17	0.99
RA151	0.82	-0.54	0.93	0.83	-1.41	0.83	0.95	-0.03	1.00
AA113	1.01	-0.05	1.00	1.09	0.03	0.99	0.83	0.25	0.99

Los errores cuadráticos medios se resumen en la Tabla 4-13. El análisis ANOVA⁴ aplicado a los resultados de las concentraciones encontradas se hallan en la Tabla 4-14

Tabla 4-13 Error cuadrático medio de cada técnica para calcular concentraciones de colorantes en una mezcla

Colorante	DL	DNL	MCP
NA7	3.17	4.30	4.05
RA151	3.96	5.41	0.92
AA113	0.65	2.96	4.25

Tabla 4-14 ANOVA de cada método para calcular concentraciones de cada colorante en una mezcla diluida en metanol

Colorante	F	Probabilidad	Valor crítico
NA7	0.13	0.94	2.9
RA151	0.26	0.85	2.9
AA113	0.14	0.94	2.9

⁴ Hipótesis nula: igualdad de medias, alfa de 0.05 ($\alpha=0.05$)

Verificados los aspectos anteriores, se procede a validar el espectro de absorbancia medido en línea tomando como referencia la medición de absorbancia medida por el método de análisis en laboratorio.

4.3.3 Medición de la absorbancia en línea

Se midió la absorbancia medida en línea y fuera de línea de una mezcla de 75mg/L (25mg/L de NA7, 25mg/L de RA151, y 25mg/L de AA113), la absorbancia fue medida en la máxima longitud de onda de la mezcla, es decir, a 491nm, los resultados se muestran en las gráficas de la Figura 4-5. En la gráfica del lado izquierdo se muestra el cambio de absorbancia con respecto al tiempo y del lado derecho se observa una gráfica con donde se comparan las mediciones de absorbancia realizadas en laboratorio con respecto a las medidas en línea. En este tipo de gráfica los puntos corresponden a las mediciones en línea y la diagonal corresponde a la medición de referencia (fuera de línea); entre más cercanos se encuentren los puntos a la diagonal mayor será la exactitud del método.

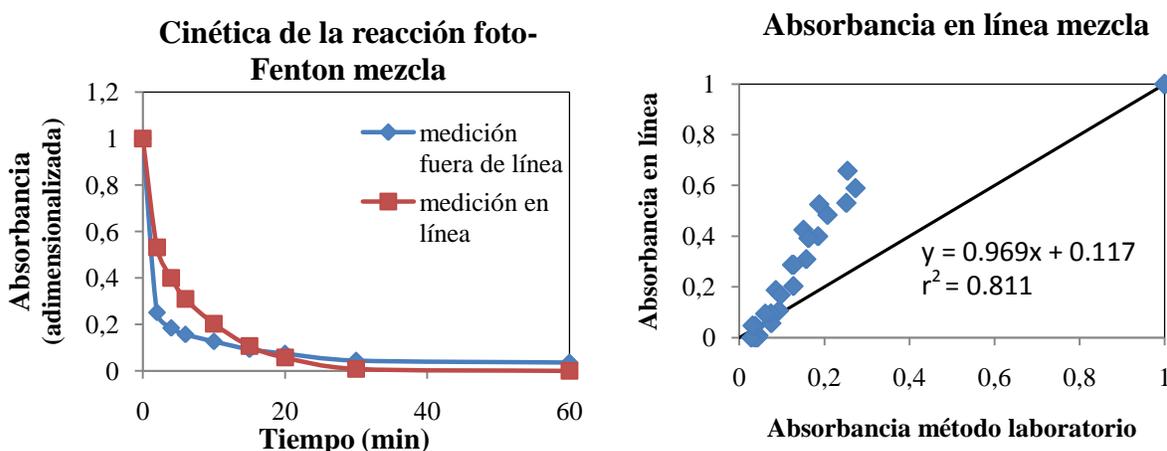


Figura 4-5 Comparación de absorbancias medidas en línea y fuera de línea de una mezcla

El mismo procedimiento se realizó para la comparación de la medición de absorbancia medida en línea y fuera de línea de los colorantes NA7, RA151 y AA113, midiendo la absorbancia en la máxima longitud de onda del espectro de cada colorante, es decir, en 485nm para el NA7, 516nm para el RA151 y 549nm para el AA113. Los resultados se muestran en las gráficas de la Figura 4-6

Con el fin de observar la influencia del cambio de pH en la medición de la absorbancia de cada colorante se prepararon muestras de los mismos a tres condiciones diferentes de pH, las gráficas obtenidas resultado de estos cambios de pH se encuentran en la Figura 4-10.

De los resultados anteriores se puede concluir que sí fue posible la adaptación del equipo para mediciones en línea gracias a la programación del nuevo módulo para la medición periódica del efluente a tratar.

Se descartaron posibles perturbaciones en los resultados debido al cambio de la celda estándar por una de flujo continuo. La dilución en metanol no afecta de manera significativa a los resultados, se siguieron obteniendo r^2 altos, en todos los casos mayores a 0.8 y pendientes cercanas a la unidad (ver Tabla 4-12) y un análisis ANOVA mostró de nuevo que no existen diferencias significativas en el desempeño de cada uno de los métodos en presencia de metanol (Tabla 4-14). Los errores cuadráticos aumentaron ligeramente con la presencia de metanol, pero en todos los casos fueron menores a 5.41mg/L

En lo referente a la comparación de las mediciones en línea con respecto a las mediciones fuera de línea, el colorante que mostró mejor ajuste es el NA7, en cuanto al colorante RA151 y a la mezcla, aún cuando el ajuste no fue el deseado, siguen un comportamiento casi lineal, el colorante AA113 mostró diferencias significativas de absorbancia con respecto a las mediciones fuera de línea. Una posible causa es la variación de pH. Se midió el espectro de absorbancia de cada colorante a tres condiciones diferentes de pH. Las graficas obtenidas de los diferentes espectros de absorbancia se observan en la Figura 4-10.

Las graficas anteriores indican que el único colorante cuyo espectro cambia se manera significativa al variar el pH es el colorante AA113, pudiendo ser esa variación la explicación de la diferencia de la absorbancia medida en línea (sin control de pH) con respecto a la absorbancia medida fuera de línea (con pH controlado).

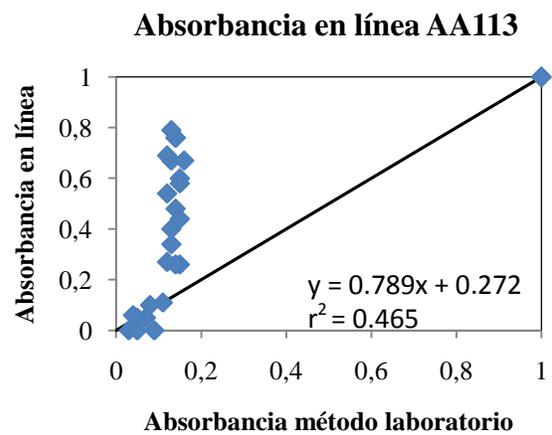
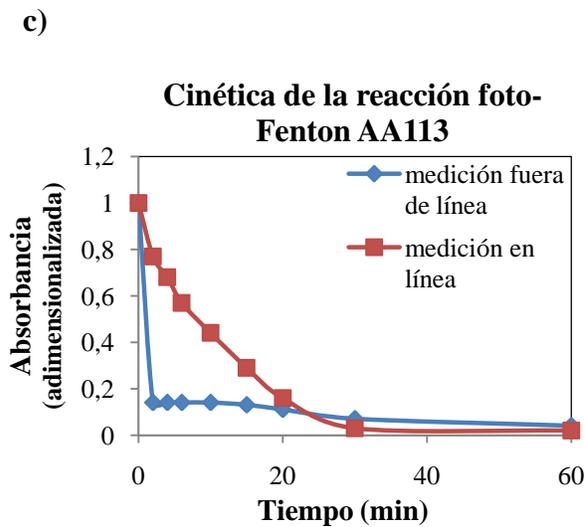
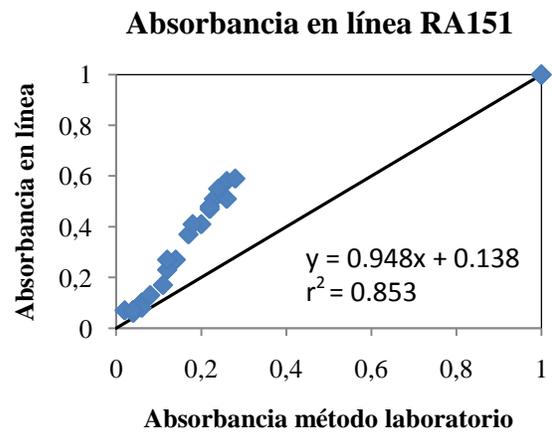
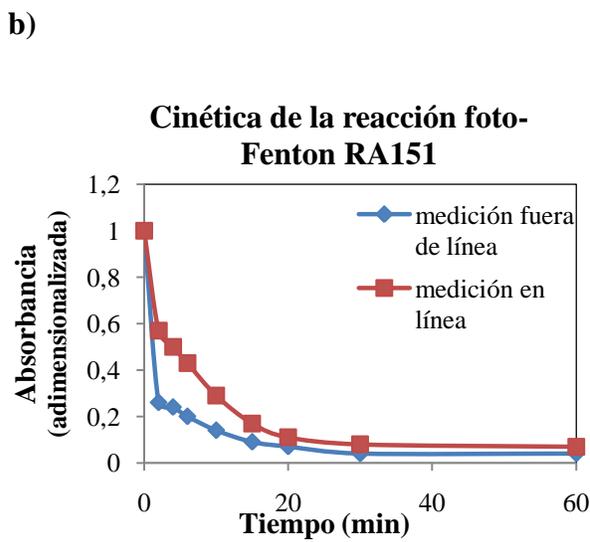
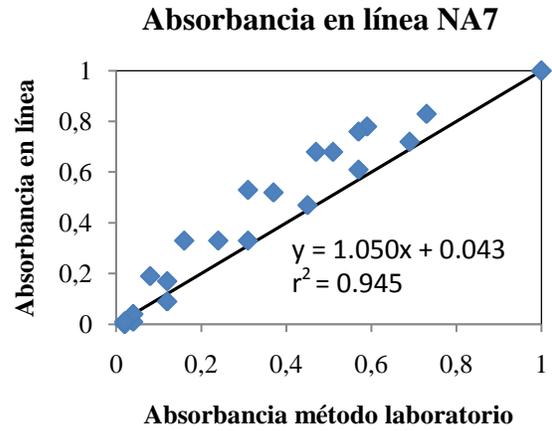
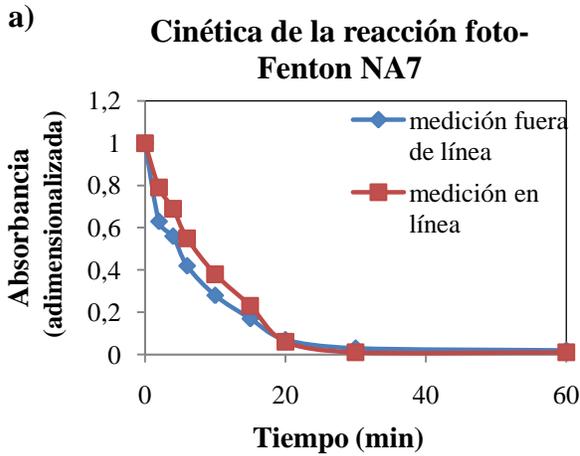


Figura 4-6 Comparación de absorbancias medidas en línea y fuera de línea de colorantes individuales

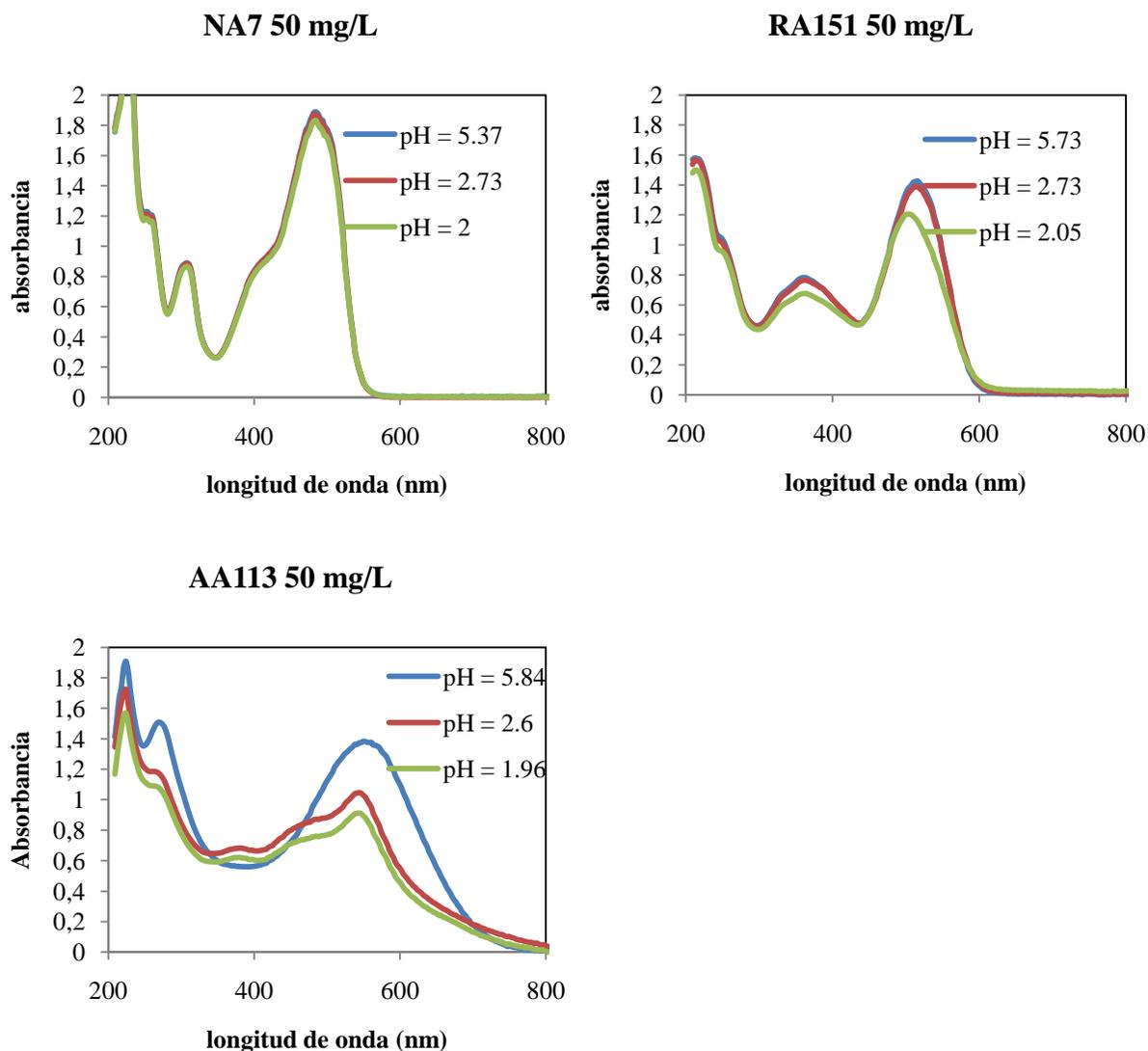


Figura 4-7 Cambio de espectro de absorbancia por variación de pH en los tres colorantes

4.4 Etapa IV.- Evaluación de las tres técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes en una mezcla, midiendo la absorbancia en línea en un proceso foto-Fenton

Para la aplicación de las tres técnicas quimiométricas de calibración multivariable se usaron los rangos de operación mostrados en la Tabla 3-11, que son los rangos en los cuales se observó el mejor desempeño de estas técnicas al analizar una muestra sometida a un proceso foto-Fenton.

Para la evaluación de las tres técnicas se tomaron 27 muestras de colorantes sometidos a un proceso foto-Fenton, pero la preparación de la muestra para el análisis en HPLC (dilución y filtrado) ocasionó

que se perdiera colorante, dando como resultado que en el cromatograma no aparecieran todas las concentraciones de los colorantes, quedando visibles en el cromatograma únicamente 15 muestras de NA7, 13 muestras en el RA151 y 6 muestras para el AA113.

Se aplicó la técnica de deconvolución lineal (DL), deconvolución no lineal (DNL) y mínimos cuadrados parciales (MCP) en el rango de operación encontrado para un proceso foto-Fenton (mínimo error cuadrático medio de los tres colorantes). Se encontraron los siguientes resultados:

DL.- El análisis ANOVA⁵ se muestra en la Tabla 4-16, el análisis de regresión lineal (cuyas gráficas se encuentran en el Anexo 6.7), el coeficiente de determinación y el error cuadrático medio obtenidos son los resumidos en la Tabla 4-15.

El análisis ANOVA, así como el coeficiente de determinación señalan que la técnica de DL empleada para encontrar las concentraciones de los colorantes presentes en una muestra sometidos a un proceso foto-Fenton no presenta buen ajuste con respecto a las concentraciones encontradas por el método de HPLC. El mejor ajuste se muestra en el cálculo de la concentración de la mezcla (suma de las concentraciones de cada colorante encontradas por separado).

Tabla 4-15 Análisis de las concentraciones encontradas por DL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

Colorante	M	b	r²	ECM
NA7	0.65	9.90	0.81	6
RA151	0.11	6.20	0.16	3
AA113	1.16	5.65	0.83	7
Mezcla	0.86	11.38	0.95	9

Tabla 4-16 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

Colorante	F	Probabilidad	Valor crítico
NA7	6.23	0.02	4.20
RA151	0.09	0.76	4.26
AA113	4.40	0.06	4.96
Mezcla	2.95	0.10	4.20

⁵ Hipótesis nula: igualdad de medias, nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$)

DNL.- Las muestras evaluadas por DNL usaron como rango de absorbancias el comprendido entre los 355-671nm. El análisis de regresión lineal (las gráficas resultantes se encuentran en el Anexo 6.7), el coeficiente de determinación y el error cuadrático medio de la aplicación de la técnica de DNL son los mostrados en Tabla 4-17. El análisis ANOVA⁶ se muestra en la Tabla 4-18.

El análisis ANOVA y el coeficiente de determinación muestran que la aplicación de la técnica de DNL sólo tiene un ajuste aceptable en el cálculo de una mezcla de colorantes (la suma de la concentración de los colorantes encontrados por separado). Sin embargo no es útil para encontrar la concentración de cada colorante por separado.

Tabla 4-17 Análisis de las concentraciones encontradas por DNL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

Colorante	M	b	r ²	ECM
NA7	0.61	9.46	0.76	5
RA151	0.21	4.10	0.36	3
AA113	1.15	7.35	0.81	9
Mezcla	0.89	9.23	0.95	7

Tabla 4-18 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DNL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

Colorante	F	Probabilidad	Valor crítico
NA7	4.07	0.05	4.20
RA151	0.86	0.36	4.26
AA113	6.66	0.03	4.96
Mezcla	1.89	0.18	4.20

MCP.-Las muestras evaluadas por MCP usaron el rango de 428-558 nm usando 8 variables latentes. El análisis de regresión lineal (las gráficas obtenidas se pueden ver en el Anexo 6.7), el coeficiente de determinación y el error cuadrático medio de la aplicación de la técnica de MCP son los mostrados en la Tabla 4-19. El análisis ANOVA⁷ se muestra en la Tabla 4-20.

Tabla 4-19 Análisis de las concentraciones encontradas por MCP en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

⁶ Hipótesis nula: igualdad de medias, nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$)

⁷ Hipótesis nula: igualdad de medias, nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$)

Colorante	M	b	r ²	ECM
NA7	0.62	11.49	0.83	7
RA151	0.57	5.17	0.92	3
AA113	1.06	0.75	0.99	1
Mezcla	0.79	13.56	0.96	10

Tabla 4-20 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por MCP en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

Colorante	F	Probabilidad	Valor crítico
NA7	9.67	0.00	4.20
RA151	3.53	0.07	4.26
AA113	0.17	0.69	4.96
Mezcla	3.64	0.07	4.20

De acuerdo a Namking *et al.* (2008) es posible ajustar aún más el rango de operación encontrado, buscando el rango que se ajuste mejor a cada colorante de manera individual, teniendo como resultado el uso de un rango por cada componente de la mezcla. Partiendo de esta idea se realizó una nueva búsqueda de rangos de operación para cada técnica y para cada colorante.

DL, rango ajustado a cada colorante.- Se usaron los datos encontrados para la selección del rango de operación, sólo que esta vez se eligió el rango que mejor se ajustara al cálculo de la concentración de cada colorante, encontrándose un rango de 323 a 700nm para el NA7, 355-623nm para el RA151 y 332-692nm para el AA113. Los datos encontrados por el análisis de regresión lineal (Ver gráficas en el Anexo 6.8), el coeficiente de determinación y el error cuadrático medio de la técnica de DL con el rango de operación ajustado a cada colorante se muestran en la

Tabla 4-21. El análisis ANOVA⁸ se muestra en la tabla Tabla 4-22

Con el nuevo rango usado se observa una mejora, pero el ajuste aún es deficiente. No es aplicable la técnica de DL para la búsqueda de concentraciones individuales en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton. El cálculo de la concentración total sí puede ser usado como referencia.

⁸ Hipótesis nula: igualdad de medias, nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$)

Tabla 4-21 Análisis de las concentraciones encontradas por DL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante

Colorante	m	b	r²	ECM
NA7	0.79	6.65	0.90	4
RA151	0.22	4.92	0.42	3
AA113	1.17	5.14	0.85	7
Mezcla	0.94	7.70	0.97	7

Tabla 4-22 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante

Colorante	F	Probabilidad	Valor crítico
NA7	3.02	0.09	4.20
RA151	0.02	0.88	4.26
AA113	3.86	0.08	4.96
Mezcla	1.60	0.22	4.20

DNL, rango ajustado a cada colorante.- Al igual que en la aplicación de la técnica anterior, se usaron los rangos que mejor ajuste presentaran para cada colorante de manera individual, encontrándose un rango de 355 a 623nm para el NA7, 355-634nm para el RA151 y 329-695nm para el AA113. El análisis de regresión lineal (Ver gráficas en el Anexo 6.8), el coeficiente de determinación y el error cuadrático medio de la aplicación de la técnica de DNL con el rango de operación ajustado a cada colorante se muestran en la Tabla 4-23 . El análisis ANOVA⁹ se muestra en la Tabla 4-24.

Nuevamente se observa una mejora pero el ajuste observado de la aplicación de la técnica de DNL con el rango ajustado a cada colorante aún es deficiente. El cálculo de la concentración total sí puede ser usado como referencia

⁹ Hipótesis nula: igualdad de medias, nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$)

Tabla 4-23 Análisis de las concentraciones encontradas por DNL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante

Colorante	M	b	r2	ECM
NA7	0.61	9.40	0.76	5
RA151	0.24	3.68	0.39	3
AA113	1.22	6.30	0.83	8
Mezcla	0.88	8.89	0.96	7

Tabla 4-24 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DNL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante

Colorante	F	Probabilidad	Valor crítico
NA7	4.00	0.06	4.20
RA151	1.31	0.26	4.26
AA113	5.58	0.04	4.96
Mezcla	1.66	0.21	4.20

MCP.- El rango de operación encontrado para cada colorante fue de 442 a 541 nm con 11 variables latentes para NA7, de 402 a 591 nm con 6 variables latentes para RA151 y de 422 a 583 nm con 9 variables latentes para AA113. El resultado de los análisis se muestran en la Tabla 4-25 y en la Tabla 4-26, las gráficas se muestran en el Anexo 6.8.

Tabla 4-25 Análisis de las concentraciones encontradas por MCP en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante

Colorante	m	b	r2	ECM
NA7	0.92	2.70	0.99	2
RA151	0.64	3.93	0.92	2
AA113	1.10	1.96	0.99	3
Mezcla	1.01	3.90	0.99	4

Tabla 4-26 Análisis ANOVA de las concentraciones encontradas por DNL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante

Colorante	F	Probabilidad	Valor crítico
NA7	0.48	0.49	4.20
RA151	1.53	0.23	4.26
AA113	0.82	0.39	4.96
Mezcla	0.66	0.42	4.20

De acuerdo a los resultados mostrados en el capítulo, el uso de un rango de operación ajustado, seleccionado por el mejor error cuadrático promedio de los tres colorantes, para la aplicación de las técnicas de calibración ya no es aplicable con buenos resultados en esta etapa. La aplicación de estos rangos en la técnica de DL mostró resultados significativamente diferentes con los valores de referencia. Un análisis de regresión lineal (resumido en la Tabla 4-15) obtuvo r^2 de hasta 0.16 en el caso de RA151, con una pendiente de 0.11 y aún cuando en los otros colorantes el r^2 fue mayor a 0.8, los valores de las pendientes y ordenadas al origen encontradas así como el análisis ANOVA (Tabla 4-16) muestran que no es conveniente el uso de esta técnica con estas condiciones. En el caso de la técnica de DNL, los resultados fueron equivalentes a los obtenidos por DL. En el caso de MCP, aún cuando los resultados mostraron un mejor ajuste que los obtenidos en las dos técnicas anteriores, aún continúan siendo insatisfactorios para los casos de NA7 y RA151. Esta conclusión se hace evidente si se observan las gráficas del Anexo 6.7, donde los resultados obtenidos se encuentran muy alejados de los valores de referencia.

La propuesta de Namking *et al.* (2008) de rangos ajustados para cada colorante mostró mejoras significativas para la técnica de MCP, siendo esta técnica la que presenta el mejor ajuste en el cálculo de concentraciones de cada componente de una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, esto se observa al encontrarse r^2 mayores a 0.92 en todos los casos. En lo referente a la técnica de DL, aún cuando mostró una ligera mejora en los resultados, el r^2 del colorante RA151 sigue siendo por debajo de 0.5, por lo que no es confiable aplicarla para el cálculo de la concentración de este colorante. El caso de DNL no presentó cambios visibles con respecto a la anterior técnica del uso de un solo rango de operación para todos los colorantes.

Vale la pena mencionar que los mejores resultados obtenidos en la aplicación de estas técnicas quimiométricas, ya sea en rangos ajustados para cada colorante o ajustados de manera general, fueron encontrados en el caso de la concentración total de la mezcla. Aún cuando los métodos no calcularan

bien las concentraciones individuales, al momento de sumar estas concentraciones para obtener la concentración total, el resultado era muy cercano al de referencia.

Si las absorbancias medidas en línea de los colorantes NA7, RA151 y de la mezcla son equivalentes a las medidas fuera de línea (ver Figura 4-6), se puede decir entonces que MCP puede aplicarse satisfactoriamente para la medición de la concentración en línea. Para el colorante AA113, dado que su absorbancia en línea es mayor (variación de pH) que la medida fuera de línea, la técnica de mínimos cuadrados parciales calcula concentraciones mayores a las de referencia.

4.5 Propuesta de automatización

En el diagrama de flujo de la Figura 4-8 se muestran los pasos propuestos para el desarrollo del algoritmo de automatización del proceso, tomando como base la información recabada en línea:

1. El sistema medirá la concentración inicial del total de colorantes a tratar.
2. La concentración de dosis de reactivo será determinada con base en una tabla de concentraciones recomendables para cada concentración de contaminante.
3. El usuario decidirá la fracción α de reactivo que se suministrará al proceso.
4. El seguimiento en línea permitirá saber el comportamiento del cambio de absorbancia y la concentración del efluente, lo cual permitirá la programación de la siguiente decisión:
 - a. ¿Se ha alcanzado la degradación meta? En caso de que la respuesta fuera afirmativa esto será un indicador de que el proceso ha finalizado; en caso contrario se procederá a la siguiente pregunta
 - b. ¿La mayor parte de la reacción ya terminó? En caso de que la respuesta fuera afirmativa; es decir, que la absorbancia ya no cambia, se procederá a medir nuevamente la concentración del efluente y determinar la nueva dosis de reactivo a usar. En caso contrario, es decir, que indique que la mayor parte de la reacción no se ha terminado y que aún no se ha alcanzado la degradación deseada, no se ejecutará ninguna acción puesto que la reacción sigue en curso.

En esta propuesta de algoritmo aprovecha dos herramientas desarrolladas a lo largo del trabajo: la medición en línea del espectro de absorbancia y la aplicación de técnicas de calibración multivariable para inferir la concentración de la muestra.

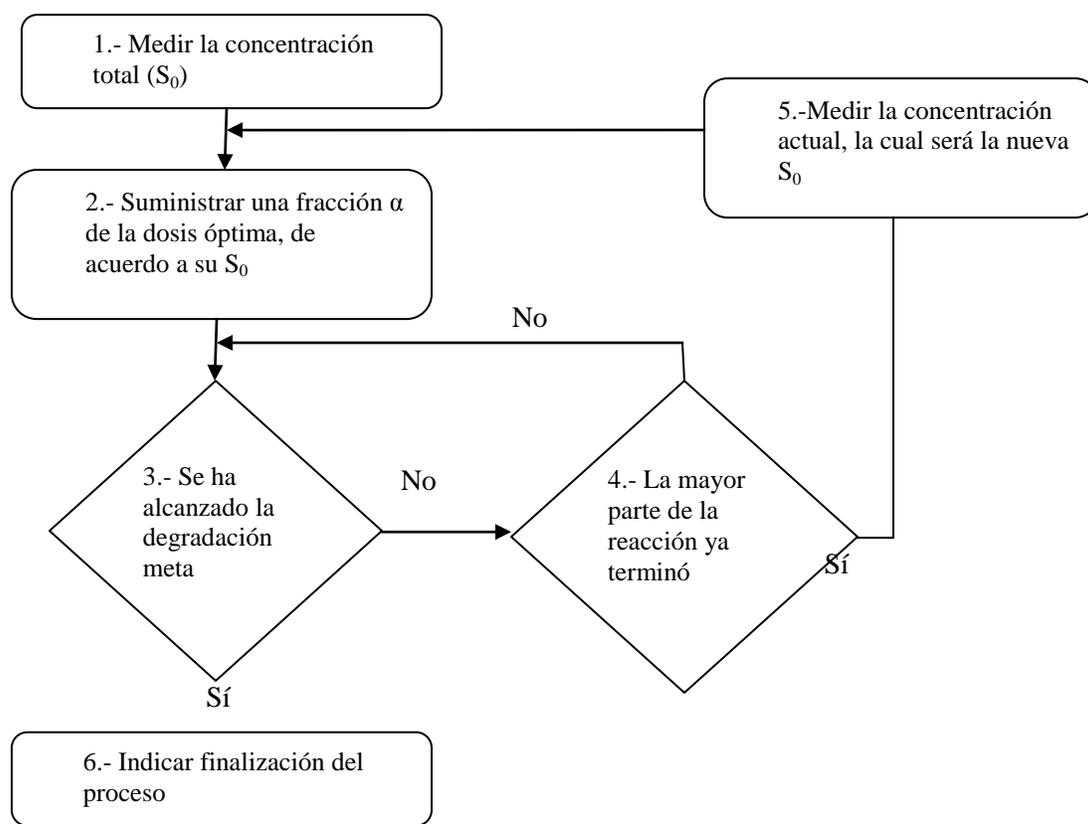


Figura 4-8 Diagrama de flujo de propuesta de automatización

La medición en línea del espectro de absorbancia de una mezcla es factible, tal como se revisó en el capítulo 4.3.3, donde el análisis de regresión lineal mostró un alto coeficiente de determinación entre la medición de la absorbancia de una mezcla medida en línea y fuera de línea ($r^2=0.81$). Entonces, una vez teniendo la medición del espectro es posible el cálculo de la concentración total de la muestra. Para determinar la concentración de una muestra la técnica que dio un excelente ajuste con respecto a la concentración de referencia ($r^2=0.99$) fue la de MCP usando rangos de absorbancia diferentes para cada colorante. Teniendo estas dos herramientas es posible el inicio de la implementación del sistema de control propuesto.

Es importante mencionar que en este proyecto no se abarcó el estudio de perturbaciones tales como presencia de burbujas en la celda, taponamiento del sistema ni ensuciamiento del sistema; estos puntos supondrán un aspecto importante al momento de la instalación del sistema de control.

4.6 Conclusiones

De los resultados obtenidos a lo largo del estudio se pueden desprender las siguientes conclusiones:

El sistema de medición en línea propuesto mide los cambios de absorbancia de una mezcla de colorantes a lo largo de un proceso foto-Fenton. La medición en línea muestra diferencias de valores con respecto a la medición de la absorbancia hecha en laboratorio. Un análisis de regresión lineal hecha con los valores de absorbancia medidos en línea y los medidos en laboratorio muestra que existe una alta correlación entre los mismos, obteniéndose pendientes cercanas a la unidad en las absorbancias de la mezcla y para los colorantes NA7 y RA151, así como coeficientes de determinación altos, teniendo valores mayores a 0.8 para la mezcla y para el colorante RA151 y mayor a 0.9 para el NA7. Sin embargo, el colorante AA113 presenta alto grado de sensibilidad en el espectro de absorbancia con respecto al pH en que se encuentre, lo que da como resultado valores diferentes de absorbancia en línea si se compara con los valores de absorbancia medidos en laboratorio, donde el pH es modificado por el tratamiento de la muestra.

En lo que se refiere a las tres técnicas de calibración multivariable estudiadas (deconvolución lineal, deconvolución no lineal y mínimos cuadrados parciales), de acuerdo a un análisis ANOVA, no mostraron diferencias significativas entre ellas ni entre los valores considerados como de referencia al calcular las concentraciones individuales de colorantes presentes en una mezcla. Sin embargo, en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, la técnica con la que se obtuvieron mejores resultados fue la de mínimos cuadrados parciales.

La técnica de mínimos cuadrados parciales usando rangos personalizados para cada colorante, aplicada al cálculo de concentraciones individuales de colorantes en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton mostró una alta correlación con respecto a los valores considerados como referencia, es decir, a los calculados por la técnica de HPLC. Un análisis de regresión lineal entre los valores calculados y los tomados como referencia muestra que si bien el colorante RA151, a diferencia de los otros, no presenta una pendiente cercana a uno, el coeficiente de correlación obtenido de la mezcla, NA7, RA151 y AA113 es mayor a 0.9

Para la medición en línea del cambio de concentración de cada colorante en un proceso foto-Fenton la técnica adecuada es la de mínimos cuadrados parciales. La técnica de mínimos cuadrados parciales permite inferir por medio de la medición de la absorbancia el cambio de la concentración de los colorantes, errando únicamente en la concentración del AA113, debido a las variaciones que presenta el espectro de absorbancia por el cambio de pH, variaciones que no están contempladas en la base de datos de calibración.

Como conclusión final, puede decirse que la medición en línea hace posible la implementación de un sistema sencillo de control, basado en los cambios de absorbancia y concentración total del colorante

4.7 Trabajo futuro

El trabajo presentado marca un inicio del estudio de aspectos que no fueron cubiertos, aspectos que dan origen a nuevas investigaciones. Algunos de los aspectos que se recomiendan revisar son los siguientes:

La medición en línea, al ser el efluente recirculado a través de la celda de flujo continuo, tiene la desventaja de ser susceptible a taponamientos. Este factor, así como el ensuciamiento de la celda y la presencia de perturbaciones en la medición, tales como burbujas, y la existencia de otro contaminante no fueron abarcados en este estudio.

La programación y prueba del algoritmo así como la instalación de sistemas de medición y filtrado del efluente previa medición en línea no formaron parte del proyecto.

El método desarrollado deja sentada una metodología que puede ser utilizada para la búsqueda de otro tipo de contaminantes que puedan ser hallados por medio de espectrofotometría UV/Vis.

5 Bibliografía

- Alciaturi C., Escobar M., De la Cruz C., Rincón C. (2003), Partial least squares (PLS) regression and its application to coal analysis, *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. **26** (3):197-204
- Al-Degs Y. (2009). Determination of three dyes in commercial soft drinks using HPLC/MS and liquid chromatography, *Food Chemistry* **117**:485-490
- Amigo J. (2007). Desarrollo y aplicación de métodos quimiométricos multidimensionales al estudio de sistemas enzimáticos. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M. (2008). Green analytical chemistry, *Trends in analytical chemistry*, **27** (6):497-11
- Azema N., Pouet M.-F., Berho C., Thomas O. (2002). Wastewater suspended solids study by optical methods, *Colloids and Surfaces* **204**:131-140
- Benigni R., Passerini L. (2002). Carcinogenicity of the aromatic amines: from structure-activity relationships to mechanism of action and risk assessment, *Reviews in Mutation Research*, **511**:191-206
- Brereton R. (1997). Multilevel Multifactor Designs for Multivariate Calibration, *The Analyst*, **112**:1521-1529
- Burgess C. (2007). The Basics of spectrophotometric measurement, en: Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry Vol 27, Thomas and C. Burgess, Elsevier, Pag 3
- Chang R. (1977), Principios básicos de espectroscopia, Mc Graw Hill, New York, U.S.A
- Coughlin M., Kinkle B., Bishop P. (2002). Degradation of acid orange 7 in an aerobic biofilm, *Chemosphere*, **46**:11-19
- Cristóvão R., Tavares A., Ferreira L., Loureiro J., Boaventura R., Macedo E. (2009). Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase, *Bioresource technology* **100** :1094-1099
- Dahlén J., Bläckström M., Ephraim J., Borén H., Allard B. (1999), Determination of the molecular weight of fulvic acids by UV/Vis spectroscopy, *Chemosphere*, **38** (4):783-794
- Dahlén J., Karlsson S., Bäckström M., Hagberg J., Pettersson H. (2000). Determination of nitrate and other water quality parameters in ground water from UV/Vis spectra employing partial least squares regression, *Chemosphere*, **40**: 71-77
- Dobbs R., Wise R., Dean R. (1972). The use of Ultra-Violet absorbance for monitoring the total organic carbon content of water and wastewater, *Water Reserch Pergamon*, **6**: 1173-1180
- El Khorassani H., Theraulaz F., Thomas O. (1998). Application of UV spectrophotometry to the study of treated wastewater discharges in Rivers, *Acta Hydrochimica et hydrobiologica* **26** (5): 296-299

- Escalas A., Droguet M., Guadayol J., Caixach J. (2003). Estimating DOC regime in wastewater treatment plant by UV deconvolution, *Water Research*, **37**: 2627-2635
- Espinosa-Mansilla A., Salinas F., del Olmo M., de Orbe Payá I. (1996). Determination of synthetic food antioxidants in multicomponent mixtures using UV-Visible spectrophotometry and Partial Least-Squares Calibration, *Applied spectroscopy*, **50** (4):449-453
- Ghasemi J., Niazi A. (2001). Simultaneous determination of cobalt and nickel. Comparison of prediction ability of PCR and PLS using original, first and second derivative spectra, *Microchemical Journal*, **68**: 1-11
- Hemmateenejad B., Akhond M., Samari F. (2007). A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline, and phenol: Effect of wavelength selection, *Spectrochimica Acta part A* **67**: 958-965
- Herrera V., Ticona J.C., Udaeta E., Chuqui R. y Giménez A. (2008). Validación del método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolínicos del extracto de Galipea longiflora Krause Kallunki, *Órgano oficial del colegio de bioquímica y farmacia de bolivia*, **16**: 47-53
- Kumar Hansal S., Kaur N. Singh S. (2009). Photocatalytic degradation of two commercial reactive dyes in aqueous phase using nanophotocatalysts. *Nanoscale Res Lett*, **4**: 709-716
- Langergraber G., Fleischmann N., Hofstaedter F., Weingartner A. (2004a). Monitoring of paper mill wastewater treatment plant using UV/Vis spectroscopy, *Water Science and Technology*, **49** (1):9-14
- Langergraber G., Gupta J.K., Pressl A., Hofstaedter F., Lettl W., Weingartner A., Fleischmann N. (2004b). On line monitoring for control of a pilot-scale sequencing batch reactor using a submersible UV/Vis spectrometer, *Wastewater and Technology* **50** (10):73-80
- Li Z., Dong M., Li H., Du X., Li Y. (2009). Case application of a combined treating process on azo dye wastewater, *The 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical engineering iCBBE 2009* 1:4
- Lu X., Yang B., Chen J., Sun R. (2009). Treatment of wastewater containing azo dye reactive brilliant red X-3B using sequential ozonation and upflow biological aerated filter process, *Journal of hazardous Materials*, **161**:241:245
- Mansilha C., Melo A., Rebelo H., Ferreira I.M.P.L.V.O., Pinho O., Dominguez V., Pinho C., Gameiro P. (2010). Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes, *Journal of Chromatography A*, In Press, 1-11
- Manu B., Chaudhari S., (2002). Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes, *Bioresource Technology*. **82**: 225-231
- Martinez E., López G., (2001). Tratamiento químico de contaminantes orgánicos- El proceso Fenton, *Ingeniería Química, España* **375**:149-153

- Martins A., Arsand D., Brenner C., Minetto L. (2008). COD Evaluation of Hospital Effluent by Means of UV-Spectral Deconvolution, *Clean*, **36** (10-11):875-878
- Morcillo J., Orza J. (1972), Espectroscopia estructura y espectros atómicos. Editorial Alambra, S.A., España.
- Naimabadi A., Movahedian H., Shahsavani A. (2009). Decolorization and biological degradation of azo dye reactive red2 by anaerobic/aerobic sequential process, *Iranian journal of environmental health science & engineering*. **6** (2):67-72
- Namking H., Lee Y., Chung H. (2008). Improving prediction selectivity for on-line near-infrared monitoring of components in etchant solution by spectral range optimization, *Analytica chimica acta* **606**:50-56
- Ocean Optics Inc. (2008). USB4000 Fiber Optics Spectrometer installation and operation manual, Halma group
- O. Thomas, Cerda V.(2007). From spectra to qualitative and quantitative results, en: Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry Vol 27, Thomas and C. Burgess, Elsevier, Pag 21-45
- Oliveira M., Pupo R., Gomes J., Jardim W., Rohwedder J. (2001). Sistema de injeção em fluxo espectrofotométrico para monitorar peróxido de hidrogênio em processo de fotodegradação por reação foto- Fenton, *Química Nova*, **24** (2):188-190
- Ovalles J., León L., Buchheister M., Luna J. (2002). Aplicación de un sistema por inyección en flujo a la determinación cuantitativa de astemizol en formas farmacéuticas sólidas, *Revista de la Facultad de Farmacia* **43**(1):29-33
- Paradowska M. (2004). Tailored chemical oxidation techniques for the abatement of bio-toxic organic wastewater pollutants: An experimental study. Tesis de doctorado, Escola Tècnica Superior de Enginyeria Química, Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili.
- Pavia D., Lampman G., Kriz (1996), Introduction to spectroscopy, a guide for students of organic chemistry, Harcourt Brace.
- Peralta-Zamora P., Kunz A., Nagata N., Poppi R.J. (1998). Spectrophotometric determination of organic dye mixtures by using multivariate calibration, *Talanta*, **47**: 77-84
- Perkin-Elmer (2004). Technical specifications for the Lambda 25/35/45 UV/Vis spectrophotometers, PerkinElmer Inc.
- Pham H., Benitez A., Hommet F., Bombe D., Schoefs O., Pauss A. (2008). A new quantitative and low-cost determination method of nitrate in vegetables, based on deconvolution of UV spectra, *Talanta*, **76**: 936-940
- Pinheiro H., Touraud E., Thomas O. (2004). Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters, *Dyes and pigments*, **61**:121-139

- Prato-García D., Vasquez-Medrano R., Hernandez-Esparza M. (2009). Solar photoassisted advanced oxidation of synthetic phenolic wastewaters using ferrioxalate complexes, *Solar Energy*, **83**:306-315
- Prato-García D. (2010). Tratamiento de colorantes azo mediante un sistema híbrido químico biológico. Tesis de doctorado, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Roig B., Thomas O. (2003), UV spectrophotometry: a powerful tool for environmental measurement, *Magament of Environmental Quality: An International Journal* **14** (3):398-404
- Sahunin C., Kaewboran J., Hunsom M. (2006). Treatment of textile dyeing wastewater by photo oxidation using UV/H₂O₂/Fe²⁺ reagents, *Science Asia* **32** (2):1-6
- Şahin S., Demir C., Güçer, S. (2007). Simultaneous UV/Vis spectrophotometric determination of disperse dyes in textile wastewater by partial least squares and principal component regression, *Dyes and Pigments*, **73**: 368-376.
- Sayar S., Özdemir Y. (1998). First-derivative spectrophotometric determination of Ponceau 4R, Sunset Yellow and Tartrazine in confectionery products, *Food Chemistry*, **61** (3): 367-372
- Schatzlein D., Thomsen V.(2008). The Chemical Analysis Process, *Spectroscopy* **23** (10): 30-35
- Skoog D., West D., Holler F., Crouch S. (2005), Fundamentos de química analítica 8a. edición, Thomson
- Sponza D., Işık M. (202). Decolorization and azo dye degradation by anaerobic/aerobic sequential process, *Enzyme and microbial technology*, **31**:102-110
- Tapp M., Hunter K., Currie K., Machashill B. (2000). Apparatus for continuous-flow underway spectrophotometric measurement of surface water pH, *Marine Chemistry*, **72**:193-202
- Thomas O., Pouet M.-F. (2005), Wastewater quality monitoring: On-line/On site measurement. The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 5, Part O. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Thomas O., Théraulza F., Cerdá V., Constant D., Quevauviller P. (1997). Wastewater quality monitoring, *Trends in analytical Chemistry*, **16**, (7):419-424
- Thomas O., Cerda V., (2007) Capítulo 2 de Spectra to qualitative and quantitative results en: O. Thomas and C. Burgess, Editor(s), Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Elsevier, UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater, **27**: 21-45
- Thomas O., Theraulaz F., Domeizel M. Massiani C. (1993), UV spectral deconvolution: a valuable tool for wastewater quality determination, *Environmental Technology*, **14**:1187-1192
- Tsoumanis C., Giokas D., Vlessidis A. (2010). Monitoring and classification of wastewater quality using supervised pattern recognition techniques and deterministic resolution of molecular absorption spectra based on multiwavelength UV spectra deconvolution, *Talanta*, In press.

- Vanrolleghem P., Lee D. (2003). On line monitoring equipment for wastewater treatment processes: state of the art, *Water Science and Technology*, **47** (2):1-34
- Van den Broeke J., Langergraber G., Weingartner A. (2006). On-line and in situ UV/Vis spectroscopy for multi-parameter measurements: a brief review, *Spectroscopyeurope*, **18** (4):15-18
- Van der Zee F., Villaverde S. (2005). Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes- a short review of bioreactor studies, *Water research*. **39**:1425-1440
- Vargas A., Buitrón G. (2006). On-line concentration measurements in wastewater using nonlinear deconvolution and partial least squares of spectrophotometric data, *Water science and technology* **53** (4-5):457-463
- Vidotti E., Cancino J., Oliveira C., Rollemberg M. (2005). Simultaneous determination of food dyes by first derivative spectrophotometry with sorption onto polyurethane foam, *Analytical Sciences*. **21**:149-153
- Vivó-Truyols G., Torres-Lapasió J., van Nederkassel A., Heyden Y., Massart D. (2005). Automatic program for peak detection and deconvolution of multi-overlapped chromatographic signals Part II: Peak model and deconvolution algorithms, *Journal of chromatography A* **1096**:146-155
- Walton R. (2001). Validation of laboratory Test and methods, *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **10** (2):59-65

6 ANEXOS

6.1 Validación del método de HPLC para concentraciones en una mezcla

Se validó el método con una serie de 19 experimentos (ver Tabla 6-1)

Tabla 6-1 Experimentos para validación HPLC

	NA7	RA151	AA113	Mezcla
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
1	10	0	18	28
2	15	14	0	29
3	10	19	0	29
4	10	9	9	28
5	0	9	18	27
6	25	0	0	25
7	0	23	0	23
8	15	0	13	28
9	20	9	9	38
10	0	19	9	27
11	0	14	13	27
12	20	0	9	29
13	20	9	0	29
14	0	0	22	22
15	10	9	18	37
16	10	12	11	33
17	10	19	9	37
18	13	12	9	33
19	13	9	11	33

Los resultados se resumen en Figura 2-1. Se usó la regresión lineal, el coeficiente de determinación y el error cuadrático medio (ver Tabla 6-2).

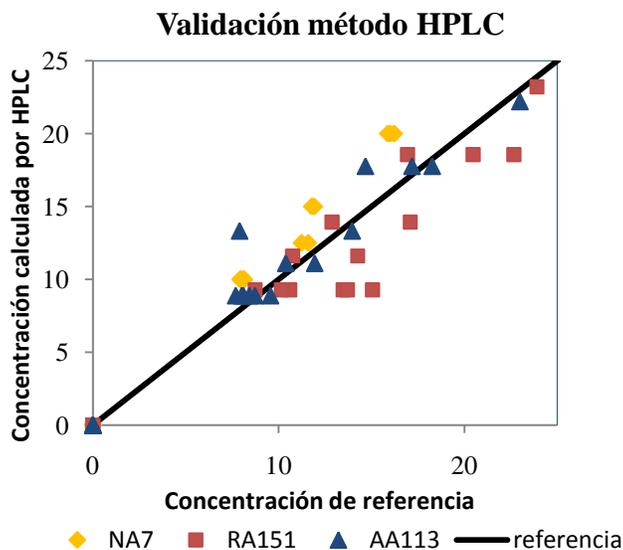


Figura 6-1 Resultados de la validación de las concentraciones encontradas por HPLC en 19 muestras preparadas a concentraciones conocidas

Tabla 6-2 Correlación datos HPLC, error cuadrático medio (ECM)

Colorante	m	b	r ²	ECM
NA7	1.25	-0.12	0.99	3
RA151	0.88	0.02	0.93	2
AA113	0.99	0.58	0.95	2

Con los resultados anteriormente mostrados se puede aplicar el método de HPLC para la cuantificación de la concentración de cada colorante (NA7, RA151 y AA113) dentro de una mezcla

6.2 Base de datos de las técnicas de calibración multivariable

En la Tabla 6-3 se muestra la base de datos usada para la aplicación de las tres técnicas de calibración multivariable

Tabla 6-3 Base de datos de las técnicas de calibración multivariable

	NA7 (mg/L)	RA151 (mg/L)	AA113 (mg/L)		NA7 (mg/L)	RA151 (mg/L)	AA113 (mg/L)
1	61	0	0	29	0	28	27
2	48	0	0	30	40	0	18
3	26	0	0	31	40	19	0
4	13	0	0	32	0	0	44
5	7	0	0	33	20	19	36
6	1	0	0	34	20	23	22
7	0	54	0	35	20	37	18
8	0	37	0	36	25	23	18
9	0	19	0	37	25	19	22
10	0	9	0	38	0	0	0
11	0	4	0	39	20	20	20
12	0	1	0	40	20	2	2
13	0	0	1	41	2	2	40
14	0	0	4	42	2	40	10
15	0	0	9	43	10	40	20
16	0	0	16	44	40	20	10
17	0	0	33	45	20	10	10
18	0	0	47	46	10	10	30
19	20	0	36	47	40	2	30
20	30	28	0	48	2	30	2
21	20	37	0	49	30	2	20
22	20	19	18	50	2	20	30
23	0	19	36	51	30	30	10
24	50	0	0	52	30	10	2
25	0	46	0	53	10	2	10
26	30	0	27	54	2	10	20
27	40	19	18	55	10	20	2
28	0	37	18				

6.3 Experimentos para búsqueda de rango de operación, aplicación de las tres técnicas para mezclas de colorantes

Se realizaron 26 experimentos con concentraciones de colorantes sin mezclar (ver Tabla 6-4)

Tabla 6-4 Experimentos para la búsqueda del rango de operación de los métodos multivariados.

	NA7 (mg/L)	RA151 (mg/L)	AA113 (mg/L)		NA7 (mg/L)	RA151 (mg/L)	AA113 (mg/L)
1	3	0	0	14	0	12	0
2	6	0	0	15	0	20	0
3	13	0	0	16	0	40	0
4	25	0	0	17	0	54	0
5	31	0	0	18	0	0	1
6	52	0	0	19	0	0	3
7	54	0	0	20	0	0	6
8	56	0	0	21	0	0	12
9	58	0	0	22	0	0	14
10	0	1	0	23	0	0	16
11	0	4	0	24	0	0	30
12	0	9	0	25	0	0	50
13	0	10	0	26	0	0	81

6.4 Evaluación de las técnicas de calibración multivariable en el cálculo de concentraciones de colorantes

Se realizaron 9 experimentos para la evaluación del desempeño de las técnicas de DL, DNL y MCP (ver Tabla 6-5)

Tabla 6-5 Mezclas para la evaluación de DL, DNL y MCP

	NA7 (mg/L)	RA151 (mg/L)	AA113 (mg/L)	concentración total (mg/L)
1	15	12	14	42
2	0	25	29	54
3	31	25	14	70
4	31	12	29	72
5	15	25	0	40
6	31	0	0	31
7	0	0	14	14
8	0	12	0	12
9	15	0	29	44

En las Tabla 6-6, Tabla 6-7 y Tabla 6-8 se encuentran los valores calculados por cada método para los colorantes.

Tabla 6-6 Concentraciones calculadas para el colorante NA7 por los tres métodos

	NA7 preparado (mg/L)	NA7 calculado por DL(mg/L)	NA7 calculado por DNL (mg/L)	NA7 calculado por MCP(mg/L)
1	15	15	13	12
2	0	0	0	0
3	31	27	25	25
4	31	27	25	24
5	15	15	15	13
6	31	29	30	26
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	15	15	12	10

Tabla 6-7 Concentraciones calculadas para el Colorante RA151 por los tres métodos

	RA151 preparado (mg/L)	RA151 calculado por DL (mg/L)	RA151 Calculado por DNL (mg/L)	RA151 calculado por MCP (mg/L)
1	12	11	10	11
2	25	24	24	24
3	25	20	21	23
4	12	11	9	11
5	25	23	25	23
6	0	0	0	0
7	0	0	2	0
8	12	12	13	12
9	0	0	0	0

Tabla 6-8 Concentraciones calculadas para el colorante AA113 por los tres métodos

	AA113 preparado (mg/L)	AA113 calculado por DL (mg/L)	AA113 Calculado por DNL (mg/L)	AA113 calculado por MCP (mg/L)
1	14	12	14	13
2	29	24	25	24
3	14	14	15	10
4	29	24	27	24
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	14	12	12	14
8	0	0	0	0
9	29	22	26	26

6.5 Perturbaciones por cambio de celda

Se midió la absorbancia de 19 experimentos en la celda estándar y en la celda de flujo continuo para verificar que el cambio de celda no afecta la medida de la absorbancia. (ver Tabla 6-9)

Tabla 6-9 Concentraciones de 19 experimentos para la evaluación del cambio de celda

	NA7	RA151	AA113
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
1	20	0	36
2	30	28	0
3	20	37	0
4	20	19	18
5	0	19	36
6	50	0	0
7	0	46	0
8	30	0	27
9	40	19	18
10	0	37	18
11	0	28	27
12	40	0	18
13	40	19	0
14	0	0	44
15	20	19	36
16	20	23	22
17	20	37	18
18	25	23	18
19	25	19	22

6.6 Concentraciones calculadas por los tres métodos a 9 mezclas en metanol

En las tablas Tabla 6-10, Tabla 6-11 y Tabla 6-12 se encuentran los valores calculados por cada método para los colorantes presentes en las mezclas

Tabla 6-10 Concentraciones calculadas para el colorante NA7 por los tres métodos

	NA7 preparado (mg/L)	NA7 calculado por DL(mg/L)	NA7 calculado por DNL (mg/L)	NA7 calculado por MCP(mg/L)
1	15	13	12	12
2	0	0	0	0
3	30	26	24	24
4	30	24	23	23
5	15	15	15	13
6	30	30	30	27
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	15	10	8	10

Tabla 6-11 Concentraciones calculadas para el colorante RA151 por los tres métodos

	RA151 preparado (mg/L)	RA151 calculado por DL (mg/L)	RA151 Calculado por DNL (mg/L)	RA151 calculado por MCP (mg/L)
1	12	8	6	12
2	24	18	18	24
3	24	19	18	23
4	12	5	0	12
5	24	23	24	23
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	12	12	12	11
9	0	0	0	0

Tabla 6-12 Concentraciones calculadas para el colorante AA113 por los tres métodos

	AA113 preparado (mg/L)	AA113 calculado por DL (mg/L)	AA113 Calculado por DNL (mg/L)	AA113 calculado por MCP (mg/L)
1	20	19	23	16
2	39	39	39	31
3	20	19	21	17
4	39	39	46	32
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	20	21	20	18
8	0	0	0	0
9	39	40	43	34

Las gráficas de los resultados de la aproximación entre los valores calculados con respecto a los preparados se muestran en la Figura 6-2

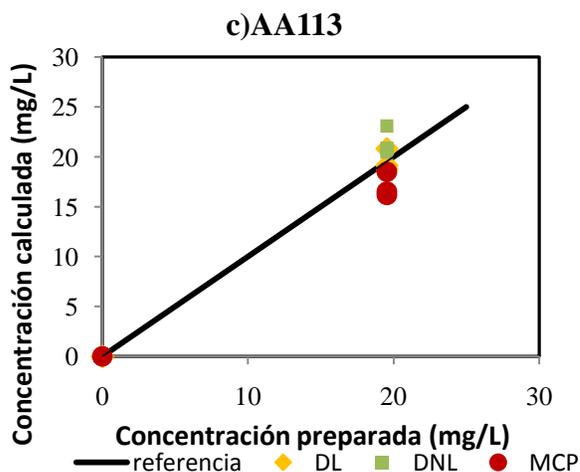
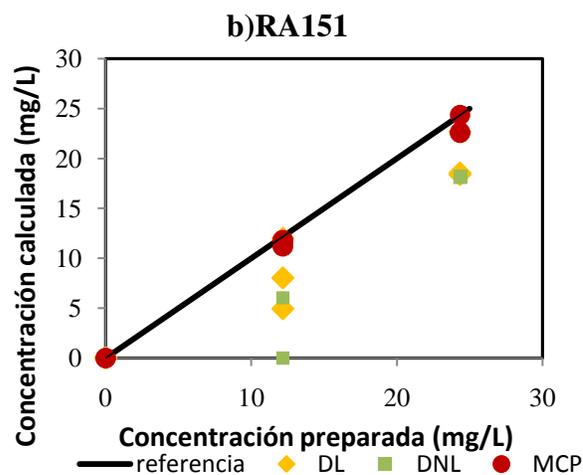
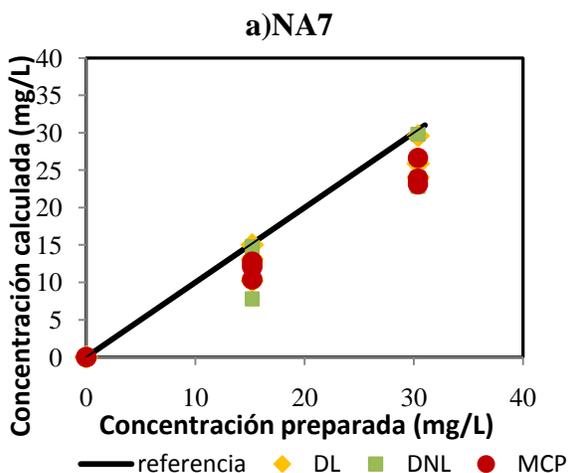


Figura 6-2 Concentraciones de colorantes en mezclas diluidas con metanol, calculadas por DL, DNL y MCP

6.7 Gráficas de resultados, mezcla foto-Fenton

En esta sección se muestran las gráficas resultantes del análisis de regresión lineal entre las concentraciones medidas por medio de la técnica de HPLC y las encontradas por cada una de las técnicas en el análisis de mezclas de colorantes sometidas a un proceso de degradación foto-Fenton

Las muestras evaluadas por DL, evaluadas en el rango de 352 a 647 nm, presentan el comportamiento mostrado en la Figura 6-3, donde lo ideal es que todas las muestras queden sobre la línea de pendiente unitaria mostrada en cada gráfica.

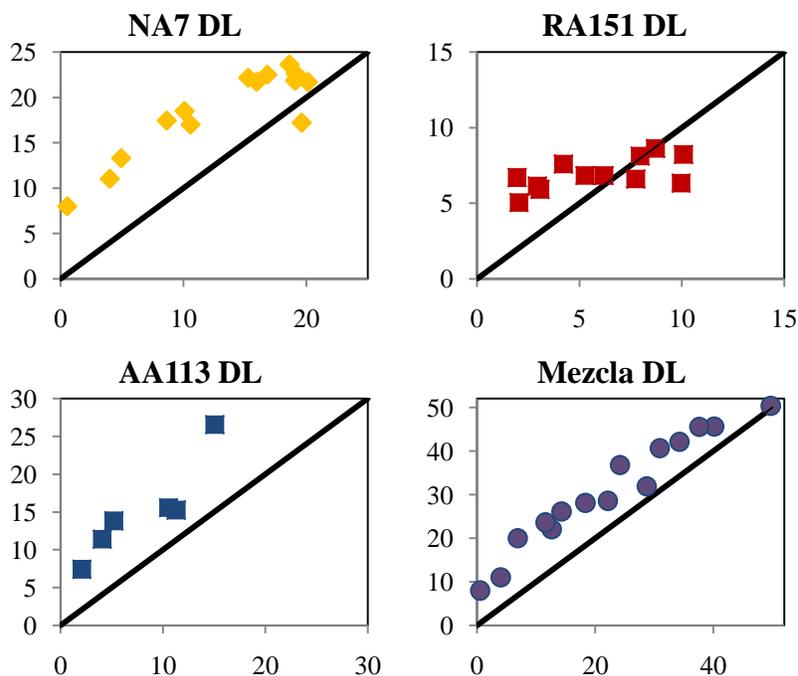


Figura 6-3 Concentraciones encontradas por DL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

Las muestras evaluadas por DNL usaron como rango de absorbancias el comprendido entre los 355-671nm, estas muestras presentan el comportamiento mostrado en la Figura 6-4. Nuevamente la técnica puede ser considerada adecuada si los puntos de muestra quedan cercanos a la línea de pendiente unitaria mostrada en las gráficas

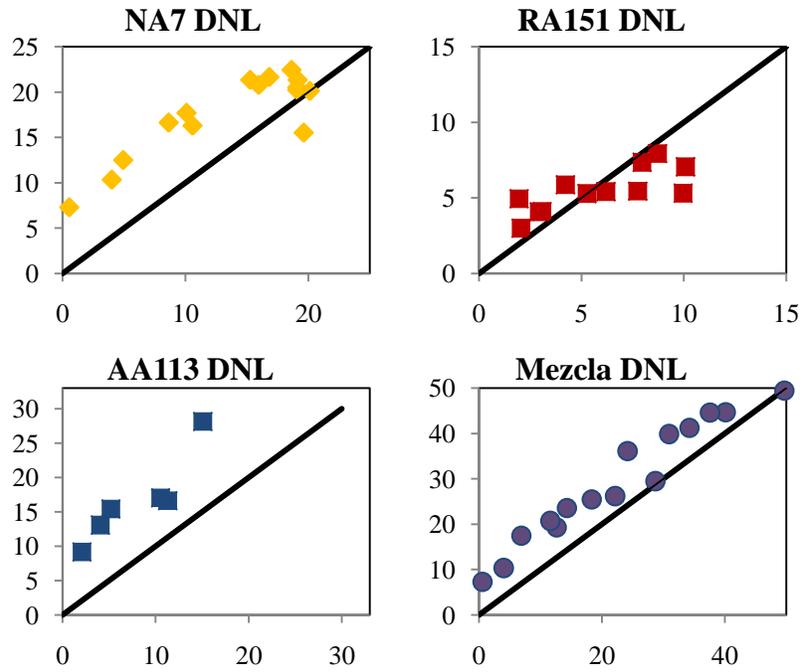


Figura 6-4 Concentraciones encontradas por DNL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

Las muestras evaluadas por MCP usaron el rango de 428-558nm usando 8 variables latentes. Los resultados se muestran en la Figura 6-5

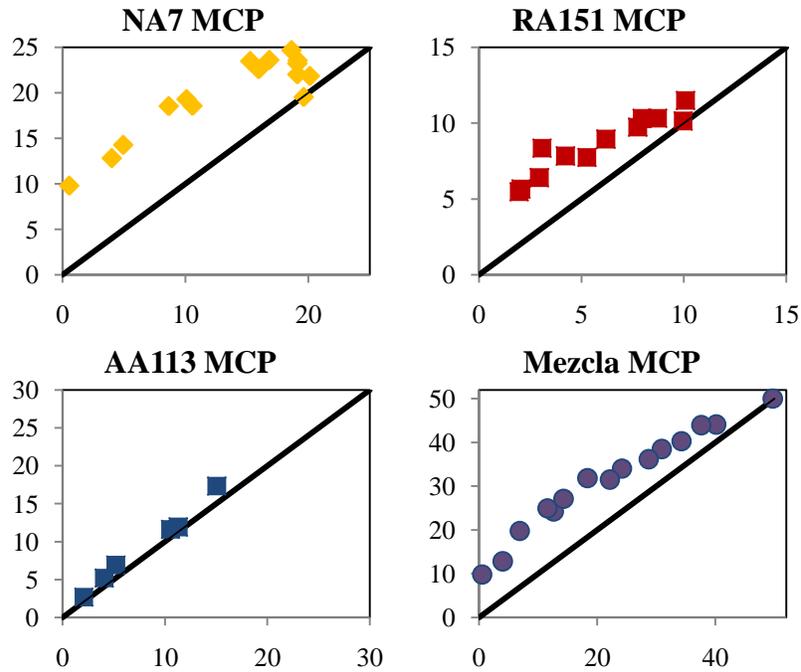


Figura 6-5 Concentraciones encontradas por MCP en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton

6.8 Gráficas de resultados, mezcla foto-Fenton, rango adaptado a cada colorante

Los resultados del cálculo de concentraciones por DL, realizados en el rango que mejor se ajusta al cálculo de la concentración de cada colorante, es decir, en el rango de 323 a 700 nm para el NA7, 355-623 nm para el RA151 y 332-692 nm para el AA113, se muestran en la Figura 6-6.

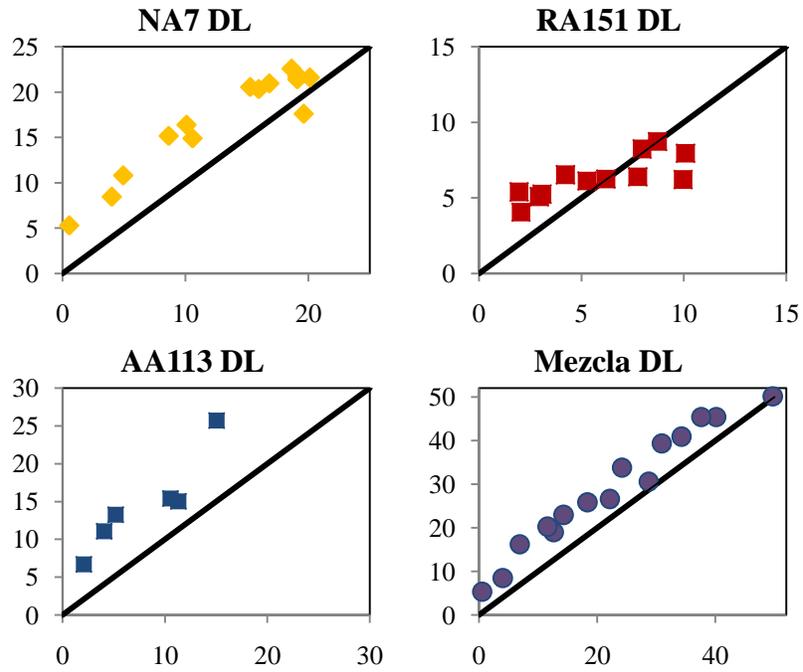


Figura 6-6 Concentraciones encontradas por DL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante

En DNL se usaron los rangos de 355 a 623nm para el NA7, 355-634nm para el RA151 y 329-695nm para el AA113. Los resultados de estos nuevos rangos se muestran en la Figura 6-7.

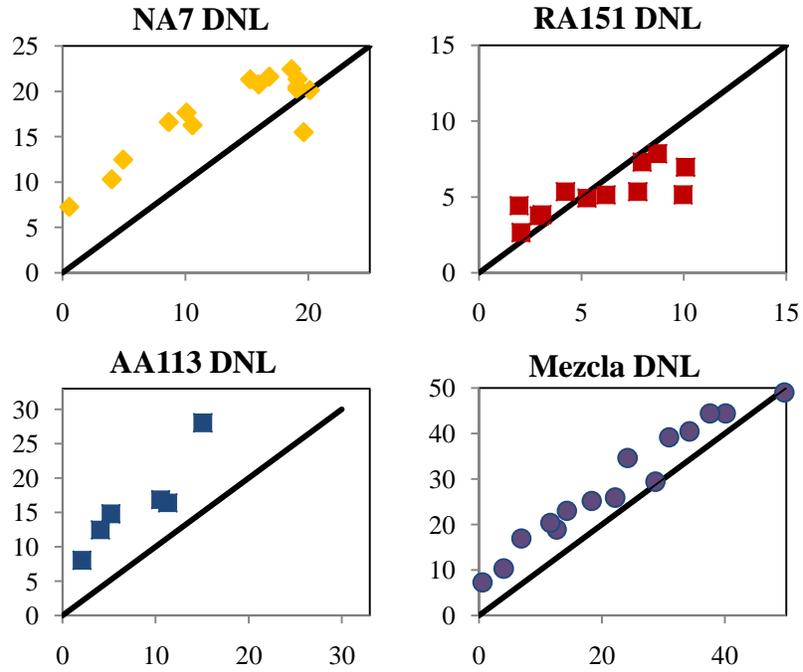


Figura 6-7 Concentraciones encontradas por DNL en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante

MCP fue aplicado en el rango de 442 a 541 nm con 11 variables latentes para NA7, de 402 a 591 nm con 6 variables latentes para RA151 y de 422 a 583 nm con 9 variables latentes para AA113. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura 6-8.

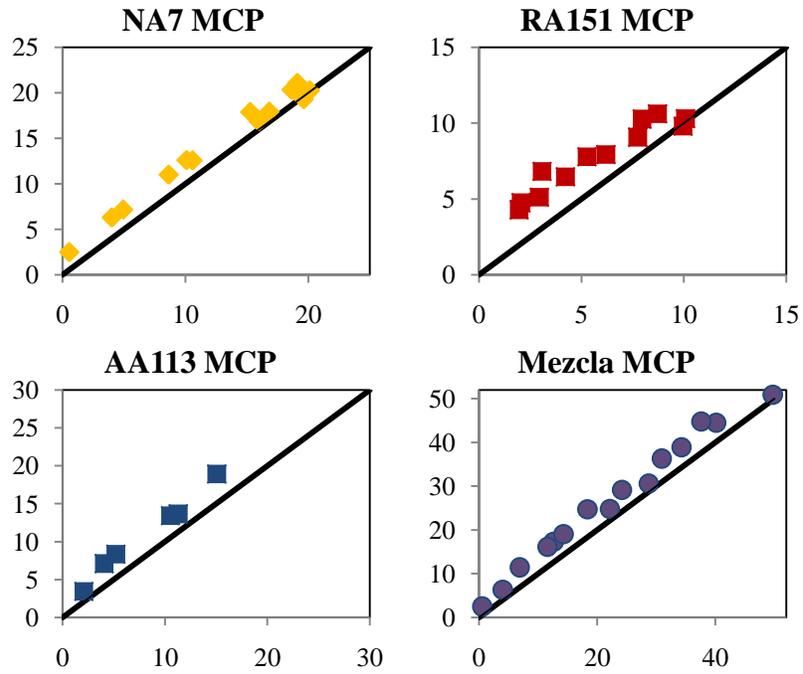


Figura 6-8 Concentraciones encontradas por MCP en una mezcla sometida a un proceso foto-Fenton, rango personalizado para cada colorante