



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN
SECUENCIAL (SIA) PARA LA DETERMINACIÓN DE FORMALDEHÍDO
EN AGUA POTABLE.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

GABRIELA NÁJERA ESTEBANJUAN



MÉXICO, D.F.

2016



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: **Profesor: FRANCISCO ROJO CALLEJAS**

VOCAL: **Profesor: IRMA CRUZ GAVILÁN GARCÍA**

SECRETARIO: **Profesor: MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS**

1er. SUPLENTE: **Profesor: SILVIA CITLALLI GAMA GONZÁLEZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: MARÍA ANTONIETA PORTILLA ROSSIER**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 211 DE MÉTODO DE FLUJO CONTINUO, EDIFICIO F, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS

SUSTENTANTE:

GABRIELA NÁJERA ESTEBANJUAN

Símbolos y abreviaturas

2,4-DNFH	2,4-dinitrofenilhidrazina
ANOVA	Análisis de Varianza, por sus siglas en inglés
B	Acetato de amonio
CAS	Chemical Abstracts Service
CENAM	Centro Nacional de Metrología
CIIC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
CPAC	Centro de Análisis y Control de Procesos, por sus siglas en inglés
CRETIB	Corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable, biológico-infeccioso
CV	Coefficiente de Variación de Pearson
DSEO	Dosis Sin Efecto Observado
F	Formaldehído, muestra
FIA	Análisis por Inyección en Flujo, por sus siglas en inglés
H ₀	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alterna
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LMP	Límite Máximo Permisible
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona
MRC	Material de Referencia Certificado
P	2,4-pentanodiona
rmp	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación Estándar Relativa, por sus siglas en inglés
s	Desviación estándar
s ²	Varianza
SIA	Análisis por Inyección Secuencial, por sus siglas en inglés
α	Nivel de significancia

λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
u	Incertidumbre estándar
u	Incertidumbre estándar combinada
U	Incertidumbre expandida

ÍNDICE

RESUMEN	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS	12
INTRODUCCIÓN.....	13
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 Formaldehído.	15
1.1.1 Generalidades.....	15
1.1.2 Métodos para determinar formaldehído.	15
1.1.3 Formaldehído en agua potable.	19
1.1.4 Cuantificación de formaldehído en agua potable.	20
1.2 Análisis por inyección secuencial (SIA).	22
1.2.1 Características del análisis por inyección secuencial.....	23
1.2.2 Componentes principales de un sistema SIA.	25
1.2.3 Fundamento del análisis por inyección secuencial.	26
1.2.4 Fluorescencia.....	28
1.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS.....	31
1.3.1 Parámetros de desempeño.	33
1.3.2 Estadística.....	40
1.3.3 Estadísticos.	41
2. METODOLOGÍA	47
2.1 Materiales y reactivos.	47
2.1.1 Instrumentación.	47
2.1.2 Reactivos y disoluciones.....	47
2.1.3 Muestras.	48
2.2 Procedimiento.	49
2.2.1 Configuración SIA.	49
2.2.2 Linealidad y sensibilidad.....	50

2.2.3 Límites de detección y cuantificación.	51
2.2.4 Precisión (Reproducibilidad y repetibilidad).....	52
2.2.5 Selectividad.....	52
2.2.6 Exactitud.	53
2.2.7 Veracidad.....	54
2.2.9 Estimación de la incertidumbre.	55
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
3.1 Configuración SIA.....	56
3.1.1 Caudal.....	56
3.1.2 Orden de aspiración.	57
3.2 Linealidad y sensibilidad.....	58
3.2.1 Linealidad.	58
3.2.2 Sensibilidad.....	60
3.3 Límites de detección y de cuantificación.	65
3.4 Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio y repetibilidad).	65
3.5 Selectividad.....	66
3.6 Exactitud.....	72
3.7 Veracidad.....	75
3.7.1 Análisis de muestras y recobro.	75
3.7.2 Sesgo.....	78
3.8 Estimación de la incertidumbre.	79
3.8.1 Incertidumbre de la ecuación de la recta.....	80
3.8.2 Incertidumbre asociada a las disoluciones de formaldehído: disolución madre y estándares.	81
4. CONCLUSIONES	84
REFERENCIAS	85
ANEXOS	88
Anexo I. Valoración de disolución madre de formaldehído (NOM 201- SSA1-2002)	88
Anexo II. Certificado de análisis del MRC de formaldehído.....	89

Anexo III. Curvas de calibración 90

Anexo IV. Tabla I Valores críticos de F para un contraste de dos colas.
..... 91

Anexo V. Incertidumbre de la **CHCOH** de la disolución madre. 92

Anexo VI. Tratamiento de residuos..... 93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Reacción entre formaldehído y metona.	18
Figura 2	Esquema general de la reacción de Hantzsch.	21
Figura 3	Intermediarios en la reacción de Hantzsch.	22
Figura 4	Componentes de un sistema SIA.	26
Figura 5	Dispersión en SIA.	27
Figura 6	Fenómenos de transporte.	28
Figura 7	Fenómeno de fluorescencia.	29
Figura 8	Elección, desarrollo y evaluación de métodos.	32
Figura 9	Configuración SIA empleada.	50
Figura 10	a) Señal a 0.8 mL/min y b) señal a 0.5 mL/min con una concentración de 1.00 mg/L de formaldehído.	57
Figura 11	Intensidad de fluorescencia del blanco usando los dos ordenes de aspiración (F: formaldehído, B: acetato de amonio, P: 2,4-pentanodiona).....	58
Figura 12	Curvas de calibración de formaldehído usando el orden de aspiración FBP.....	60
Figura 13	Intervalos lineales obtenidos usando el orden de aspiración FBPF.	61
Figura 14	Curva de calibración promedio.	62
Figura 15	Residuos de la curva de calibración.	63
Figura 16	Diagrama de Ishikawa para el método.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Propiedades físicas y químicas de formaldehído.	16
Tabla 2 Características de un sistema SIA	25
Tabla 3 Pruebas <i>t-student</i>	44
Tabla 4 Resumen de sumas de cuadrados y grados de libertad para ANOVA.....	46
Tabla 5 Secuencia final de aspiración de reactivos y muestras para determinar formaldehído.	50
Tabla 6 Volúmenes para la curva de calibración a partir de una disolución madre.....	51
Tabla 7 Volúmenes tomados a partir de una disolución madre de 10.00 mg/L.....	53
Tabla 8 Condiciones iniciales para determinar formaldehído siguiendo la secuencia de aspiración F-B-P.	56
Tabla 9 Condiciones óptimas del método SIA.	59
Tabla 10 Análisis de la distancia de Cook.....	63
Tabla 11 Parámetros de la recta global.	65
Tabla 12 Resultados del análisis de una disolución 0.6 mg/L de formaldehído.....	66
Tabla 13 ANOVA para repetibilidad y reproducibilidad.	66
Tabla 14 Análisis de interferencia en diferentes concentraciones y porcentaje de error asociado.....	67
Tabla 15 Tipo de varianza que presentan las interferencias analizadas.	69
Tabla 16 Prueba de significancia para interferencias.	71
Tabla 17 Exactitud del método con diferentes ecuaciones de recta. ...	73
Tabla 18 Prueba de significancia para exactitud.	74
Tabla 19 Determinación de formaldehído en muestras.	75
Tabla 20 Porcentaje de recuperación para las muestras analizadas. ...	76
Tabla 21 Prueba de significancia porcentaje de recuperación.	77
Tabla 22 Prueba de significancia para sesgo.	79
Tabla 23 Incertidumbre de la ecuación de la recta.....	81
Tabla 24 Incertidumbre de materiales e instrumentos usados.	81
Tabla 25 Incertidumbre para el punto 0.05 mg/L de la curva.	82
Tabla 26 Incertidumbre asociada a cada punto de la curva de calibración.	83

RESUMEN

El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) ha clasificado al formaldehído como probablemente cancerígeno para el ser humano, sin embargo las pruebas indican, en su conjunto, que tal sustancia no es cancerígeno por vía oral, por lo que se ha establecido una concentración tolerable de 2.60 mg/L por esta vía, basándose en una Dosis Sin Efecto Observado (DSEO) de 260 mg/L y se tiene un Límite Máximo Permisible (LMP) de 0.9 mg/L en aguas potables.

En este trabajo se desarrolló un método de Análisis por Inyección Secuencial (SIA) para determinar formaldehído en agua potable. Para evaluar el método se estudiaron diferentes parámetros de desempeño como: intervalo lineal, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), precisión, exactitud, incertidumbre, interferencias, etc.

El intervalo lineal encontrado fue de 0.05 a 1.00 mg/L con un LD de 0.01 mg/L. La precisión del método, expresada como repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, fue 6.73% y 6.76%, respectivamente, y los porcentajes de recobro estuvieron entre 85 % y 125 %.

Otro aspecto evaluado fue la interferencia de especies químicas (inorgánicas y orgánicas) que posiblemente se pudieran encontrar en agua potable; encontrándose que carbonato de sodio y ácido acético interfieren en la determinación de HCOH entre 2.66 % y 10.18 % de error.

Para evaluar la exactitud se utilizó un estándar certificado de formaldehído obteniéndose valores entre 92.89 % y 98.68 % para concentraciones entre 0.1 mg/L y 0.8 mg/L. Finalmente se realizó la estimación de la incertidumbre asociada a la cuantificación de formaldehído, la cual fue 0.07 mg/L con un factor de cobertura 2.

Los resultados mostraron la confiabilidad del método por lo que puede proponerse como una alternativa, sencilla y de bajo costo, en comparación con el referenciado en la NOM-201-SSA1-2002. Productos y Servicios. Agua y Hielo Para Consumo Humano, Envasados Y A Granel. Especificaciones Sanitarias. Esto debido a que con el procedimiento seguido es posible determinar concentraciones menores a las establecidas por la Norma produciendo menos residuos y con la posibilidad de automatizarlo.

HIPÓTESIS

Por las características que presenta el análisis por inyección secuencial será posible desarrollar un método que permita la cuantificación de formaldehído en agua potable en concentraciones menores a 1.00 mg/L de manera precisa y confiable.

OBJETIVOS

General:

Desarrollar, optimizar y demostrar la validez de un método de Análisis por Inyección Secuencial (SIA) para la determinación de formaldehído en agua potable.

Particulares:

Optimizar factores químicos (concentración de reactivos, pH, etc) e hidrodinámicos del sistema SIA, como caudal, orden de aspiración, tiempo de aspiración de reactivos, etc; a partir de una configuración previa.

Determinar los parámetros de desempeño del método SIA propuesto como: límite de detección, límite de cuantificación, intervalo lineal del método, sensibilidad, incertidumbre, exactitud, precisión y recobro.

Evaluar la interferencia (selectividad) de diferentes especies químicas en la determinación de formaldehído.

Mediante pruebas estadísticas (*t*-student y F de Fisher) establecer criterios de aceptación para los parámetros de desempeño determinados.

Cuantificar formaldehído en muestras de agua potable.

INTRODUCCIÓN

El formaldehído puede estar presente en agua potable como resultado de las actividades humanas siendo las fuentes principales la descarga de desechos industriales y procesos de tratamiento de aguas con ozonización y cloración. Se han detectado concentraciones de hasta 30 $\mu\text{g/L}$ en agua de consumo tratada con ozono (World Health Organization, 2005).

Las propiedades fisicoquímicas del formaldehído sugieren que es improbable que se volatilice desde el agua debido a su valor de constante de Henry, que está relacionada con la presión parcial que ejerce el gas en la disolución, por lo que cabe esperar que la exposición por inhalación sea baja; sin embargo se ha demostrado que ratas y ratones expuestos al formaldehído por inhalación mostraron un aumento de la incidencia de carcinomas de las fosas nasales y la ingestión de formaldehído en agua potable durante un prolongado tiempo produjo irritación estomacal crónica en las ratas. En un estudio se observó la aparición de papilomas en el estómago asociados a una irritación intensa de los tejidos (World Health Organization, 2005).

Con el fin de determinar concentraciones bajas de formaldehído, se han propuesto varios métodos analíticos para su determinación como: cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y cromatografía de intercambio iónico, que aunque muestran una buena sensibilidad son métodos lentos y costosos.

El Análisis por Inyección Secuencial (SIA), basado en la difusión de la muestra a lo largo de una tubería, proporciona resultados confiables y reproducibles, además reduce el tiempo de análisis, el gasto de reactivos y la generación de residuos (C. E. Lenehan, 2002; S. D. Kolev, 2008).

En la literatura se encuentran plasmados diferentes trabajos para la determinación de formaldehído en agua usando métodos de Análisis por Inyección en Flujo (FIA, por sus siglas en inglés) (Q. Li, 2007), así como una variedad de reacciones empleadas, preconcentración del analito, derivatización, inmovilización, etc. Sin embargo no existe evidencia de algún método SIA que permita determinar formaldehído utilizando una reacción multicomponentes, que se lleve a cabo en una etapa. Así mismo, empleando pequeñas cantidades de reactivos, con baja generación de residuos y reduciendo el tiempo de análisis, permitiendo una mayor cantidad de muestras analizadas por hora con resultados confiables.

Es de vital importancia tener la certeza que al realizar una medición analítica con un determinado método el resultado obtenido sea confiable, es por esto que es necesario comprobar mediante evidencia objetiva la validez del método empleado. Para esto existen documentos y guías para la validación de métodos que dan información acerca de qué y cómo deben ser evaluados ciertos parámetros de desempeño.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Formaldehído.

1.1.1 Generalidades.

El compuesto orgánico, formaldehído (CAS: 50-0-0) es un gas incoloro a temperatura ambiente, altamente inflamable que se vende comercialmente como disolución acuosa (30-50% en peso). También es conocido como metanal, óxido de metileno, oximetileno, metilaldehído, oxometano o aldehído fórmico [**Tabla 1**] (Q. Li, 2007; World Health Organization, 2005).

El formaldehído es fácilmente soluble en agua, alcoholes y otros solventes polares. En disolución acuosa se hidrata y polimeriza; puede existir como metilenglicol y polioximetileno. Soluciones con altas concentraciones de HCOH (mayores a 30 %) llegan a ser turbias debido al polímero precipitado. Al ser un aldehído reactivo puede tener reacciones de asociación; se asocia con agua para formar una gran variedad de especies químicas con propiedades diferentes a las que presentaría si se encontrara como monomolécula. Estas propiedades prevalecen en altas concentraciones de formaldehído por lo que en condiciones de dilución no son relevantes (World Health Organization, 2005).



1.1.2 Métodos para determinar formaldehído.

Existen diversos métodos para la determinación de formaldehído debido a su alta reactividad, sus derivados característicos y la disminución de su actividad en soluciones alcalinas. Los cuales pueden dividirse en 4 grupos: volumétricos, gravimétricos, colorimétricos e instrumentales.

Tabla 1 Propiedades físicas y químicas de formaldehído.

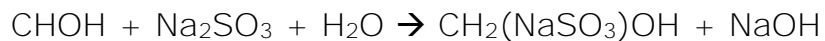
Propiedad	Intervalo de valores reportados
Masa molecular [g/mol]	30.03
Punto de fusión [°C]	92 a 118
Punto de ebullición [°C, a 101.3 kPa]	19 a 21
Presión de vapor (calculada) [Pa, a 25 °C]	516000
Solubilidad en agua [g/L, a 25 °C]	400 a 550
Constante de Henry [Pa•m ³ /mol a 25 °C]	2.2x10 ⁻² a 3.4x10 ⁻²
Coefficiente de partición octanol/agua [log k _{ow}]	0.35 a 0.75
Coefficiente de partición carbón/agua [log k _{oc}]	0.70 a 1.57
Factor de conversión	1 ppm en aire=1.2 mg/m ³

Fuente: World Health Organization, 2002

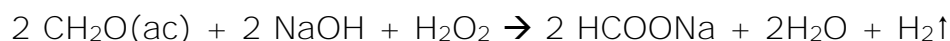
Los métodos volumétricos y gravimétricos, generalmente, son usados para la determinación de grandes concentraciones de formaldehído mientras que los colorimétricos e instrumentales son más apropiados para bajas concentraciones y cantidades traza de formaldehído (J. W. Weaver, 1984).

Métodos volumétricos

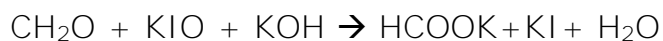
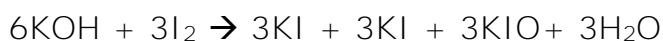
Método sulfito de sodio: el formaldehído reacciona con sulfito de sodio para formar el producto de adición formaldehído-bisulfito y liberar un mol de hidróxido de sodio. Este método es rápido, simple y preciso, por lo que se usa como alternativa al método de peróxido de hidrógeno (J. W. Weaver, 1984).



Método peróxido alcalino: por mucho tiempo fue considerado como el método estándar para analizar formaldehído comercial; sin embargo, éste requiere más tiempo que el anterior, está sujeto a más error por presencia de impurezas y es menos específico. Aquí la sustancia de interés es oxidada a ácido fórmico en presencia de un exceso de hidróxido de sodio y la cantidad requerida para neutralizar el ácido corresponde al contenido de formaldehído (J. W. Weaver, 1984).



Método yodométrico: se basa en la oxidación de formaldehído con hipoyodito formado cuando se agrega hidróxido de potasio a una disolución de formaldehído, a la que se adiciona una cantidad conocida de un estándar de yodo. La cantidad de yodo consumida es determinada por titulación indirecta (J. W. Weaver, 1984).



Métodos gravimétricos

Método de metona: está basado en la condensación de dos moles de metona y formaldehído para formar el derivado dimetónico. El método es simple y preciso y es selectivo a aldehídos (J. W. Weaver, 1984) [**Figura 1**].

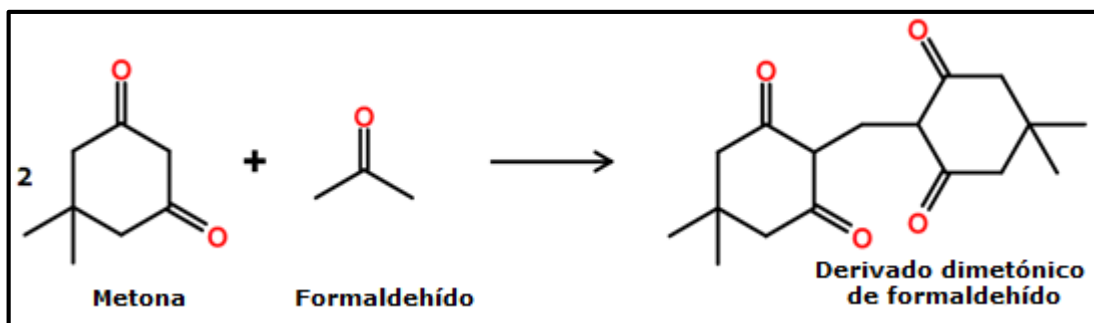


Figura 1 Reacción entre formaldehído y metona.

Métodos colorimétricos

Método reactivo de Schiff's: en este método el reactivo de Schiff's da un color específico azul-violeta con formaldehído cuando se usa con ácidos fuertes. La prueba es altamente específica y sensible para formaldehído en presencia de aldehídos alifáticos con peso molecular superior, aunque acroleína y ácido glioxálico son interferencias para este método. La intensidad del color es dependiente del tiempo y la temperatura. Un inconveniente que presenta este método es que el reactivo de Schiff's no sigue la Ley de Beer (J. W. Weaver, 1984).

Método MBTH: el formaldehído reacciona con clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona bajo condiciones de oxidación para producir un intenso color azul del colorante catiónico que absorbe a 628 nm. La máxima intensidad de color se obtiene después de 14 minutos a temperatura ambiente y el color es estable por 17 horas (J. W. Weaver, 1984).

Métodos instrumentales

Entre los más citados en la bibliografía se encuentran la cromatografía de líquidos y la cromatografía de gases. Se usa principalmente el derivado de formaldehído con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH); una disolución de formaldehído es tratada con una disolución ligeramente acidificada de

2,4-dinitrofenilhidrazina, eluida con acetonitrilo y analizada por HPLC. El derivado es detectado por espectroscopía UV a 360 nm (D. C. Harris, 2006).

Otros métodos instrumentales se han desarrollado y reportado para la determinación de formaldehído; como el análisis por inyección en flujo (FIA) (Q. Li, 2007). Éste se basa en una reacción de condensación entre formaldehído y acetoacetanilina, formando un compuesto de color amarillo (Reacción de Hantzsch) que es detectado por fluorescencia.

1.1.3 Formaldehído en agua potable.

El formaldehído llega al medio ambiente a través de fuentes naturales y de fuentes humanas directas, tales como la quema de combustibles por automotores e industrias. También se produce por la oxidación de compuestos orgánicos naturales y antropogénicos presentes en el aire. En agua potable, el formaldehído se encuentra –principalmente- debido a la oxidación de materia orgánica durante procesos de ozonización o cloración. También puede aparecer por lixiviación de botellas de poliacetal cuando la capa protectora se rompe (World Health Organization, 2005).



La concentración de formaldehído en agua potable es dependiente del cuidado y calidad que se tenga en los pasos de purificación así como del agua que se use para tal fin y de las materias empleadas. La ozonización puede aumentar ligeramente los niveles de formaldehído; sin embargo etapas posteriores pueden acentuar estas concentraciones (World Health Organization, 2002).

Las tuberías usadas para el abastecimiento de agua potable, se encuentran recubiertas por una capa que evita el contacto de la resina de poliacetal con el agua; sin embargo, debido al uso rutinario en las líneas

de alimentación se ocasiona una ruptura o fractura del revestimiento y el agua puede entrar en contacto con la resina directamente. Las concentraciones resultantes de formaldehído en el agua son determinadas en gran medida por el tiempo de residencia del agua en las tuberías.

En un estudio realizado en Estados Unidos se estimó que en condiciones normales de uso de agua en viviendas ocupadas, la concentración resultante de formaldehído en el agua sería de alrededor de 20 µg/L. En general, se espera que las concentraciones de formaldehído en el agua potable sea inferior a 100 µg/L (World Health Organization, 2002).

1.1.4 Cuantificación de formaldehído en agua potable.

1.1.4.1 Derivatización con 2,4-DNFH.

En Octubre de 2002 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002. Productos y Servicios. Agua y Hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias; que establece las disposiciones y especificaciones sanitarias que deben cumplir el agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel, excepto para la que es consumida directamente de los sistemas de abastecimiento.

En esta se encuentran los métodos que deben aplicarse para la determinación de diferentes especies químicas en agua potable, entre ellas formaldehído.

El formaldehído presente en la muestra es derivatizado con 2,4-dinitrofenilhidrazina en medio ácido y extraído con cloroformo; después el solvente se cambia por metanol y el producto es separado. Finalmente se cuantifica usando cromatografía de líquidos con fase reversa y detección UV a 365 nm (NOM-201-SSA1-2002, 2002).

1.1.4.2 Reacción de Hantzsch.

La reacción de Hantzsch es una de las más antiguas y efectivas reacciones multicomponentes que involucra a un aldehído. A pesar de la variedad de rutas de reacción éste es un proceso muy selectivo para la derivatización de formaldehído con amonio: dos equivalentes de 2,4-pentanodiona (compuesto dicarbonílico) para formar el heterociclo 2,6-dimetil-3,5-diacetil-1,4-dihidropiridina [Figura 2] (V. G. Santos, 2014). La reacción se lleva a cabo a través de una condensación *in situ* formando un malonato alquilideno y un derivado enaminoéster, seguido de una ciclodeshidratación para así obtener un heterociclo simétrico [Figura 3] (R. V. A. Orru, 2010).

El producto de condensación presenta características de sistemas aromáticos conjugados favoreciendo el paso de electrones a estados de mayor energía, así al regresar al estado basal esta energía se libera en forma de fotones produciendo el fenómeno de fluorescencia, por lo tanto este derivado puede ser cuantificado por fluorescencia.

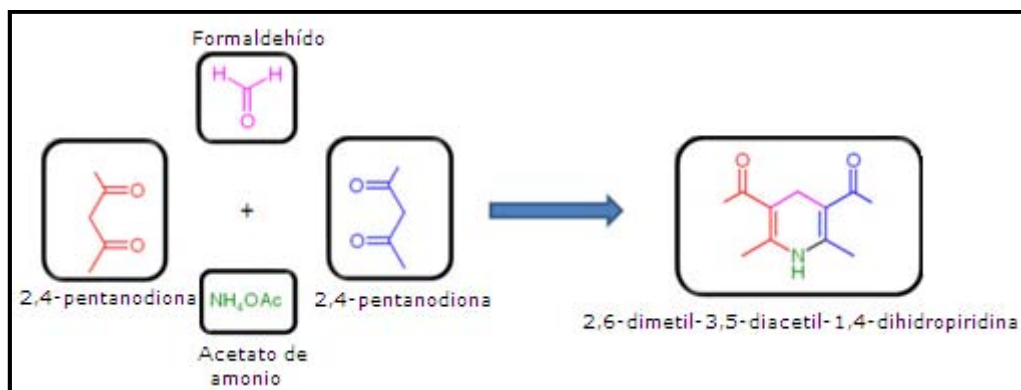


Figura 2 Esquema general de la reacción de Hantzsch.

Fuente: Modificado de C.G. Evans, 2009

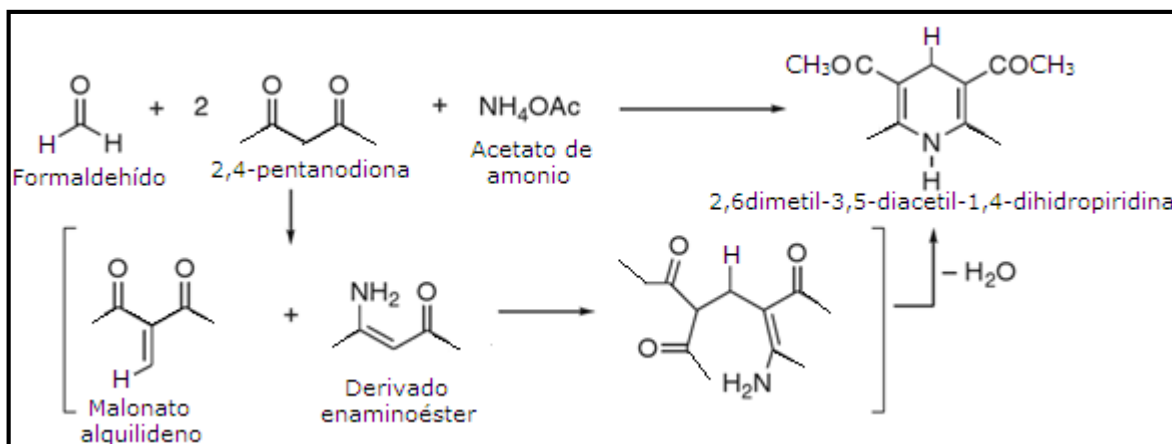


Figura 3 Intermediarios en la reacción de Hantzsch.

Fuente: Modificado de R. V. A. Orru, 2010

1.2 Análisis por inyección secuencial (SIA).

El análisis por inyección secuencial se desarrolló en 1989 en el Centro de Análisis y Control de Procesos (CPAC) de la Universidad de Washington (C. E. Lenehan, 2002). Éste se basa en la aspiración secuencial de zonas de muestra y reactivos adecuados, para su posterior propulsión hacia el detector, donde se cuantifica el producto de reacción (B. Ramírez, 2007).

SIA es parte de la familia de las técnicas FIA (Análisis por Inyección en Flujo) y se basa en los mismos principios: inyección de muestra y reactivos, dispersión controlada y una sincronización reproducible. Por lo tanto el éxito de SIA depende del control de dos procesos que ocurren simultáneamente. Mientras la muestra inyectada se mueve a través del canal, ocurre el proceso físico de dispersión de la muestra y las zonas de reactivos, también sucede el proceso químico de formación de especies químicas, que serán detectadas (S. D. Kolev, 2008).

La diferencia entre FIA y SIA está en la configuración para que las soluciones sean introducidas al sistema, en continuo o secuencialmente. En SIA la muestra y los reactivos son aspirados secuencialmente hacia la válvula de selección y posteriormente mezclados revirtiendo el flujo. La

dispersión es controlada por un flujo programado. La inversión del flujo y la repentina aceleración del mismo son usados para favorecer la mezcla y para acelerar el lavado del sistema, mientras que la interrupción del flujo es usado para controlar el tiempo de reacción.

La técnica SIA ofrece una gran variedad de ventajas:

1. Utiliza un único flujo en el canal incluso con sistemas multicomponentes. En FIA, se requieren canales de flujo adicionales si se utiliza más de un reactivo.
2. El consumo de muestras y reactivos disminuyen considerablemente (orden de microlitros).
3. La operación de un solo canal permite el uso de las mismas cantidades para su implementación en un vasto intervalo de determinaciones
4. La válvula de selección proporciona un medio conveniente para realizar una calibración automática.
5. Mediciones precisas de las zonas de muestra y reactivo requieren control por ordenador y, por tanto, la automatización es esencial (A. Economou & et.al, 2005).

1.2.1 Características del análisis por inyección secuencial.

Los parámetros operacionales para SIA son: volumen aspirado de cada solución, caudal y el tiempo en que el flujo es detenido o cambia de dirección (M. Trojanowicz, 2008). Las principales características son:

1. El flujo es continuo y está programado.
2. La muestra y los reactivos son inyectados (aspirados) en un orden y con volúmenes predeterminados. Este paso es posible con el uso de una válvula de selección. Inicialmente se aspiran estas zonas

hacia el bucle de espera (holding coil) y posteriormente el bolo es enviado al detector para cuantificar el producto de interés.

3. Dispersión controlada de la muestra y los reactivos. Se produce una mezcla incompleta pero reproducible que da lugar a un gradiente de concentración variable a lo largo del sistema. La dispersión ocurre desde el momento en que las zonas de reactivos y muestra son aspiradas al reactor de espera y posteriormente se cambia la dirección del flujo para dirigir el paquete de reactivos y muestra hacia la válvula de selección y el detector. Este proceso forma un gradiente de concentraciones bien definido de reactivos, muestra y producto. La manipulación de la dispersión se realiza mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
4. Sincronización reproducible. Para lograr la reproducibilidad de las mediciones es necesario alcanzar la repetibilidad de todos los eventos de un ciclo de medición, incluyendo la secuencia de aspiración de muestras y reactivos hacia el reactor o tiempo de flujo detenido en su caso.
5. En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio (físico y químico).

En la **Tabla 2** se muestran las características y valores de los principales parámetros de SIA.

Tabla 2 Características de un sistema SIA.

Volumen de muestra inyectada	10-150 μ L
Tiempo de respuesta	3-60 s
Diámetro de tubería	0.6-0.8 mm
Condiciones de detección	No es necesario llegar al equilibrio
Rendimiento	Cerca de 70 inyecciones por hora
Precisión	1-2%
Consumo de reactivos	Muy bajo
Ciclo de lavado	Innecesario
Métodos cinéticos	Posible
Titulación	Posible
Tipo de respuesta	Pico
Parámetro medido	Altura de pico o área

Fuente: Tomada de V. Cerda, 2014

1.2.2 Componentes principales de un sistema SIA.

Los elementos principales con los que debe contar un sistema de análisis por inyección secuencial se enumeran a continuación y se muestran en la **Figura 4:**

Portador: éste será la disolución que genere el flujo donde la muestra y los reactivos serán inyectados secuencialmente; cumple con la función de favorecer la dispersión de muestra y de reactivos (B. Ramírez, 2007).

Bomba peristáltica: es la unidad de propulsión de flujo hacia dos direcciones, en ésta se programa el flujo del portador. Consiste en una polea de motor con rodillos colocados periféricamente y una leva (o banda) de compresión que es presionada contra los rodillos (B. Karlberg, 1989).

Bucle de espera: también es conocido como *holding coil*, se utiliza para aislar los canales de la válvula de selección de la bomba, esto con el fin de evitar que la muestra y los reactivos contaminen el portador. Favorece

la dispersión de las zonas por traslape y el inicio de la reacción de interés (S. D. Kolev, 2008; B. Ramírez, 2007).

Válvula de selección: a través de la válvula son exactamente medidos los volúmenes de portador, reactivos y muestra que posteriormente son introducidos en el reactor de reacción (M. Trojanowicz, 2008).

Reactor de reacción: es aquí donde se lleva a cabo la reacción en estudio debido al traslape de zonas. La longitud de este es de vital importancia, para dar las características del sistema SIA; además de que interactúa con otras características como diámetro interno de la tubería, geometría del sistema, caudal y temperatura (D. Betteridge, 1987).

Detector: Debe tener un programa que permita observar y almacenar el esquema y datos de la señal transitoria durante el análisis.

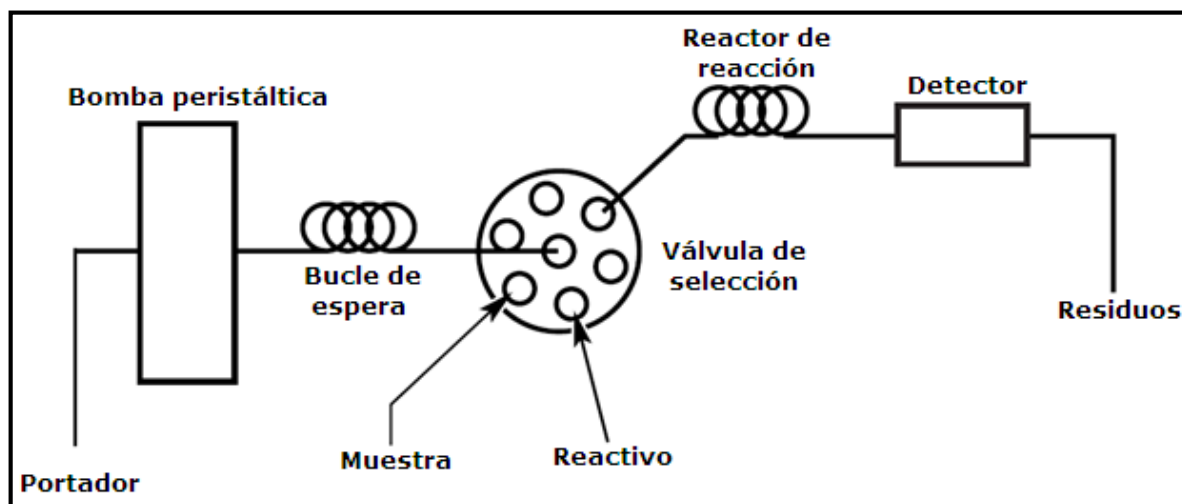


Figura 4 Componentes de un sistema SIA.

1.2.3 Fundamento del análisis por inyección secuencial.

El principio del análisis por inyección secuencial fue dilucidado por Ruzicka y Marshall, se basa en una señal analítica medida en flujo a través de un

detector; en el curso del flujo una serie de segmentos líquidos (muestras y reactivos) son inyectados. Por consiguiente es una típica medición del flujo con una marcada reducción en el consumo de reactivos en comparación con otras técnicas de flujo como el análisis por inyección en flujo, FIA (M. Trojanowicz, 2000).

SIA trabaja bajo un flujo de régimen laminar, mostrando la típica forma asimétrica de pico. En la **Figura 5** puede observarse como la difusión en un sistema SIA conduce al traslape de la muestra y reactivos formando así el producto de reacción para ser detectado (Cerde, Ferrer, Avivar, & Cerda, 2014).

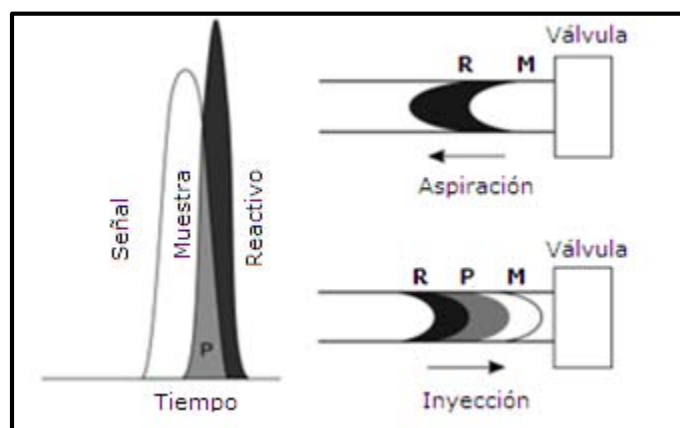


Figura 5 Dispersión en SIA (R: reactivo, M: muestra, P: producto.)

Fuente: Tomada de V. Cerda, 2014

Es claro que la fortaleza de esta técnica analítica se basa en el control de la difusión de la mezcla. Esta necesidad se logra a partir del conocimiento de los fenómenos de transporte y los factores que los afectan (M. Trojanowicz, 2008).

En un sistema SIA después de aspirar la muestra y los reactivos, las zonas de estos tienen un perfil de concentración rectangular. Al ir circulando por la tubería se lleva a cabo la dispersión. Ésta depende de la convección asociada al flujo laminar, en el que el centro del fluido avanza más

rápidamente que el líquido adyacente a las paredes, lo que da lugar a una zona con perfil parabólico mientras se desplaza. También depende del ensanchamiento en las zonas por difusión.

Pueden producirse dos tipos de difusión: radial o perpendicular a la dirección del flujo y longitudinal (axial) o paralela al flujo [**Figura 6**]. Se ha demostrado que la difusión longitudinal en un tubo estrecho no es significativa por el contrario la difusión radial siempre es importante (B. Ramírez, 2007).

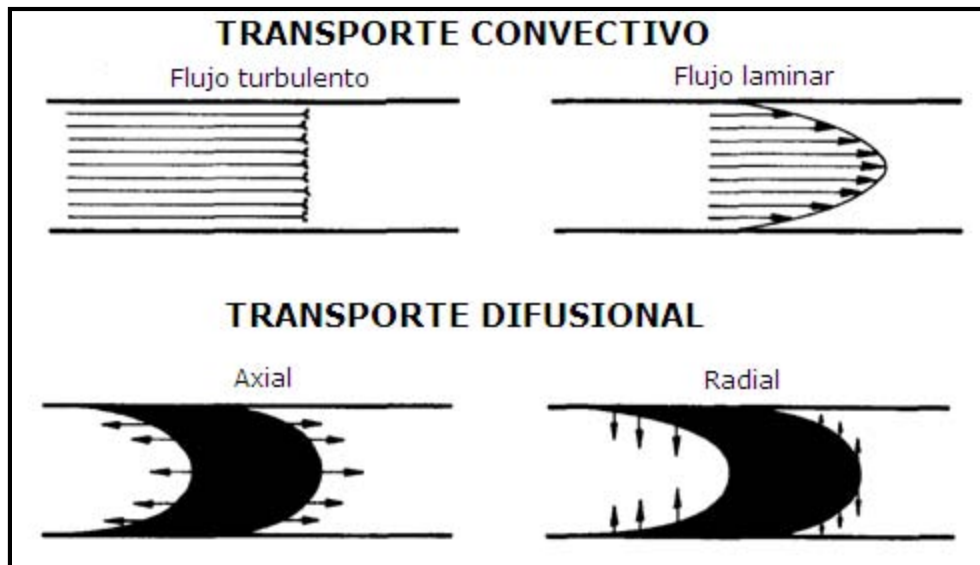


Figura 6 Fenómenos de transporte.
Fuente: Tomado de D. Betteridge, 1987

1.2.4 Fluorescencia.

La luminiscencia es la emisión de luz de una sustancia y es debida a estados electrónicamente excitados. La luminiscencia es dividida en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado (J. R. Lakowicz, 2013).

La fluorescencia es un proceso de emisión de luz basado en la excitación de átomos o moléculas por absorción de un haz de radiación electromagnética. Las especies son excitadas a un estado sencillo y se relajan al estado fundamental, devolviendo su exceso de energía como fotones [Figura 7]; compete con procesos de desactivación no radiantes como conversión interna, transferencia de energía a un desactivador o transición al estado triplete. Una característica muy importante de esta técnica es su alta sensibilidad, con frecuencia es de uno a tres órdenes de magnitud mejor que la espectroscopía de absorción. Sin embargo, se aplica menos debido a la cantidad limitada de compuestos que presentan fluorescencia.

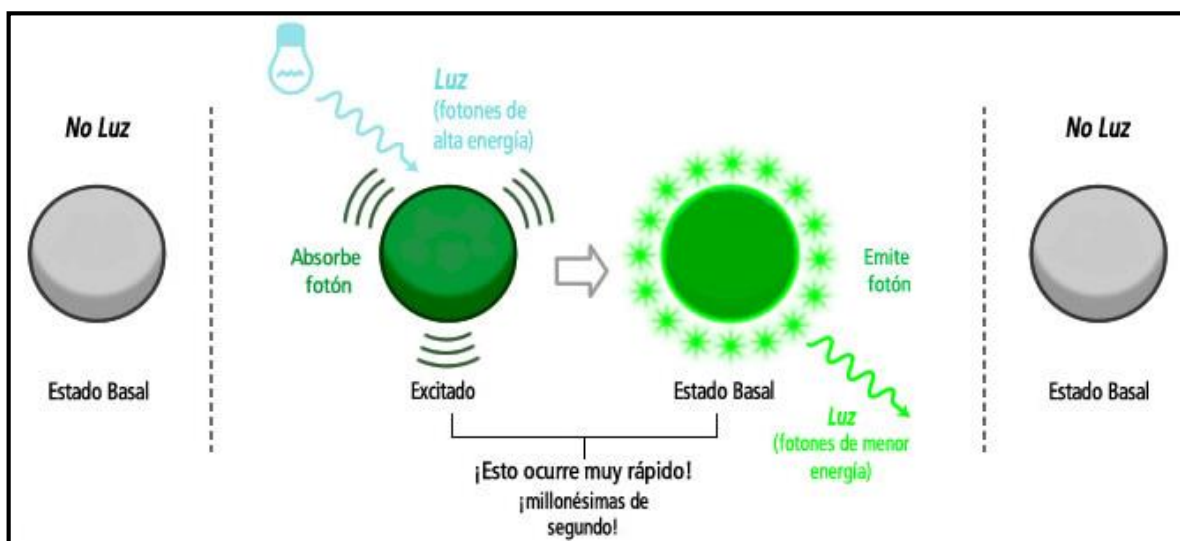


Figura 7 Fenómeno de fluorescencia.
Fuente: Internet (Ciencillamente Hablando, 2015)

Algunos factores que afectan a la fluorescencia son:

- Rendimiento cuántico: se refiere a la relación entre la cantidad de moléculas que fluorescen y el número total de moléculas excitadas.
- Estructura: la fluorescencia generalmente se presenta en moléculas aromáticas, estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilos o

estructuras con dobles enlaces conjugados en los cuales se pueden llevar a cabo transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de baja energía

- Rigidez estructural: por empirismo se ha concluido que moléculas con mayor rigidez favorecen la fluorescencia. Si la molécula no fuera rígida, la velocidad de conversión de energía aumentaría y se anularía la fluorescencia.
- Temperatura y disolvente: al aumentar la temperatura la frecuencia de colisiones entre las moléculas es mayor y existe mayor probabilidad de desactivación por conversión externa de la energía. Por otro lado si la viscosidad del disolvente disminuye también se presenta el mismo problema.
- Efecto del pH: la fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto.
- Efecto de la concentración: a concentraciones altas la radiación fluorescente puede ser reabsorbida por otras moléculas de la muestra antes de que ésta sea detectada. En el caso de disoluciones diluidas (orden de mg/L) la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración.

En el caso de la fluorescencia, la sensibilidad de un instrumento de filtros puede o es mayor a la de un instrumento con monocromador, aunque sea menos versátil y selectivo (E. D. Olsen, 1990).

1.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS.

Con el fin de promover las buenas prácticas de laboratorio en las mediciones analíticas, se han identificado seis principios de la práctica analítica:

1. Las mediciones analíticas deben realizarse para satisfacer un requisito acordado (Objetivo definido).
2. Las mediciones analíticas deben realizarse utilizando métodos y equipos que han sido probados para asegurar que son adecuados a su propósito.
3. El personal que realiza las mediciones analíticas debe ser calificado y competente para emprender la tarea asignada y demostrar que pueden desempeñar el análisis apropiadamente.
4. Deberá existir una evaluación periódica e independiente del desempeño técnico de un laboratorio.
5. Las mediciones analíticas hechas en un laboratorio deben ser consistentes con aquellas que se realicen en cualquier otro laboratorio.
6. Las organizaciones que hacen mediciones analíticas deben tener procedimientos bien definidos de control y de aseguramiento de calidad.

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico (Centro Nacional de Metrología, 2005) y según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005; la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto [**Figura 8**] (Entidad Nacional de Acreditación, 2014).

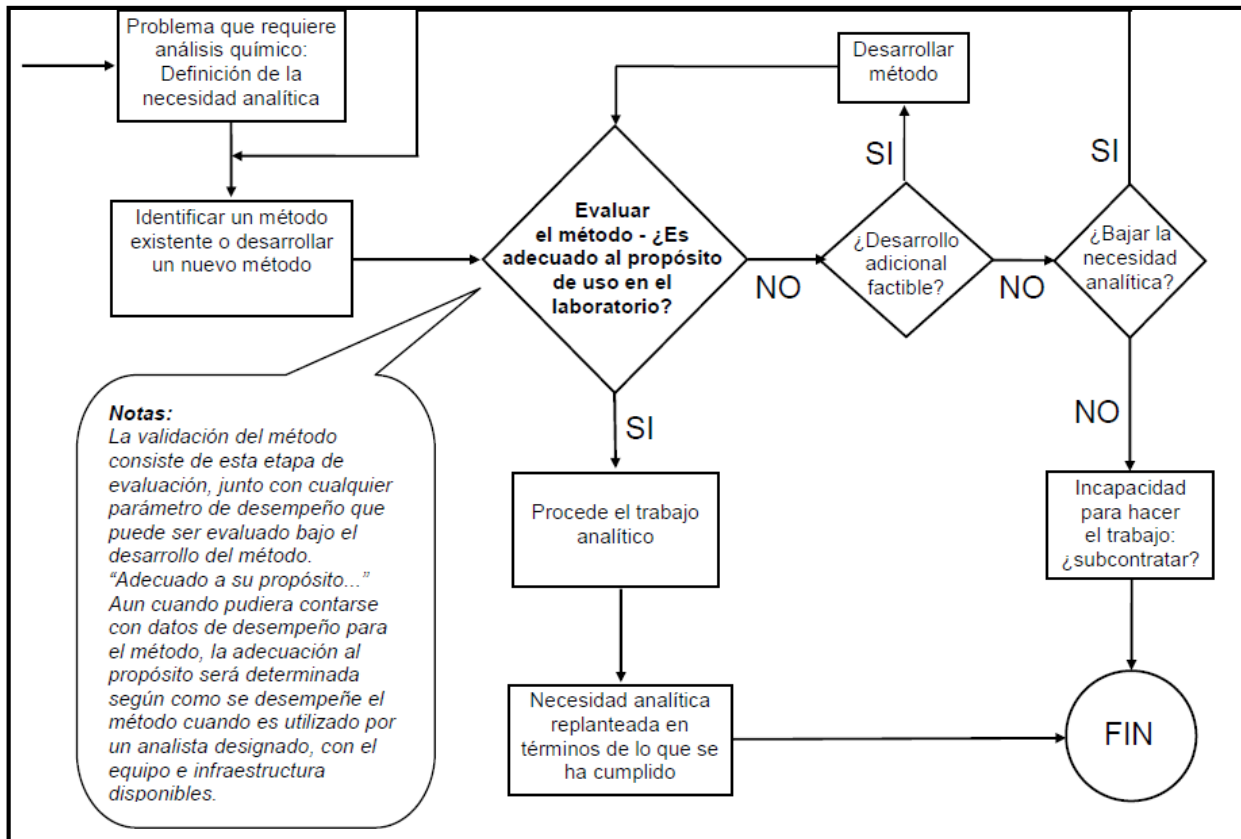


Figura 8 Elección, desarrollo y evaluación de métodos.
Fuente: Tomado de Centro Nacional de Metrología , 2005

En el proceso de validación del método está implícito que los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando equipos dentro de especificaciones, que están trabajando correctamente y que están calibrados adecuadamente. Asimismo, el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio.

Generalmente se considera que la validación del método está ligada estrechamente con el desarrollo del método. De hecho, no es posible determinar exactamente donde termina el desarrollo del método y donde empieza la validación. Por lo general, muchos de los parámetros de desempeño del método que están asociados a su validación son

evaluados, por lo menos aproximadamente, como parte del desarrollo del método (Centro Nacional de Metrología , 2005).

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico, por ejemplo:

- Un método desarrollado para un problema específico.
- Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.

1.3.1 Parámetros de desempeño.

Un parámetro de desempeño se define como un factor específico y necesario, que se evalúa en la validación de un método analítico (Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, 2011). Algunos de ellos son:

Intervalo lineal: éste define la habilidad del método para obtener resultados de la señal analítica proporcionales a la concentración del analito.

La evaluación de este parámetro también es útil para la planeación del grado de calibración que se requiere cuando el método se utiliza diariamente. La relación entre la respuesta del instrumento con la concentración no tiene que ser perfectamente lineal para que un método sea efectivo pero la curva debe ser repetible día con día (Centro Nacional de Metrología , 2005).

Sensibilidad: es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Es la pendiente del intervalo lineal y cuanto mayor es ésta, mayor es la sensibilidad del método (Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, 2011).

Cuando se ha establecido que la respuesta es lineal con respecto a la concentración y se ha determinado la intercepción de la curva de respuesta, la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en fórmulas de cuantificación. La sensibilidad algunas veces se usa para referirse al límite de detección pero este uso no se acepta generalmente (Centro Nacional de Metrología , 2005).

Límite de detección: es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas (Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, 2011).

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método. La importancia de determinar esto y los problemas implícitos surgen del hecho que la probabilidad de detección no cambia repentinamente de cero a la unidad cuando se cruza un umbral. Los problemas han sido investigados estadísticamente con detalle y se ha propuesto una gama de criterios de decisión. Surgen confusiones adicionales debido a que no existe actualmente un acuerdo universal sobre la terminología aplicada. Se recomienda citar cualquier convención que hayan utilizado al momento de establecer el límite de detección.

El límite de detección, expresado como la concentración c_L , o la cantidad q_L , se deriva de la medida más pequeña x_L , que puede detectarse con certeza razonable por un procedimiento analítico dado. El valor de x_L es dado por la ecuación **(1)**:

$$x_L = x_{bl} + ks_{bl} \quad \text{(1)}$$

Donde x_{bl} es la media de las mediciones del blanco y s_{bl} la desviación estándar de las mediciones del blanco y k es un factor numérico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado (Centro Nacional de Metrología, 2005).

Límite de cuantificación: es la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas (Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, 2011). También se define por diversas convenciones como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 o 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Así que:

$$L_Q = k_Q \sigma_Q \quad \text{(2)}$$

Donde L_Q es el límite de cuantificación, σ_Q es la desviación estándar en ese punto, y k_Q es el multiplicador cuyo recíproco es igual a la RSD seleccionada y cuantificada. El valor por omisión de k_Q propuesto por la IUPAC es de 10.

Exactitud: expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios

sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la veracidad y la precisión. Adicionalmente, una expresión cada vez más común de exactitud es la: incertidumbre de medición.

Veracidad: se define como la proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie grande de resultados de prueba y un valor de referencia aceptado.

La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina contra un valor de referencia. Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado. Los valores de referencia son idealmente trazables a patrones internacionales. Los materiales de referencia certificados por lo general se aceptan como medio de proveer valores trazables y por lo tanto, el valor de referencia es el valor certificado del Material de Referencia Certificado (MRC).

Para verificar la veracidad utilizando un material de referencia, se determina la media y la desviación estándar de una serie de réplicas de una prueba y se compara contra el valor caracterizado del material de referencia (Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, 2011).

Precisión: es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas.

La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado. La medida de la precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de la prueba. Las

mediciones cuantitativas de la precisión dependen en forma crítica de las condiciones estipuladas.

Comúnmente, la precisión se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la repetibilidad y la reproducibilidad; éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse.

Repetibilidad: grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos en intervalos cortos de tiempo.

Reproducibilidad intermedia o intralaboratorio: grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días (Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, 2011).

Recuperación o recobro: cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada cuando ésta es conducida a través del medio analítico completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en términos de porcentaje (Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, 2011).

Los métodos analíticos no siempre miden todo el analito de interés presente en la muestra. Los analitos pueden estar presentes en una variedad de formas en las muestras de las cuales no todas son de interés para el analista. El método debe entonces diseñarse para determinar

solamente una forma específica de analito. No obstante, la incapacidad de un método para determinar todo el analito presente puede reflejar un problema inherente. Es necesario evaluar la eficiencia del método para detectar todo el analito presente.

Una forma de determinar la eficiencia de extracción es agregar a una matriz porciones de prueba fortificadas y se mide la concentración del analito. Un problema adjunto a este proceso es que el analito introducido de este modo no estará tan fuertemente ligado como aquél que se encuentra naturalmente en la porción de prueba de matriz y por consiguiente, la técnica dará una impresión irrealmente alta de la eficiencia de extracción. Sin embargo, ésta es la forma más común de determinar la eficiencia de recuperación y está reconocida como una forma aceptable de hacerlo (Centro Nacional de Metrología , 2005).

El porcentaje de recuperación (% R) entre las muestras fortificadas y sin fortificar se calcula como sigue:

$$\% R = \frac{CF - CU}{CA} \times 100 \quad (3)$$

Donde *CF* es la concentración de analito medida en la muestra fortificada; *CU* es la concentración del analito en la muestra sin fortificar; *CA* es la concentración del analito adicionado en la muestra fortificada.

Sesgo: es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de referencia aceptado o conocido (Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura, 2011).

El sesgo caracteriza al error sistemático en un procedimiento analítico dado y es la desviación (positiva o negativa) de la medida de los resultados analíticos con respecto al valor verdadero (conocido o

aceptado). Puede existir uno o más componentes del error sistemático que contribuyen al sesgo. Una mayor diferencia sistemática con respecto al valor de referencia aceptado se refleja por un valor de sesgo mayor.

El sesgo del método surge de los errores sistemáticos inherentes al método cualquiera que sea el laboratorio que lo usa (Centro Nacional de Metrología , 2005).

Incertidumbre: parámetro asociado al resultado de un medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente al mensurando. Este parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación estándar o la mitad de un intervalo de confianza. La incertidumbre de la medición comprende en general muchos componentes. Algunos de estos componentes pueden evaluarse a partir de la distribución estadística de los resultados de una serie de mediciones y pueden caracterizarse por medio de desviaciones estándar experimentales (Incertidumbre Tipo A). Los otros componentes, que también pueden ser caracterizados por desviaciones estándar, son evaluados a partir de distribuciones de probabilidad supuestas basadas en la experiencia u otra información (Incertidumbre Tipo B). Se entiende que el resultado de la medición es la mejor estimación del valor del mensurando y que todos los componentes de la incertidumbre, incluyendo aquellos provenientes de efectos sistemáticos, tales como los componentes asociados con correcciones y patrones de referencia, contribuyen a la dispersión.

Una estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado; las incertidumbres asociadas a cada efecto son combinadas de acuerdo a procedimientos bien establecidos.

La estimación de la incertidumbre en química analítica debe considerar:

- La precisión total del método en un periodo largo de tiempo.
- El sesgo y su incertidumbre, incluyendo la incertidumbre estadística asociada a las mediciones del sesgo y la incertidumbre del material de referencia o del método. Puede ser necesario incrementar la estimación cuando se detecte un sesgo importante que no ha sido corregido.
- Incertidumbres de calibración. Siendo que la mayoría de las incertidumbres de calibración de equipos serán despreciablemente pequeñas en comparación con la precisión total y la incertidumbre en el sesgo, esto necesitará solamente ser verificado.
- Debe adicionarse cualquier otro efecto significativo que actúa además de los anteriores y que pudo no haberse aplicado totalmente en un estudio de validación, por ejemplo la temperatura o los intervalos de tiempos permitidos por el método. Dichos efectos pueden ser cuantificados por estudios de robustez o estudios relacionados que establecen el tamaño de un efecto dado sobre el resultado.

1.3.2 Estadística.

La estadística es una herramienta de trabajo fundamental para la mayoría de las ciencias y la química analítica no es una excepción.

Conceptualmente, la estadística se define como el conjunto de métodos científicos que facilitan el análisis e interpretación de la información obtenida en un censo o recuento (Fernández & Cordero, 2002).

Esta ciencia facilita la toma de decisiones mediante la presentación ordenada de los datos observados en tablas y gráficos estadísticos; reduciendo los datos observados a un pequeño número de medias estadísticas que permitirán la comparación entre diferentes series de

datos y estimando la probabilidad de éxito que tiene cada una de las decisiones posibles.

1.3.3 Estadísticos.

Un estadístico es una medida que se puede usar para sintetizar un conjunto de datos, son magnitudes numéricas cuyo valor está determinado por los datos obtenidos (S. M. Ross, 2007).

Media

La media es el valor de la variable, obtenido al encontrar el cociente de la suma de los valores de la variable de cada uno de los elementos de la muestra entre el número de observaciones (Fernández & Cordero, 2002).

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (4)$$

Mediana

Este estadístico también se utiliza para representar el centro de un conjunto de datos y se define como el valor medio cuando los datos están ordenados de menor a mayor.

Se ordenan los valores de datos de menor a mayor. Si el número de datos es impar, la mediana coincide con el valor que se encuentra en la posición central en la lista ordenada; si el número de datos es par, la mediana es la media de los dos valores que ocupan las posiciones centrales.

Varianza y desviación estándar

Tanto la varianza como la desviación estándar miden la dispersión de los valores observados con respecto a la media de la población. La diferencia

entre ellas es que mientras la primera está dada en unidades al cuadrado, la segunda tiene la misma unidad de medida que la media.

Si x_1, x_2, \dots, x_n conforman una muestra aleatoria la varianza es una función de los desvíos, de cada x_i respecto a la media \bar{x} , tiene la siguiente expresión:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n} \quad (5)$$

Dada una muestra x_1, x_2, \dots, x_n con varianza s^2 , la desviación estándar se define como

$$s = \sqrt{s^2} \quad (6)$$

Coefficiente de variación

Cuando se desea hacer referencia a la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de las observaciones, se usa el coeficiente de variación. Esta medida es adimensional y permite comparar la variabilidad de características medidas en diferentes escalas (J. A. Di Rienzo, 2008).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (7)$$

Pruebas de hipótesis

En general una hipótesis es una suposición acerca de una situación dada, pero no todo supuesto es una hipótesis estadística. Las hipótesis estadísticas se refieren a las suposiciones que se formulan en relación con una o varias poblaciones estadísticas (C. Quintana, 1993).

Hay dos tipos de hipótesis que intervienen en el proceso de la prueba de hipótesis: 1) La hipótesis nula (H_0) que es una declaración de que no existe diferencia entre el valor muestral (estadístico) y el valor poblacional (parámetro) que asevera que cualquier diferencia entre el estadístico y el parámetro es resultado de la casualidad y de fluctuaciones muestrales, y que además está formulada en el proceso de prueba para ser posiblemente rechazada; 2) la hipótesis alterna H_1 que es la declaración operacional y que es contraria a la hipótesis nula (M. N. Namakforoosh, 2005).

El nivel de significancia desempeña un papel importante en las pruebas de hipótesis, pues permite establecer, a priori, el grado de error que el analista está dispuesto a aceptar. El nivel de significancia se refiere a una diminuta parte de los extremos o colas de una distribución muestral. Si el valor que se busca se ubica dentro de esa zona, entonces se concluye que no es posible que el evento ocurra debido al azar, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H_0) y; por consiguiente, se acepta la hipótesis alternativa (H_1).

Al nivel de significancia se le denomina alfa (α). Valores $\alpha=0.05$, o 5% son los más utilizados. Así $\alpha= 0.05$ significa que 95 de cada 100 veces, el valor que se obtenga reflejará el valor verdadero de la población, y que 5 veces de 100 no lo reflejará (existirá error) (Moncada, 2005).

Prueba t de Student

La prueba t de Student se deriva de las distribuciones t ; estas son una familia de distribuciones simétricas con forma de campana. Las pruebas t de Student se pueden usar para comparar diferencias entre las medias de dos grupos u observaciones (independientes), o para comparar medias de dos observaciones (pareadas o apareadas) [**Tabla 3**]. Los requisitos que se deben cumplir para una prueba t de Student son:

1. Las muestras deben seleccionarse aleatoriamente.
2. La variable dependiente debe estar lo más normalmente distribuida en la población.
3. Las desviaciones estándar de las dos muestras deben ser bastante similares.
4. Los valores de la variable dependiente deben ser medidos al nivel de intervalo o razón (Moncada, 2005).

Tabla 3 Pruebas *t-student*.

Comparación	t de Student	Grados de libertad
De una media experimental con un valor conocido	$t = (\bar{x} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s}$	$n - 1$
De dos medias experimentales	<p><i>Desviaciones estándar muestrales iguales</i></p> $t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ $s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$	$n_1 + n_2 - 2$
	<p><i>Desviaciones estándar muestrales desiguales</i></p> $t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$	$\frac{(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2})^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}}$

Fuente: Elaborada a partir de N. J. Miller, 2002

Prueba **F** de Fisher

Esta prueba se emplea para comparar varianzas cuando se desea establecer una resolución acerca de diferentes poblaciones o del efecto de muchas variables estudiadas simultáneamente. La prueba **F** está basada en una distribución estadística y sus valores se encuentran agrupados en tablas. **F** es la razón de dos varianzas (la mayor dividida por la menor):

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{donde } s_1^2 > s_2^2 \quad (8)$$

Si el valor de F calculado a partir de las varianzas a comparar es mayor que el valor dado en la tabla para los grados de libertad adecuados, entonces la dispersión de las dos poblaciones es diferente (G. H. Brown, 1967).

Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza (Analysis Of Variance) se utiliza para contrastar la hipótesis nula de que k medias son iguales, es decir:

$$H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3 = \bar{x}_4 \dots$$

$$\text{Frente a } H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2 \neq \bar{x}_3 \neq \bar{x}_4 \dots$$

El análisis de la varianza se basa en la comparación de la variabilidad que hay entre los grupos (intergrupo) con la que hay dentro de los grupos (intragrupo), proporcionando el estadístico F para contrastar la hipótesis nula de igualdad de medias en los grupos [**Tabla 4**] (J. Tomás-Sábado, 2010).

Existen diferentes clases de ANOVA, y el uso de ellas depende de la cantidad y nivel de medición de las variables independientes, de si el diseño es de grupos independientes, de medidas repetidas, o ambas:

- ANOVA de un factor para grupos independientes
- ANOVA de un factor para medidas repetidas
- ANOVA factorial
- ANOVA mixta

Por lo anterior, se dice que ANOVA es un procedimiento que permite comparar diferencias o interacciones entre muchos grupos (Moncada, 2005).

Tabla 4 Resumen de sumas de cuadrados y grados de libertad para ANOVA de un factor.

Fuente	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad	Varianza (MS)	F_{calc}
Entre grupos	$SS_{ent} = \sum_{k=1}^k n_k (\bar{x}_k - \bar{\bar{x}})^2$	$k - 1$	$MS_{ent} = \frac{SS_{ent}}{k - 1}$	$F = \frac{MS_{ent}}{MS_{den}}$
Dentro de grupos	$SS_{den} = \sum_{k=1}^k \sum_{j=1}^{n_k} (x_{kj} - \bar{x}_k)^2$	$N - k$	$MS_{den} = \frac{SS_{den}}{N - k}$	
Total	$SS_T = \sum_{k=1}^k \sum_{j=1}^{n_k} (x_{kj} - \bar{\bar{x}})^2$	$N - 1$	$MS_T = \frac{SS_T}{N - 1}$	

ent= entre grupos, *den*= dentro de grupos,

Fuente: Elaborada a partir de N. J. Miller, 2002

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales y reactivos.

2.1.1 Instrumentación.

Para la determinación de formaldehído por SIA se utilizó tubería de teflón de 1/16 pulgadas de diámetro interno para hacer el bucle de espera de 200 cm y un reactor en serpentín de 300 cm. La detección se realizó por fluorimetría con un Fluorímetro FIALab ® PMT-FL.

Como sistema de propulsión se utilizó un bomba peristáltica ISMATEC ® Modelo ISM834C y como sistema de inyección una válvula de selección automática Rheodyne Modelo MXX777-605 de 10 puertos. Para el control de temperatura a 60 ± 0.1 °C se operó un baño de agua controlado con un microprocesador 280 Thermo Scientific Modelo 2825.

Para la preparación, normalización y valoración de los reactivos empleados se utilizó una balanza analítica Ohaus Modelo E12140, un potenciómetro OAKTON pH 500 Modelo 00702-75 así como material de vidrio de uso común.

2.1.2 Reactivos y disoluciones.

Los reactivos utilizados fueron grado analítico y las disoluciones se prepararon con agua destilada, todas las disoluciones se sonicaron antes de ser utilizadas.

Formaldehído 37% en H₂O (Sigma-Aldrich): a partir de este se preparó una disolución madre de formaldehído, tomando 1000 µL del reactivo y llevando a 100.0 mL; posteriormente se valoró con HCl y Na₂SO₃ (**Anexo I**). A partir de la disolución madre se prepararon diferentes disoluciones estándar para evaluar los parámetros de desempeño.

Acetato de amonio 98% (Analit): se pesaron 2.00 g del reactivo, se disolvieron y aforaron a 10.0 mL (2.5 mol/L), se ajustó el pH usando ácido acético para bajar a pH 6 o hidróxido de amonio para aumentar a pH 6.

2,4-pentanodiona 99% (Sigma-Aldrich): se tomaron 200 μ L, se agregaron 7 mL de agua y se sonicaron durante 30 minutos para homogenizar la disolución, finalmente se aforó a 10.0 mL (0.2 mol/L).

Formaldehído estándar certificado 1000 μ g/mL (Sigma-Aldrich) Lote LRR8092 (**Anexo II**: Certificado de análisis)

2.1.3 Muestras.

Se analizaron 6 muestras de agua comerciales y agua corriente

1. Marca **1** 1 L (agua purificada) Lote PL7 02:12
Caducidad: 27/may/16
2. Marca **2** 600 mL (agua purificada) Lote 00: 45 717 4
Caducidad: 05/nov/15
3. Marca **3** 1 L (agua preenvasada para consumo humano) Lote A4 11:33 L144 Caducidad: 23/may/17
4. Bebedero Facultad de Química* 12 mL
Fecha de muestreo: 05/jun/15
5. Delegación Iztapalapa* 12 mL Fecha de muestreo: 03/jun/15
6. Delegación Gustavo A. Madero* 12 mL
Fecha de muestreo: 10/jun/15

*Método de muestreo: se utilizaron viales de 12 mL nuevos, se dejó correr suficiente agua asegurándose de que se limpiara la tubería y se procedió a tomar la muestra llenando el vial a su máxima capacidad para evitar pérdidas por volatilización. Las muestras se conservaron a 4 °C no por más de una semana.

El portador, los reactivos y disoluciones fueron desgasificados antes de introducirse a la configuración SIA.

2.2 Procedimiento.

2.2.1 Configuración SIA.

En primer lugar, para conocer el valor de caudal proporcionado por la bomba peristáltica se realizó una calibración para el tubo de bomba seleccionado en donde se determinó la equivalencia entre las revoluciones por minuto (rpm) y el caudal. Las pruebas para la reacción de formaldehído se hicieron a 0.8 mL/min y 0.5 mL/min.

Para la configuración SIA fue necesario limpiarla periódicamente con ácido nítrico diluido para asegurar que no hubiera residuos de otros experimentos dentro de las tuberías.

Para estabilizar el sistema y eliminar las burbujas de aire se hizo pasar el portador durante media hora antes de empezar. El procedimiento para la determinación de formaldehído fue: a través de la válvula de selección se aspiraron tanto los reactivos como la muestra en el siguiente orden: *formaldehído-acetato de amonio-2,4-pentanodiona-formaldehído*, que fueron enviados hacia un bucle de espera de 200 cm, posteriormente, al cambiar la dirección del flujo, fueron llevados al reactor de reacción de 300 cm que se encontraba sumergido en un baño de agua a 60 ± 0.1 °C y donde se llevó a cabo la reacción de derivatización. Finalmente el **producto de reacción formado fue medido a $\lambda_{\text{ex}} = 415$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 500$ nm.** En la **Figura 9** se muestra la configuración de inyección secuencial (SIA) que se utilizó.

En la **Tabla 5** se resume la secuencia empleada para llevar a cabo la determinación de formaldehído usando la configuración SIA de la **Figura 9**.

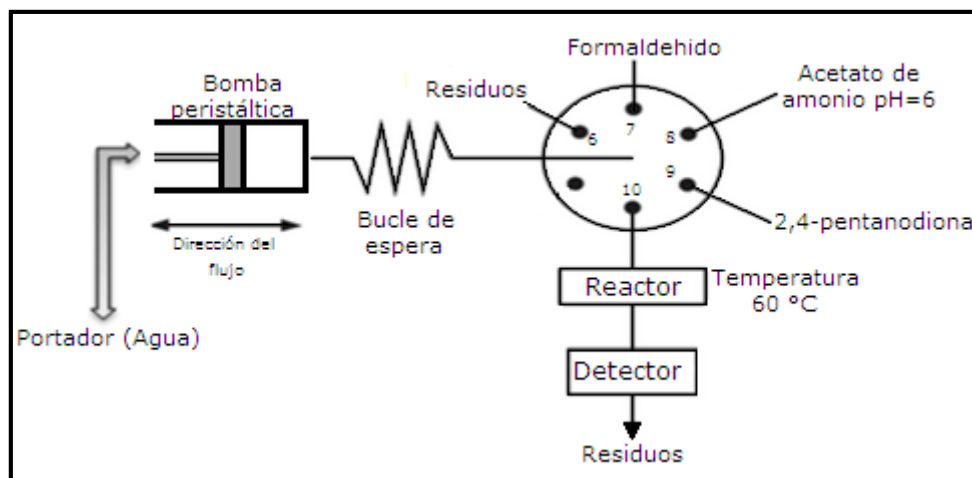


Figura 9 Configuración SIA empleada.

Tabla 5 Secuencia final de aspiración de reactivos y muestras para determinar formaldehído.

Paso	Posición	Función	Volumen [μ L]	Tiempo [s]	Dirección de flujo	Descripción de la etapa
1	7	Aspirado	40	5	Bucle de espera	Aspirado de muestra (F)
2	8	Aspirado	100	12	Bucle de espera	Aspirado de buffer (B)
3	9	Aspirado	40	5	Bucle de espera	Aspirado de 2,4-pentanediona (P)
4	7	Aspirado	40	5	Bucle de espera	Aspirado de muestra (F)
5	10	Inyección	1600	200	Reactor	Inyección del bolo

2.2.2 Linealidad y sensibilidad.

Para la evaluación de estos parámetros se realizaron curvas de calibración probando concentraciones de formaldehído de 0.01 mg/L hasta 20.00 mg/L, con el fin de encontrar el intervalo lineal. En la **Tabla 6** se muestran los volúmenes necesarios para la elaboración de la curva de calibración a partir de una disolución madre de concentración 10.00 mg/L. Después de haber obtenido la curva de calibración se realizó un análisis estadístico (análisis de residuos, datos anómalos, intervalo de confianza, etc.) para

definir la ecuación de recta a utilizar; también se efectuó una prueba de significancia *t*-student con el fin de determinar la correlación entre la concentración y la intensidad de fluorescencia.

Tabla 6 Volúmenes para la curva de calibración a partir de una disolución madre de 10.00 mg/L

Concentración HCOH [mg/L]	Volumen tomado [μL]	Volumen de aforo [mL]
0.05	25	5.0
0.10	50	
0.30	150	
0.50	250	
0.80	400	
1.00	500	

2.2.3 Límites de detección y cuantificación.

Se analizó por sextuplicado el blanco, este consistió en aspirar como muestra agua destilada. Utilizando las ecuaciones **(9)** y **(10)** se calculó el límite de detección y cuantificación (N. J. Miller, 2002).

$$LD = y_B + 3s_B \quad (9)$$

$$LC = y_B + 10s_B \quad (10)$$

Donde

LD = Límite de detección

LC = Límite de cuantificación

y_B = señal del blanco

s_B = *desviación estándar del blanco*

2.2.4 Precisión (Reproducibilidad y repetibilidad).

La precisión se evaluó como reproducibilidad parcial o intralaboratorio y como repetibilidad, durante siete días se prepararon dos disoluciones de igual concentración (0.60 mg/L) y se analizaron por triplicado. Mediante un análisis de varianza (ANOVA) y las ecuaciones **(11)** y **(12)**, se obtuvieron la repetibilidad y reproducibilidad como coeficientes de variación (CV).

$$s_{entre}^2 = \frac{MC_{entre} - MC_{dentro}}{n_j} \quad (11)$$

$$s_{WR}^2 = s_r^2 + s_{entre}^2 \quad (12)$$

Donde

s_{entre}^2 = *varianza entre días*

MC_{entre} = *cuadrados medios entre días*

MC_{dentro} = *cuadrados medios dentro de días*

s_r^2 = *varianza de la repetibilidad*

s_{WR}^2 = *varianza de la reproducibilidad*

2.2.5 Selectividad.

Para este parámetro se determinó la posible interferencia de especies presentes en agua potable; para tal caso se efectuó el análisis de 6 interferencias: carbonato de sodio (Na_2CO_3), cloruro de sodio (NaCl), nitrato de potasio (KNO_3), sulfito de sodio (Na_2SO_3), acetaldehído (CH_3COH) y ácido acético (CH_3COOH).

Se prepararon disoluciones madre de concentración 6000 mg/L, para cada interferencia y se evaluaron a una concentración de 0.6 mg/L adicionando una concentración 0.6 mg/L de HCOH.

Con base en los resultados obtenidos se modificaron las concentraciones hacia mayores o menores niveles según la interferencia estudiada.

Para determinar si la especie en estudio se presenta como una interferencia en la determinación del analito se compararon las medias muestrales de las interferencias con una disolución de formaldehído 0.6 mg/L utilizando el contraste *t*-student.

2.2.6 Exactitud.

En esta prueba se utilizó un estándar certificado de formaldehído (Formaldehyde IC Standard-100 mL) con una concentración de 1000 ± 29.1 $\mu\text{g/mL}$. Se tomaron 50.0 μL del estándar y se aforaron a 5.0 mL para obtener una disolución de 10.0 mg/L, a partir de ésta se prepararon disoluciones de 0.1, 0.5, 0.6 y 0.8 mg/L [**Tabla 7**].

Las disoluciones fueron analizadas con la configuración SIA y se calcularon las concentraciones de éstas con la curva de calibración. Se comparó la media muestral con el valor de referencia para determinar si el método era exacto o no.

Tabla 7 Volúmenes tomados a partir de una disolución madre de 10.00 mg/L proveniente de un MRC para la evaluación de exactitud.

Concentración HCOH [mg/L]	Volumen de estándar [μL]	Volumen de aforo [mL]
0.1	50	5.0
0.5	250	
0.6	300	
0.8	400	

2.2.7 Veracidad.

2.2.7.1 Recobros y análisis de muestras.

En primer lugar se analizaron las muestras tal y como fueron muestreadas, conforme a los resultados se agregaron concentraciones conocidas para fortificar, en un nivel alto (0.8 mg/L) y uno bajo (0.2 mg/L), finalmente se realizó el análisis de cada muestra por triplicado y se calculó el porcentaje de recuperación.

Como análisis estadístico se realizó una prueba *t-student* para comparar los porcentajes de recuperación y el 100.0 % de recuperación (teórico).

2.2.7.2 Sesgo.

Para la evaluación de este parámetro se recurrió a los resultados de recuperación para las muestras fortificadas y mediante la aplicación de la ecuación **(13)** y una prueba t-student (ecuación **(14)**) se determinó la posible existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración obtenida y la concentración agregada.

$$S = X - X_a \quad (13)$$

Donde

$S = \text{sesgo}$

$X = \text{valor promedio de las lecturas}$

$X_a = \text{valor de referencia o esperado}$

$$t_{cal} = \frac{|X - X_a|}{s\sqrt{n}} \quad (14)$$

Donde

$t_{cal} = t - \text{student calculado}$

$|X - X_a| = \text{valor absoluto del sesgo}$

$s = \text{desviación estándar de las lecturas}$

n = número de lecturas

2.2.9 Estimación de la incertidumbre.

Para conocer la incertidumbre del método no fue necesario realizar un procedimiento experimental, ésta se estimó usando como referencia un diagrama de Ishikawa o de espina de pescado, el cual involucra las fuentes de error en la determinación de formaldehído. Este diagrama se construyó tomando como referencia un documento del Centro Nacional de Metrología (CENAM) (I. Angel S, 2010) en el cual se menciona que debe estar constituido **por un eje central horizontal conocido como "línea principal o espina central** en donde se coloca el problema que se este analizando, en este caso la cuantificación de formaldehído.

Posee varias flechas inclinadas que se extienden hasta el eje central, al cual llegan desde su parte inferior y superior. Cada una de ellas representa un grupo de causas (fuentes de error) que inciden directamente en el problema. Cada una de estas flechas a su vez son tocadas por flechas de menor tamaño que **representan las "causas secundarias"** de cada "causa" o "grupo de causas del problema".

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Configuración SIA.

3.1.1 Caudal.

En un trabajo previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación (E. G. Carrillo, 2014) se establecieron las condiciones óptimas para la determinación de formaldehído usando una configuración SIA en concentraciones de 0.96 mg/L a 4.8 mg/L, similar a la de la **Figura 9** pero con sólo tres pasos de aspiración: formaldehído, acetato de amonio, 2,4-pentanodiona. Esta metodología contaba con las características mostrada en la **Tabla 8**. Sin embargo para poder cuantificar concentraciones menores a 1.0 mg/L se hicieron algunas modificaciones a esta configuración inicial.

Tabla 8 Condiciones iniciales para determinar formaldehído siguiendo la secuencia de aspiración F-B-P.

Parámetro	Valor
Caudal de aspiración	0.6 mL/min
Caudal de dispensión	0.8 mL/min
Orden de aspiración	FBP
Volúmenes aspirados	F: 40 µL, B: 100 µL, P: 40 µL
Concentración de reactivos	B: 2.5 mol/L, P: 0.2 mol/L

F=formaldehído, B=acetato de amonio, P=2,4-pentanodiona

Con estas condiciones se tenían problemas de burbujas dentro del canal del portador cuando pasaba a través del reactor colocado en el baño de agua, para evitar esto se decidió bajar la velocidad de flujo de 0.8 mL/min a 0.5 mL/min. En la **Figura 10** se percibe como la presencia de aire en el sistema altera la forma del pico, mientras que a un caudal más bajo la forma del pico es más definida.

Sin embargo aún se formaban eventualmente burbujas en el sistema. Para no tener problemas en la detección se mantuvo el flujo por un minuto más después de la detección para que salieran del sistema las burbujas formadas; inmediatamente después se realizaba la siguiente inyección de muestra y reactivos.

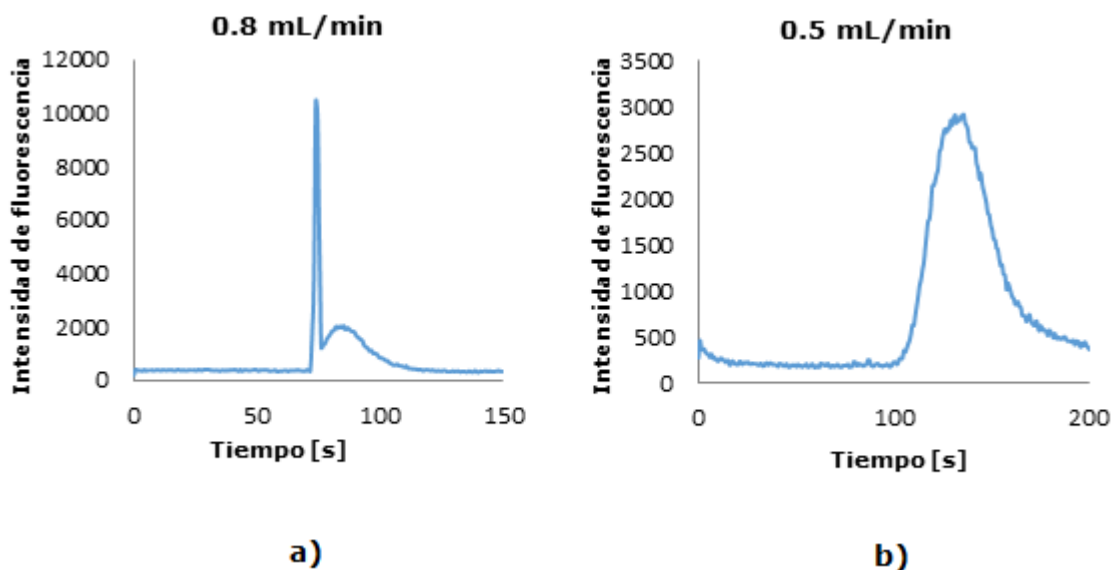


Figura 10 a) Señal a 0.8 mL/min y **b)** señal a 0.5 mL/min con una concentración de 1.00 mg/L de formaldehído. Las demás condiciones de análisis se mantuvieron como se menciona en la **Tabla 8**.

3.1.2 Orden de aspiración.

Con la configuración inicial la concentración más baja que daba una señal diferente a la del blanco era de 1.00 mg/L; sin embargo en lo establecido en la NOM-201-SSA1-2002, el límite máximo permisible para formaldehído es 0.9 mg/L. Con el resultado anterior se puede decir si una muestra está fuera de la normatividad o está por debajo del primer punto de la curva de calibración; pero no se puede saber en qué concentración.

Para observar concentraciones menores a 1.00 mg/L se decidió volver a aspirar formaldehído después de la 2-4-pentanodiona, así el orden de

aspiración fue: formaldehído (F), acetato de amonio (B), 2,4-pentanodiona (P) y formaldehído (F); al realizar este procedimiento se observó que la señal para el blanco disminuyó [**Figura 11**], permitiendo así bajar el nivel de concentración cuantificable de formaldehído.

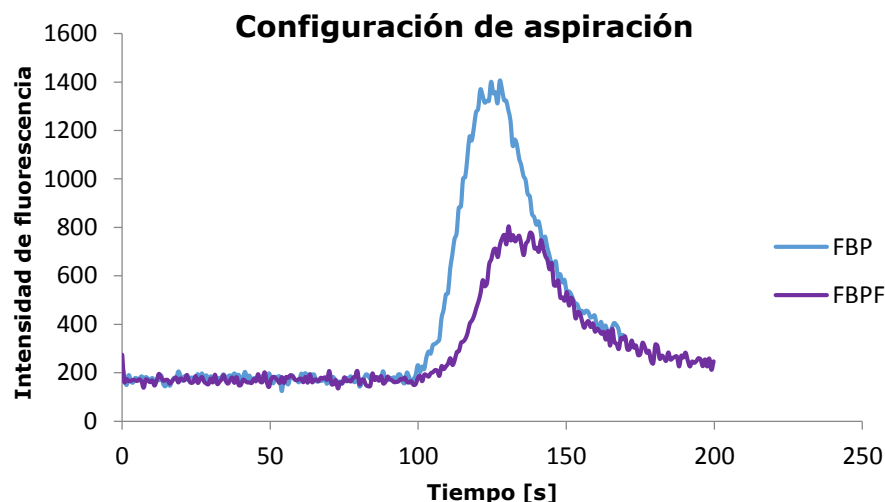


Figura 11 Intensidad de fluorescencia del blanco usando los dos ordenes de aspiración (F: formaldehído, B: acetato de amonio, P: 2,4-pentanodiona).

Finalmente, las condiciones óptimas para la determinación de formaldehído a concentraciones menores a 1.00 mg/L usando el sistema SIA se resumen en la **Tabla 9**.

3.2 Linealidad y sensibilidad

3.2.1 Linealidad.

A menudo, la relación entre las variables X y Y sólo es lineal en un dominio limitado de valores de X ; así como parte de los primeros experimentos se buscó el intervalo lineal para concentraciones de formaldehído usando la configuración inicial de aspiración FBP. Con este orden se probaron intervalos de 1.00 mg/L a 18.00 mg/L de HCOH [**Figura 12**]; sin embargo no se obtiene un coeficiente de correlación ($r=0.985$) que nos diga que

los puntos experimentales se ajustan a una línea recta. Dado lo anterior se optó por bajar a un intervalo de 1.00 mg/L a 12.00 mg/L [**Figura 12**]; al realizar este ajuste se obtuvo un mejor coeficiente de correlación, por lo tanto una mejor linealidad.

Tabla 9 Condiciones óptimas del método SIA.

Parámetro	Valor óptimo
Orden de aspiración	FBPF
Volumen aspirado de formaldehído	40 μ L
Volumen aspirado de buffer pH 6 (2.5 mol/L)	100 μ L
Volumen aspirado de 2,4-pentadiona (0.29 mol /L)	40 μ L
Temperatura del reactor	60 ° C
$\lambda_{\text{excitación}}$	415 nm
$\lambda_{\text{emisión}}$	500 nm
Velocidad de aspiración	0.5 mL/min
Velocidad de inyección	0.5 mL/min

No obstante ya se ha mencionado que el LMP para HCOH es 0.9 mg/L por lo que para poder bajar las concentraciones cuantificables se utilizó las condiciones descritas en la **Tabla 9** con el nuevo orden de aspiración FBPF.

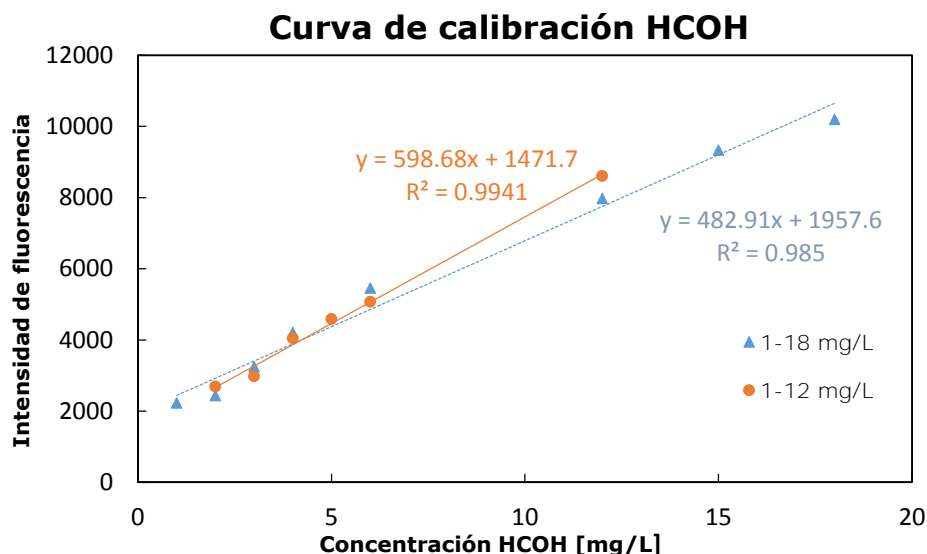


Figura 12 Curvas de calibración de formaldehído usando el orden de aspiración FBP.

En estas condiciones se obtuvieron 2 intervalos lineales: uno de 0.05 mg/L a 1.00 mg/L y otro de 2.00 mg/L a 12.00 mg/L [Figura 13]. Con el objeto de poder cuantificar la menor cantidad de formaldehído en agua potable, el intervalo que se usó para la evaluación del método fue de 0.05 mg/L a 1.00 mg/L.

3.2.2 Sensibilidad.

Con lo anterior se estableció el intervalo lineal del método para concentraciones bajas (0.05 mg/L - 1.00 mg/L); no obstante aún no se definía por completo la sensibilidad del método, por lo que se realizaron otras curvas de calibración; esto no sólo estableció la sensibilidad del método si no también detalló la ecuación de la recta para la curva de calibración de HCOH.

Para esto se modificaron factores que podrían afectar en la obtención de la curva de calibración; tales como la forma de preparar los puntos de la curva (dilución, volumen preparado) y estabilidad de reactivos.

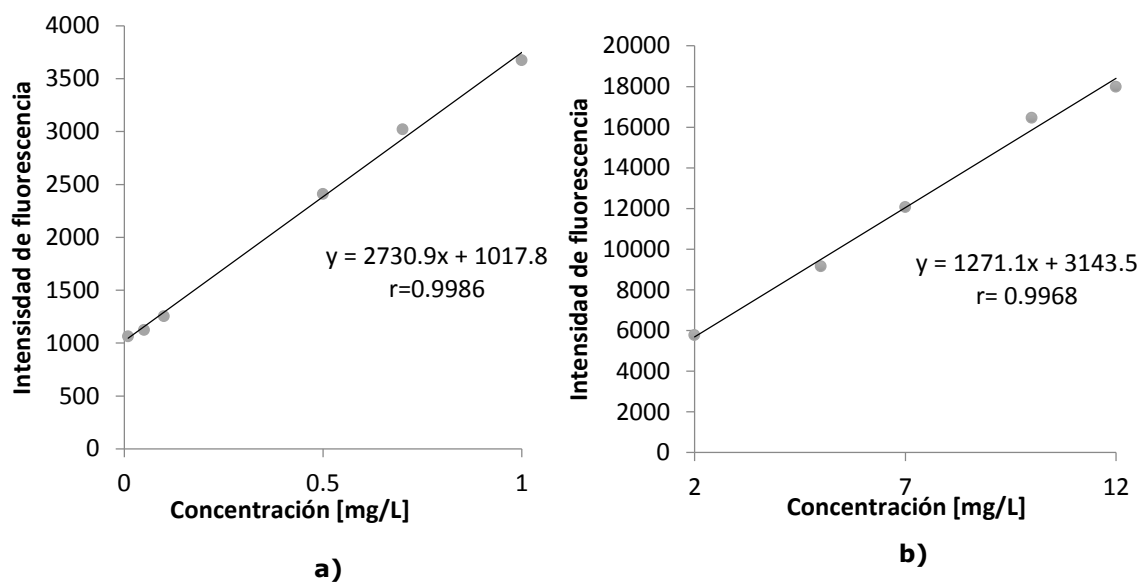


Figura 13 Intervalos lineales obtenidos usando el orden de aspiración FBPF.
a) Intervalo lineal 0.05-1.00 mg/L **b)** Intervalo lineal 2.00-12.00 mg/L

Se obtuvieron cuatro curvas de calibración (**Anexo III**) con una pendiente promedio de 2064.84 ± 55.08 mg/L, lo cual indica una alta sensibilidad del método; esto quiere decir que la señal varía significativamente cuando hay un pequeño cambio en la concentración del analito [**Figura 14**].

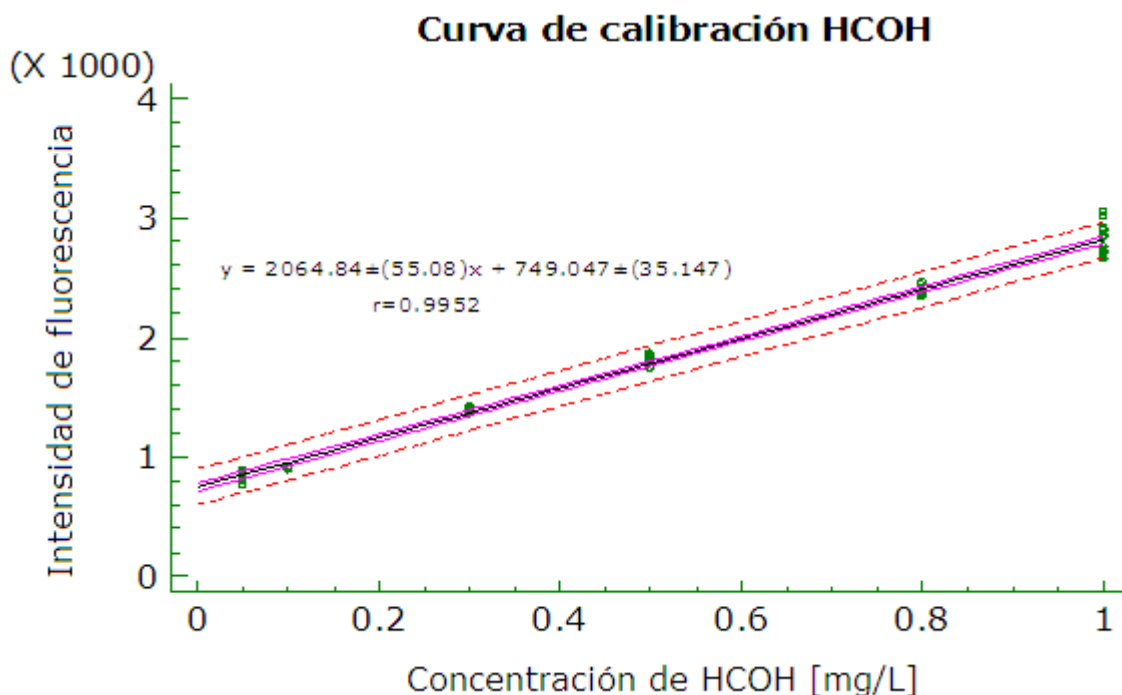


Figura 14 Curva de calibración promedio.

Con una simple inspección visual se observa que la curva de calibración se representa como una regresión paramétrica; sin embargo es necesario hacer un estudio más a fondo para determinar si existe homocedasticidad de los datos, para esto se realizó el análisis de residuos de la curva de calibración. En la **Figura 15** se nota que no existe tendencia alguna en los residuos aunque el residuo que corresponde a la concentración 1.00 mg/L podría ser un dato anómalo en la curva de calibración; para comprobar si lo es o no se realizó un estudio de la distancia de Cook (N. J. Miller, 2002).

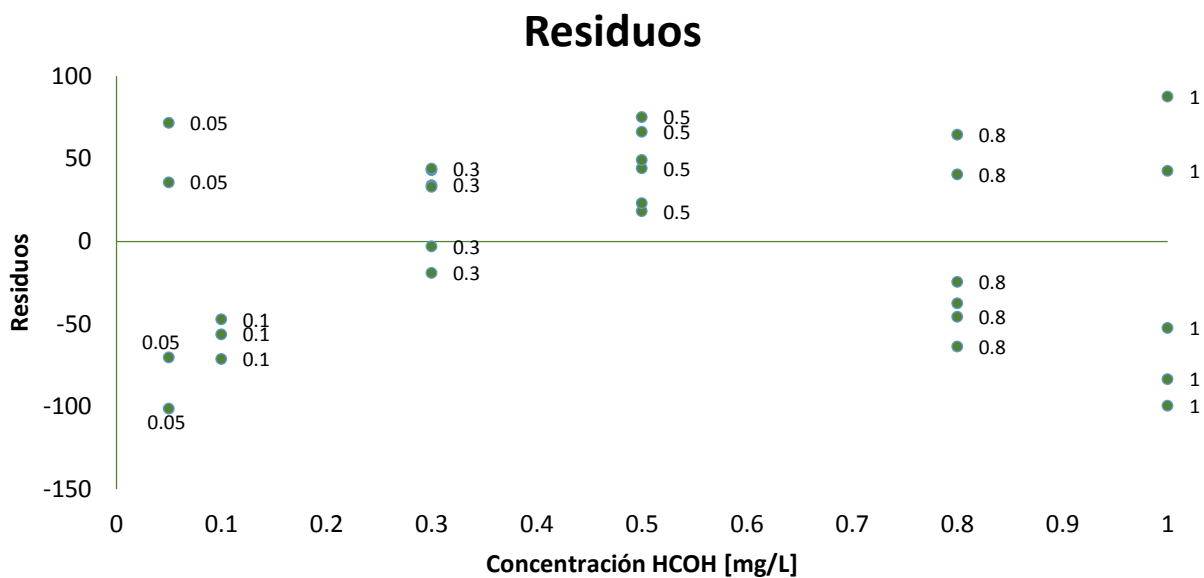


Figura 15 Residuos de la curva de calibración.

En el análisis de la distancia de Cook se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI y mediante la función *Modelos Lineales Generalizados* se obtuvo el estudio de la distancia de Cook (Estadístico que mide la distancia entre la estimación de los coeficientes del modelo lineal con y sin cada observación). En la **Tabla 10** se muestra que no existen valores inusuales (>1) para la distancia de Cook, por lo tanto no existen datos anómalos.

Tabla 10 Análisis de la distancia de Cook.

Fila	Concentración [mg/L]	Distancia de Cook
47	1.0	0.190815
48		0.281808
50		0.124959
51		0.0845689

Para hacer una comparación estadísticamente significativa entre las cuatro curvas de calibración en estudio se realizó una prueba t-student de una recta global* [Tabla 11] (Instituto de Salud Pública., 2010), empleando las curvas antes descritas. Esto se consiguió mediante el uso de la ecuación (15)

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (15)$$

Donde

t_r = valor del estimador t – student obtenido para el coeficiente de correlación

$|r|$ = valor absoluto del coeficiente de correlación

n = número de niveles

r^2 = valor del coeficiente de determinación

Hipótesis:

H_0 = No existe correlación estadísticamente significativa entre las variables Y y X .

H_1 = Existe correlación estadísticamente significativa entre las variables Y y X .

*Para calcular la recta global se debe tener el mismo número de niveles en la curva de calibración.

Tabla 11 Parámetros de la recta global.

Ecuación de la recta global	$y = 2020.70 \pm (261.45)x + 763.99 \pm (151.46)$
Coefficiente de correlación (r)	0.9990
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9982
Número de niveles (n)	4

Como resultado se tiene una $t_r = 33.3$ y una $t_{\text{tabla}} = 4.30$, por lo tanto al ser $t_r > t_{\text{tabla}}$ se rechaza H_0 y se acepta H_1 (existe correlación entre las variables X y Y).

3.3 Límites de detección y de cuantificación.

Como ya se ha mencionado existen diversas formas de calcular el límite de detección y cuantificación; en este caso los límites fueron calculados a partir del análisis del blanco y los resultados que se obtuvieron son:

Límite de detección: **0.01 mg/L**

Límite de cuantificación: **0.05 mg/L**

3.4 Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio y repetibilidad).

Los experimentos se realizaron con una concentración media del intervalo lineal (0.60 mg/L). Los datos mostrados en la **Tabla 12** son resultado de los experimentos con los cuales se realizó el análisis de varianza [**Tabla 13**] y se usaron las ecuaciones **(11)** y **(12)** para obtener la precisión del método.

Tabla 12 Resultados del análisis de una disolución 0.6 mg/L de formaldehído.

Día	HCOH [mg/L]	HCOH [mg/L]
1	0.5276±0.0248	0.4750±0.0247
2	0.4951±0.0176	0.6103±0.0702
3	0.5603±0.0217	0.5330±0.0130
4	0.5291±0.0135	0.5289±0.0056
5	0.4855±0.0173	0.4938±0.0239
6	0.4996±0.0255	0.5075±0.0126
7	0.5070±0.0151	0.4961±0.0172

Tabla 13 ANOVA para repetibilidad y reproducibilidad.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados
Entre grupos	0.0074	6	0.001236
Dentro de los grupos	0.0085	7	0.001216
Total	0.0159	13	

Los resultados obtenidos para repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio fueron 6.73 % y 6.76 %, respectivamente; éstos se encuentran expresados como desviación estándar relativa o coeficiente de variación de Pearson.

Con base en estos resultados se dice que el método SIA tiene una buena precisión (menor a 10.00 %) y al obtener valores muy cercanos se concluye que se cometen los mismos errores dentro de días y entre días. Esto nos confirma que los métodos SIA pueden ser utilizados para simplificar análisis obteniendo resultados repetibles y reproducibles.

3.5 Selectividad.

El análisis de las interferencias se dividió en compuestos inorgánicos y orgánicos que podrían estar presentes en agua potable. Para el estudio de interferencias siempre se utilizó una concentración constante de

formaldehído de 0.6 mg/L. En la **Tabla 14** se muestran las interferencias analizadas, la concentración de éstas y el error obtenido.

Se comenzó con un ensayo en donde se evaluó la misma relación de concentraciones entre formaldehído y la interferencia (1: 1); en los casos donde hubo una disminución o aumento en la altura de pico se probaron otras relaciones de concentraciones.

Tabla 14 Análisis de interferencia en diferentes concentraciones y porcentaje de error asociado.

Interferencia	Concentración del analito en estudio [mg/L]	Concentración de HCOH calculada [mg/L]	% Error*
NaCl	0.12	0.5749±0.0600	1.08
	0.30	0.5623±0.0192	3.25
	0.60	0.5846±0.0212	-0.58
	1.20	0.5738±0.0136	1.27
	6.00	0.6239±0.0133	-1.27
Na₂SO₃	0.30	0.5204±0.0349	7.25
	0.60	0.4825±0.0482	17.14
	1.20	0.4060±0.0286	22.30
	6.00	0.3598±0.0420	31.14
KNO₃	0.60	0.5638±0.0119	1.08
	6.00	0.6300±0.0160	2.67
Na₂CO₃	0.60	0.5689±0.0253	0.19
	6.00	0.4925±0.0162	5.74
CH₃COH	0.60	0.5665±0.0130	2.06
CH₃COOH	0.60	0.5195±0.0127	10.18

*±desviación estándar, * con respecto a la disolución 0.6 mg/L de formaldehído*

En la **Tabla 14** se observa que los errores más altos son para Na₂SO₃, Na₂CO₃ y CH₃COOH, lo que indicaría que estas especies son una interferencia en la determinación de formaldehído, sin embargo para tomar un criterio de aceptación estadísticamente significativo se realizó una prueba de hipótesis con el contraste de significación *t*-student, para comparar las medias muestrales. Antes de esto se debe conocer si las

varianzas de estos grupos muestrales son iguales o diferentes, para tal efecto se realizó en primer lugar una prueba F de Fisher. Dependiendo del valor obtenido se decidió qué tipo de prueba t-student era conveniente; suponiendo varianzas iguales o varianzas desiguales [**Tabla 15**].

El ensayo de hipótesis para la prueba F es:

H_0 = No existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de la concentración de HCOH con o sin interferencia.

H_1 = Existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de la concentración de HCOH con o sin interferencia.

El estadístico F se calculó a partir de la ecuación **(16)** ; 1 y 2 se arreglan de manera que F siempre sea ≥ 1 .

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (16)$$

Donde

F = estadístico F de Fisher

s_1^2 = varianza del grupo muestral 1

s_2^2 = varianza del grupo muestral 2

Para F_{tabla} se usó la Tabla I (**Anexo IV**) con grados de libertad $n - 1$ para el numerador (v_1) y el denominador (v_2)

Tabla 15 Tipo de varianza que presentan las interferencias analizadas.

Interferencia/ Concentración [mg/L]	F_{calculada}	F_{tabla}	Decisión	Prueba t- student
NaCl /0.12	10.162	6.227	Se rechaza H ₀	Varianzas desiguales
NaCl /0.30	4.996	7.388	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
NaCl /0.60	6.104	7.388	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
NaCl /1.20	2.489	8.434	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
NaCl /6.00	12.944	39.170	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
Na₂SO₃ /0.30	1.660	9.605	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
Na₂SO₃ /0.60	6.646	5.820	Se rechaza H ₀	Varianzas desiguales
Na₂SO₃ /1.20	3.832	39.250	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
Na₂SO₃ /6.00	8.264	39.250	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
KNO₃ /0.60	1.933	14.730	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
KNO₃ /6.00	7.243	39.250	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
Na₂CO₃ /0.60	8.809	15.100	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
Na₂CO₃ /6.00	3.622	15.100	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
CH₃COH /0.6	3.549	15.440	Se acepta H ₀	Varianzas iguales
CH₃COOH /0.6	3.374	15.100	Se acepta H ₀	Varianzas iguales

Conociendo que tipo de prueba *t*-student debemos emplear en la comparación de las medias muestrales se utilizó la función Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales o Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales que proporciona el programa Microsoft Excel.

El cálculo del estadístico *t*-student también se puede obtener a partir de las ecuaciones **(17)** para varianzas iguales y **(18)** para varianzas desiguales.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{(17)}$$

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

$$\text{(18)}$$

$$* \text{ con grados de libertad} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}}$$

Las pruebas de hipótesis a evaluar fueron:

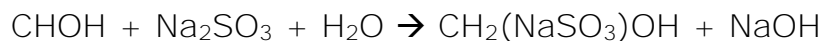
H_0 = No existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de formaldehído y la concentración de HCOH con interferencia

H_1 = Existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de formaldehído y la concentración de HCOH con interferencia.

Tabla 16 Prueba de significancia para interferencias.

Interferencia/ Concentración [mg/L]	t_{calculada}	t_{tabla}	Decisión
NaCl /0.12	0.266	2.570	Se acepta H_0
NaCl /0.30	2.181	2.262	Se acepta H_0
NaCl /0.60	0.360	2.262	Se acepta H_0
NaCl /1.20	1.024	2.365	Se acepta H_0
NaCl /6.00	0.268	2.570	Se acepta H_0
Na₂SO₃ /0.30	0.652	2.306	Se acepta H_0
Na₂SO₃ /0.60	4.336	2.306	Se rechaza H_0
Na₂SO₃ /1.20	6.419	2.447	Se rechaza H_0
Na₂SO₃ /6.00	6.307	2.447	Se rechaza H_0
KNO₃ /0.60	0.808	2.262	Se acepta H_0
KNO₃ /6.00	1.721	2.447	Se acepta H_0
Na₂CO₃ /0.60	0.085	2.365	Se acepta H_0
Na₂CO₃ /6.00	2.613	2.447	Se rechaza H_0
CH₃COH /0.6	1.612	2.447	Se acepta H_0
CH₃COOH /0.6	8.280	2.365	Se rechaza H_0

Se observa en la **Tabla 16** que para la interferencia sulfito de sodio en concentraciones ≥ 0.60 mg/L existe una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de formaldehído y la concentración de éste cuando se encuentra presente. Esto se explica con base en la reacción de adición donde sulfito de sodio reacciona con formaldehído formando hidróxido de sodio y el producto de adición $\text{CH}_2(\text{NaSO}_3)\text{OH}$, éste no reacciona con 2,4-pentanediona y la señal que se obtiene sólo es del formaldehído que no reacciona con Na_2SO_3 .



El ión sulfito puede estar presente en algunas aguas residuales pues éste se agrega en el agua de alimentación de calderas como atrapador de oxígeno (B. E. Jiménez, 2001; Manahan, 2006). En aguas naturales se puede encontrar debido a que se utiliza como agente decolorante (M. Tikkanen, 2001), sin embargo no se tiene reporte de altas concentraciones de éste; por lo tanto se espera que no interfiera en la determinación de formaldehído en muestras de agua potable.

Para Na_2CO_3 también se observa una diferencia estadísticamente significativa cuando se encuentran en la muestra; sin embargo si se considera la precisión del método no sería una interferencia en la determinación de formaldehído.

Finalmente se encuentra que ácido acético es una interferencia para la determinación de formaldehído y podría encontrar explicación en la interacción que presenta con la fluorescencia. En la literatura se reporta que una disolución de ácido acético presenta dos bandas en fluorescencia, una que va de 330-493 nm y otra de 534-665 nm (Y. Liu, 2003), entonces al tener ácido acético en la muestra éste afectará en la detección del analito debido a que parte de la fluorescencia será captada por las moléculas de ácido acético y no por el producto de reacción.

3.6 Exactitud.

En la evaluación de la exactitud se obtuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 17**. Se observa que a concentraciones bajas de formaldehído se tiene mayor exactitud, esto nos llevó a pensar que los datos obtenidos por este método presentaban heterocedasticidad; es decir conforme aumenta la concentración de formaldehído el error asociado al eje *Y* también aumenta (N. J. Miller, 2002).

Para determinar la homocedasticidad o heterocedasticidad de los resultados se calculó una recta de regresión ponderada y un ajuste no

paramétrico (Método de Theil), esto basándose en la **Figura 15** del análisis de los residuos que presuntamente mostraba una tendencia.

El cálculo de la exactitud con las nuevas ecuaciones se muestran también en la **Tabla 17**, se ve que con el ajuste ponderado la exactitud no mejora, por el contrario disminuye y con el método de Theil se tiene un aumento en los valores de exactitud; sin embargo la tendencia se mantiene y por lo tanto no es necesario hacer una corrección a la ecuación de la recta que describe la curva de calibración.

Tabla 17 Exactitud del método con diferentes ecuaciones de recta.

Concentración [mg/L]	Ajuste	No ponderado	Ponderado	Theil
	Ecuación	$y=2033.51x+731.64$	$y=2036.84x+775.45$	$y=2058.57x+703.14$
0.1		97.05±8.38 %	75.38±8.37 %	109.71±8.29 %
0.5		98.68±3.80 %	94.22±7.59 %	100.25±7.51 %
0.6		93.20±6.74 %	89.46±1.12 %	94.37±1.11 %
0.8		92.89±9.83 %	90.04±1.22 %	93.49±1.21 %

Aun así existe la duda sobre porqué se tiene mejor exactitud en niveles bajos de la curva de calibración, una posible respuesta fue la existencia de un error sistemático. Para descartar esto se realizó una prueba de significancia *t*-student para comparar la media experimental con el valor verdadero del MRC. Entonces tenemos como hipótesis las siguientes:

H_0 = No existe diferencia estadísticamente significativa entre la media experimental y el valor verdadero.

H_1 = Existe diferencia estadísticamente significativa entre la media experimental y el valor verdadero.

La decisión de aceptar o rechazar H_0 se tomó mediante el uso de la ecuación **(19)**

$$t = \left| \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s} \right| \quad (19)$$

Donde

t = t – student calculada

\bar{x} = media muestral

μ = valor verdadero

s = desviación estándar muestral

n = tamaño muestral

Tabla 18 Prueba de significancia para exactitud.

Valor verdadero [mg/L]	tcalculada	ttabla	Decisión
0.1	0.61	4.3	Se acepta H_0
0.5	1.94	2.78	Se acepta H_0
0.6	12.10	3.18	Se rechaza H_0 y se acepta H_1
0.8	11.58	3.18	Se rechaza H_0 y se acepta H_1

Con lo anterior se tiene evidencia de que a concentraciones mayores del intervalo lineal se presenta una considerable aportación de error sistemático al método, esto también se deduce del análisis de residuos de la **Figura 15** donde se observa que existe mayor error en el punto 1.00 mg/L en comparación con los primeros puntos. Por lo tanto, la exactitud es relativamente baja en concentraciones altas de la curva [**Tabla 18**], aun así considerando el error asociado al MRC (2.91 %) y la precisión del método (6.7 %), se considera que el método es exacto en el intervalo lineal determinado.

3.7 Veracidad.

3.7.1 Análisis de muestras y recobro.

De las muestras analizadas solo a la muestra de la delegación Iztapalapa se le detectó formaldehído [Tabla 19].

Tabla 19 Determinación de formaldehído en muestras.

Muestra	Concentración [mg/L]
Marca 1	ND
Marca 2	ND
Marca 3	ND
Bebedero Facultad de Química	ND
Delegación Iztapalapa	0.10±0.006
Delegación Gustavo A. Madero	ND

ND: no detectado

Se procedió a hacer la fortificación de las muestras en un nivel bajo y uno alto: 0.2 mg/L y 0.8 mg/L, respectivamente. Se preparó un volumen de 5.0 mL de cada muestra; para tener 0.2 mg/L de formaldehído se adicionaron 100 µL de una disolución de 10 mg/L de HCOH y para 0.8 mg/L se tomaron 400 µL de la misma disolución de formaldehído.

Para la muestra de Iztapalapa se cuantificó una concentración de 0.1 mg/L por lo que para efectuar el experimento se tuvieron que agregar 0.1 mg/L de HCOH para el nivel bajo y 0.7 mg/L para el nivel alto.

El porcentaje de recuperación se calculó usando la ecuación **(20)**

$$\% R = \frac{C_e - C_0}{C_a} \times 100 \quad (20)$$

Donde

$\% R$ = porcentaje de recuperación

C_e = concentración del analito de la muestra fortificada

C_0 = concentración del analito medida de la muestra sin fortificar

C_a = concentración del analito adicionado a la muestra fortificada

En la **Tabla 20** se resume el porcentaje de recuperación para cada muestra, en un nivel bajo y uno alto.

Tabla 20 Porcentaje de recuperación para las muestras analizadas.

Muestra	Nivel bajo (0.2 mg/L)	Nivel Alto (0.8 mg/L)
Marca 1	124.83±3.95 %	102.14±2.88 %
Marca 2	114.00±12.02 %	100.36±6.67 %
Marca 3	86.86±2.68 %	94.39±2.37 %
Delegación Iztapalapa	92.58±16.04 %	86.09±6.27 %
Facultad de Química	85.36±1.35 %	101.42±4.05 %
Delegación Gustavo A Madero	103.12±5.36 %	96.03±3.91 %

Se observa que los recobros en niveles bajos para aguas no embotelladas son menores y por el contrario algunas aguas embotelladas que tienen recobros de hasta 124.83 %; esto podría ser un indicativo de interferencias que afectan en la cuantificación de formaldehído por SIA, por lo que se realizó una prueba t-student para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de recuperación. Como hipótesis tenemos:

H_0 = No existe diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de recuperación y el 100%

H_1 = Existe diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de recuperación y el 100%

Usando la ecuación **(21)** se calcula t_{cal} para cada muestra en los dos niveles de concentración evaluados.

$$t_{cal} = \frac{|100 - \%R|}{s\sqrt{n}} \quad (21)$$

Donde

t_{cal} = *t – student calculado*

$\%R$ = *porcentaje de recuperación*

s = *desviación estándar de las lecturas de recuperación*

n = *número de lecturas de recuperación*

Tabla 21 Prueba de significancia porcentaje de recuperación.

Muestra	0.2 mg/L		0.8 mg/L	
	t_{cal}	t_{tabla}	t_{cal}	t_{tabla}
Marca 1	3.92	4.30	2.88	4.30
Marca 2	0.77	4.30	0.08	4.30
Marca 3	2.41	4.30	1.23	4.30
Iztapalapa	0.13	4.30	1.06	3.18
Facultad de Química	5.40	4.30	0.24	3.18
Gustavo A. Madero	0.48	3.18	0.44	3.18

Se percibe que en todos los casos la t_{calc} es menor a la t_{tabla} [**Tabla 21**] excepto en la muestra de Facultad de Química, pero para las demás muestras se acepta H_0 , es decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de recuperación y el 100 %.

Para la muestra de Iztapalapa se tienen menores porcentajes de recuperación en comparación con las demás muestras, esto se puede

atribuir a una mayor presencia de interferencias, esto también nos habla de la calidad del agua que se tiene en una zona con desabasto de este líquido vital y al mantenimiento que se da a tuberías, bombas, etc.

3.7.2 Sesgo.

En la determinación del sesgo se evaluó el error sistemático del método mediante una prueba de t-student y como resultado se aceptó la hipótesis nula (H_0)

H_0 = No existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración obtenida y la concentración agregada.

H_1 = Existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración obtenida y la concentración agregada.

Para llegar a este resultado se calculó el sesgo usando la ecuación **(22)** y se llevó a cabo la prueba t-student (ecuación **(23)**) para cada muestra analizada.

$$S = X - X_a \quad (22)$$

Donde

S = sesgo

X = valor promedio de las lecturas

X_a = valor de referencia o esperado

$$t_{cal} = \frac{|X - X_a|}{s\sqrt{n}} \quad (23)$$

Donde

t_{cal} = t - student calculado

$|X - X_a|$ = valor absoluto del sesgo

s = desviación estándar de las lecturas

n = número de lecturas

Tabla 22 Prueba de significancia para sesgo.

Muestra	0.2 mg/L			0.8 mg/L		
	Sesgo	t_{cal}	t_{tabla}	Sesgo	t_{cal}	t_{tabla}
Marca 1	0.0537	3.92	4.30	0.0215	0.54	4.30
Marca 2	0.0320	0.77	4.30	-0.1945	2.10	4.30
Marca 3	-0.0223	2.41	4.30	-0.0405	1.23	4.30
Iztapalapa	-0.1035	3.7	4.30	-0.0930	1.06	3.18
Facultad de Química	-0.0253	5.41	4.30	0.0158	0.24	3.18
Gustavo A. Madero	0.0102	0.48	3.18	-0.0273	0.44	3.18

Se observa que para la mayoría de las muestra se cumple que t_{cal} es menor que t_{tabla} [**Tabla 22**] y por lo tanto el método es veraz; aunque para la muestra de Facultad de Química no se cumplió la hipótesis nula sin embargo; comparando con los resultados obtenidos en la **Tabla 21**, se puede concluir que hubo una posible contaminación o un error en la manipulación de la muestra a la concentración de 0.2 mg/L.

3.8 Estimación de la incertidumbre.

Al someter una muestra al proceso analítico, el resultado que se obtenga tendrá una incertidumbre asociada a múltiples factores; en este caso se consideró que las fuentes de incertidumbre para la determinación de formaldehído por el método SIA son: la curva de calibración y el tratamiento de la muestra; sin embargo el método y la naturaleza de la muestra hacen posible que no se requiera tratamiento alguno y por lo tanto el diagrama de Ishikawa se reduce a considerar los factores que afectan a la curva de calibración [**Figura 16**]

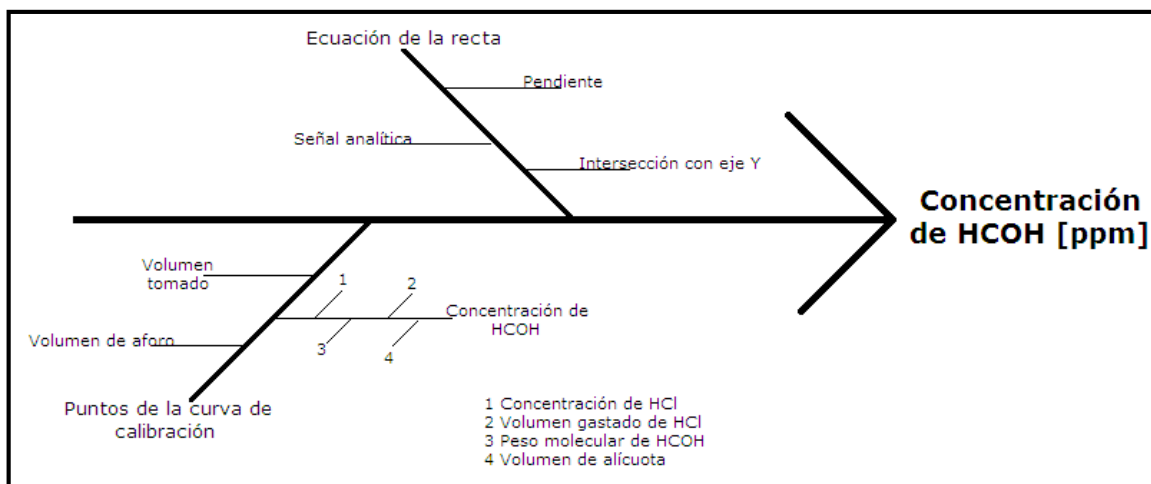


Figura 16 Diagrama de Ishikawa para el método.

3.8.1 Incertidumbre de la ecuación de la recta.

Para el cálculo de la incertidumbre de la ecuación de la recta promedio se siguió la ecuación **(24)**.

$$u(C_o) = \frac{s}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_o - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (24)$$

Donde

$u(C_o)$ = incertidumbre asociada a la curva de calibración

s = desviación estándar de los residuales

m = pendiente de la ecuación de la recta

p = número de repeticiones para cada C_o

n = número de niveles de la curva

C_o = concentración de formaldehído

\bar{C} = promedio de las concentraciones usadas en la curva

S_{xx} = suma de cuadrados de los residuales

En la **Tabla 23** se resume cada valor numérico para cada término de la ecuación, así como la incertidumbre estándar asociada a la ecuación de la recta.

Tabla 23 Incertidumbre de la ecuación de la recta.

Término	Valor numérico
<i>s</i>	104.94
<i>m</i>	2044.20
<i>p</i>	3
<i>n</i>	6
<i>C_o</i>	0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 0.80, 1.00
\bar{C}	0.48
<i>S_{xx}</i>	44047.45
<i>u (C_o)</i>	0.036 mg/L

3.8.2 Incertidumbre asociada a las disoluciones de formaldehído: disolución madre y estándares.

Para estimar la incertidumbre de los puntos de la curva de calibración se consideró información tanto experimental como reportada en informes de calibración de los materiales empleados; en la **Tabla 24** se resumen los valores empleados así como el tipo de distribución empleada en la estimación incertidumbre.

Tabla 24 Incertidumbre de materiales e instrumentos usados.

Material o Instrumento	Valor en el informe	Distribución	Incertidumbre (u)
Balanza analítica	0.1 mg	Rectangular	5.77×10^{-5} g
Bureta 25.0 mL	0.1 mL	Triangular	4.08×10^{-5} L
Pipeta 4.0 mL	0.01 mL	Triangular	4.08×10^{-6} L
Pipeta 10.0 mL	0.02 mL	Triangular	8.16×10^{-6} L
Matraz 5.0 mL	0.02 mL	Normal	0.02×10^{-5} L
Matraz 10.0 mL	0.02 mL	Normal	0.02×10^{-5} L
Micropipeta 10-100 µL	0.56 %	Triangular	2.26×10^{-8} L
Micropipeta 200 - 1000 µL	0.03 %	Triangular	2.45×10^{-8} L

Para la estimación de incertidumbre de la concentración de la disolución madre de formaldehído se consideró el modelo descrito en el **Anexo I** y a partir de este se generó la ecuación **(25)** en la que se involucran los factores que aportan incertidumbre en la concentración de la disolución madre de formaldehído.

$$\frac{u_{C_{HCOH}}}{C_{HCOH}} = \sqrt{\left(\frac{u_{C_{HCl}}}{C_{HCl}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{gastado\ HCl}}}{V_{gastado\ HCl}}\right)^2 + \left(\frac{u_{PM_{HCOH}}}{PM_{HCOH}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{alícuota\ HCOH}}}{V_{alícuota\ HCOH}}\right)^2} \quad (25)$$

Cada termino y valor de este se encuentran enlistados en el **Anexo V**, finalmente se tiene que la incertidumbre estándar para la concentración de formaldehído (madre) es $\pm 1.29 \times 10^{-4}$ mg/L.

Para cada punto de la curva se tienen asociada una incertidumbre y ésta se define con las fórmulas de la **Tabla 25**. En primer lugar se consideró que de la disolución madre se preparó una disolución de 10.00 mg/L de formaldehído (dilución 1) y de ésta los estándares necesarios para la curva de calibración (dilución 2). Se muestra el ejemplo de cálculo con la concentración de 0.05 mg/L y en la **Tabla 26** los resultados para cada punto de la curva de calibración de formaldehído. En el caso de la dilución 1 ésta siempre tendrá una incertidumbre asociada de 0.019 mg/L.

Tabla 25 Incertidumbre para el punto 0.05 mg/L de la curva.

Dilución	Modelo	Fórmula
1	$C_{10mg/L} = \frac{C_{HCOH}V_1}{V_2}$	$\frac{u_{C_{10mg/L}}}{C_{10mg/L}} = \sqrt{\left(\frac{u_{C_{HCOH}}}{C_{HCOH}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_2}}{V_2}\right)^2}$
2	$C_{0.05mg/L} = \frac{C_{10mg/L}V_1}{V_2}$	$\frac{u_{C_{0.05mg/L}}}{C_{0.05mg/L}} = \sqrt{\left(\frac{u_{C_{10mg/L}}}{C_{10mg/L}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_2}}{V_2}\right)^2}$

C =concentración, V_1 =volumen tomado, V_2 =volumen de aforo, u =incertidumbre

Tabla 26 Incertidumbre asociada a cada punto de la curva de calibración.

Estándar [mg/L]	Incertidumbre [mg/L]
0.05	1.04×10^{-4}
0.10	1.92×10^{-3}
0.30	1.88×10^{-3}
0.50	1.87×10^{-3}
0.80	1.87×10^{-3}
1.00	1.87×10^{-3}

Finalmente se tiene que la incertidumbre del método es la raíz de la suma de los cuadrados de los factores que contribuyen a la estimación de la incertidumbre (ecuación **(26)**) por el factor de cobertura (k) que determina el nivel de confianza que se utilizó, en este caso se empleó un $k=2$, es decir con un 95.0 % de confianza.

$$U_{\text{método}} = \sqrt{(u_{\text{recta}})^2 + (u_{\text{punto/curva}})^2} k \quad (26)$$

Sustituyendo los valores de la **Tabla 23** y **Tabla 26** es claro que la incertidumbre asociada a cada punto de la curva de calibración es despreciable frente a la incertidumbre de la ecuación de la recta por lo que se concluye que la incertidumbre del método sólo se atribuye a la ecuación de la recta empleada y tiene un valor de 0.07 mg/L con un 95.0 % de confianza.

4. CONCLUSIONES

Utilizando condiciones de operación previamente estudiadas y evaluando parámetros de desempeño se determinó una mejora en la optimización del método, por consiguiente se concluye que el desarrollo del método así como su validación están estrechamente relacionados.

A partir de pruebas objetivas y de todo el análisis estadístico de los resultados obtenidos se demostró que el método SIA en estudio cumple con los requisitos para los cuales fue desarrollado y por lo tanto los resultados que arroja son confiables en un 95 %.

En términos de estadística se señala que existen ciertas especies químicas que causan interferencia en la determinación de formaldehído estos son sulfito de sodio, carbonato de sodio y ácido acético, esto cuando se encuentran en igual, el doble o 10 veces más concentrados que formaldehído.

En las muestras analizadas no se logró cuantificar ni detectar presencia de formaldehído excepto en una muestra proveniente de la delegación Iztapalapa.

El análisis por inyección secuencial SIA es un método instrumental relativamente moderno y poco usado que ha demostrado la generación de resultados confiables; ofreciendo amplias ventajas frente a los métodos clásicos de análisis logrando así ser una alternativa para el análisis de rutina.

El método por inyección secuencial (SIA) desarrollado para la determinación de formaldehído en agua potable es preciso y confiable, por lo que se ofrece como una alternativa sencilla, de bajo costo y amigable con el medio ambiente.

REFERENCIAS

- A. Economou, D. T., & et.al. (2005). Sequential-Injection Analysis: Principles, Instrument Construction, and Demonstration by a Simple Experiment. *Journal of Chemical Education*, 1820-1822.
- B. E. Jiménez. (2001). La contaminación ambiental en México. Limusa. pp 61.
- B. Karlberg, G. E. (1989). Flow Injection Analysis: A Practical Guide. Holanda: Elsevier. pp 33.
- B. Ramírez. (2007). Desarrollo de metodologías de análisis por inyección secuencial para la determinación de fosfatos, arsenatos y arsenitos. En *Tesis (Licenciatura en Química)*. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 82.
- C. E. Lenehan, N. B. (2002). Sequential injection analysis. *Analyst*, 997-1020.
- C. Quintana. (1993). Elementos de Inferencia Estadística. Editorial Universidad de Costa Rica. pp 219.
- C.G. Evans, J. E. (2009). Enantioselective organocatalytic Hantzsch synthesis of polyhydroquinolines. *Organic Letters*, 2957-2959.
- Centro Nacional de Metrología . (Noviembre de 2005). Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados . Los Cués , Oro, México .
- Ciencillamente Hablando*. (31 de Octubre de 2015). Obtenido de <http://ciencillamentehablando.blogspot.mx/2010/12/algunos-fenomenos-con-luz-fluorescencia.html>
- D. Betteridge, P. B. (1987). Control of Dispersion and Variation of Reaction Coil Length in Flow Injection Analyzers by Flow Reversals. *Analytical Chemistry*, 1236-1238.
- D. C. Harris. (2006). Análisis químico cuantitativo. New York: Reverte SA. pp 716.
- E. D. Olsen. (1990). Métodos ópticos de análisis. Reverte. pp 759.
- E. G. Carrillo, A. L. (2014). Determinación de formaldehído por análisis de inyección secuencial. *Memorias Congreso Química Analítica 2014*.
- Entidad Nacional de Acreditación. (Octubre de 2014). Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005.
- Fernández, S., & Cordero, J. M. (2002). Estadística descriptiva. Madrid: ESIC Editorial. pp 566.
- G. H. Brown, E. M. (1967). Química cuantitativa. Reverte. pp 759.

- I. Angel S, U. e. (Octubre de 2010). Capacitación y validación de los métodos normalizados en la norma NMX-J-521/1-ANCE-2005. Celaya, Guanajuato, México. Obtenido de <https://www.cenam.mx/sm2010/info/carteles/sm2010-c28.pdf>
- Instituto de Salud Pública. (Diciembre de 2010). Validación de métodos y determinación **de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"**. Santiago, Chile.
- J. A. Di Rienzo, F. C. (2008). Estadística para las Ciencias Agropecuarias. Editorial Brujas. pp 358.
- J. R. Lakowicz. (2013). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science & Business Media. pp 698.
- J. Tomás-Sábado. (2010). Fundamentos de bioestadística y análisis de datos para enfermería. Univ. Autónoma de Barcelona. pp 146.
- J. W. Weaver. (1984). Analytical Methods for a Textile Laboratory. American Association of Textile Chemists and Colorists. pp 231-246.
- M. N. Namakforoosh. (2005). Metodología de la investigación. Editorial Limusa. pp 525
- M. Tikkanen. (2001). *Guidance Manual for Disposal of Chlorinated Water*. American Water Works Association.
- M. Trojanowicz. (2000). Flow Injection Analysis: Instrumentation and Applications. World Scientific. pp 481.
- M. Trojanowicz. (2008). Advances in Flow Analysis. John Wiley & Sons. pp 672.
- Manahan, S. E. (2006). Introducción a la química ambiental. Reverte. pp 158.
- Moncada, J. (2005). Estadística Para Ciencias Del Movimiento Humano. Editorial Universidad de Costa Rica. pp 14.
- N. J. Miller, J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Madrid: Pearson Educación. pp 296.
- NOM-201-SSA1-2002. (18 de Octubre de 2002). En *Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias*. Diario Oficial de la Federación.
- Q. Li, M. O. (2007). Flow-injection spectrofluorometric determination of trace amounts of formaldehyde in water after derivatization with acetoacetanilide. *Talanta* (72), 1675-1680.
- R. V. A. Orru, E. R. (2010). Synthesis of Heterocycles via Multicomponent Reactions I. Volumen 23 de Topics in Heterocyclic Chemistry. Springer Science & Business Media. pp 230-231.

- S. D. Kolev, I. D. (2008). *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*. Elsevier. pp 777.
- S. M. Ross. (2007). *Introducción a la estadística*. Barcelona: Reverte. pp 809.
- Secretaría de Salud. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. (16 de Febrero de 2011). Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos.
- V. Cerda, L. F. (2014). *Flow Analysis: A Practical Guide*. Newnes. pp 288.
- V. G. Santos, M. N. (2014). The Multicomponent Hantzsch Reaction: Comprehensive Mass & Reaction MechanismsThe Multicomponent Hantzsch Reaction: Comprehensive Mass. *Chemistry A European Journal*, 12808-12816.
- World Health Organization. (2002). *Formaldehyde*. Ginebra, Suiza.
- World Health Organization. (2005). *Formaldehyde in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. Ginebra, Suiza.
- Y. Liu, X. L. (2003). The Comparison of Fluorescent Spectra on Acetic Acid and Ethanol Solutions. *SPIE*, 526-530.

ANEXOS

Anexo I. Valoración de disolución madre de formaldehído (NOM 201-SSA1-2002)

En la sección **9.11.4.12** de la NOM 201- SSA1-2002 se establece la metodología a seguir para la valoración de una disolución de formaldehído:

1. Medir 125 mL de disolución de sulfito de sodio 1M en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Adicionar 3 gotas de indicador de timolftaleína. La disolución debe ser de un color azul pálido.
3. Añadir HCl 0,1 N gota a gota hasta que la disolución se vuelve incolora (usualmente se requieren de 2-5 gotas).
3. Adicionar exactamente 25 mL de disolución stock de formaldehído a la disolución acidificada de sulfito de sodio.
4. Titular con HCl 0,1 N hasta la desaparición de la coloración que persista 3 minutos. Efectuar 3 titulaciones y calcular el valor promedio.

Al no contar con el indicador recomendado se optó por realizar una titulación potenciométrica; se realizaron los cálculos pertinentes para usar una alícuota de 4.0 mL de formaldehído y reducir la generación de residuos.

Posteriormente se usó el método de la primera y segunda derivada para calcular los puntos finales de valoración y se empleó la siguiente ecuación para obtener la concentración de HCOH.

$$C_{HCOH} = \frac{C_{HCl} V_{gastado\ HCl} PM_{HCOH} * 1000}{V_{alícuota\ HCOH}}$$

Donde

C_{HCOH} = concentración de formaldehído en mg/L

C_{HCl} = concentración de ácido clorhídrico en mol/L

$V_{gastado\ HCl}$ = volumen gastado para llegar al punto final de valoración en L

PM_{HCOH} = peso molecular de formaldehído en g/mol

$V_{alícuota\ HCOH}$ = volumen de alícuota de formaldehído en L


Anexo II. Certificado de análisis del MRC de formaldehído.

Certificate of Analysis

Certified Reference Material

Formaldehyde IC Standard - 100mL

Product ID ICS045-100ML
 Lot LRAA8092
 Expiration Date December 31, 2017
 Storage Conditions Store at room temperature.



Analyte	Certified Value ^{1,4}	Units	k ⁵
Formaldehyde	1,000 ± 29.1	ug/mL	2.00

Sample Information

Description

The sample is ready to use.

No sample preparation is required.

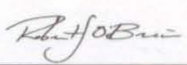
1 Certified value - based on the robust mean of round robin, interlaboratory study and analytically verified by RTC with associated uncertainties from the preparation and analytical procedures.
 4 Ucm - Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (Ucm) corresponding to the 95% confidence interval. Ucm is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a t-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.
 5 k: Coverage factor derived from a t-distribution table, based on the degrees of freedom of the data set. Confidence interval = 95%

Traceability: The standard was manufactured under an ISO/IEC 17025:2005 certified quality system. The balance used to weigh raw materials is accurate to +/- 0.0001g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

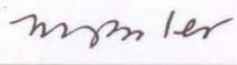
Homogeneity: Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared using a one-way analysis of variance approach as described by TNI EL-V3-2009 Appendix A.2. See Instructions for minimum sub-sample size.

THIS PRODUCT WAS DESIGNED, PRODUCED AND VERIFIED FOR ACCURACY AND STABILITY IN ACCORDANCE WITH ISO/IEC 17025:2005 (A-Class Cert AT-1467) and ISO GUIDE 34:2009 (A-Class Cert AR-1470).

MSDS reports for components comprising greater than 1.0% of the solution or 0.1% for components known to be carcinogens are available upon request.






 Robert O'Brien - QC Supervisor



 Mark Pooler - QA Supervisor

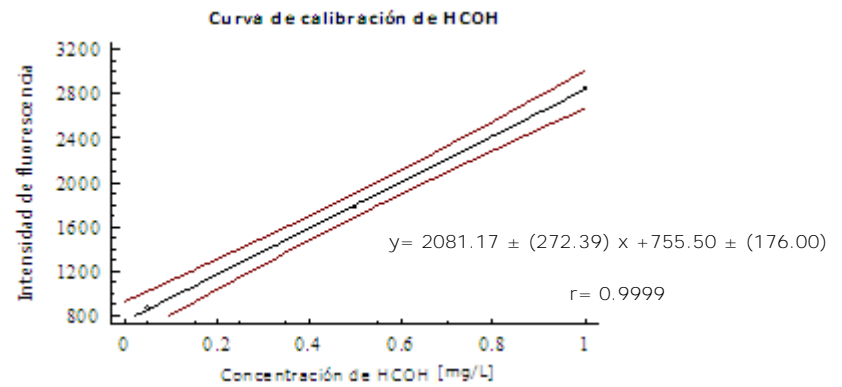
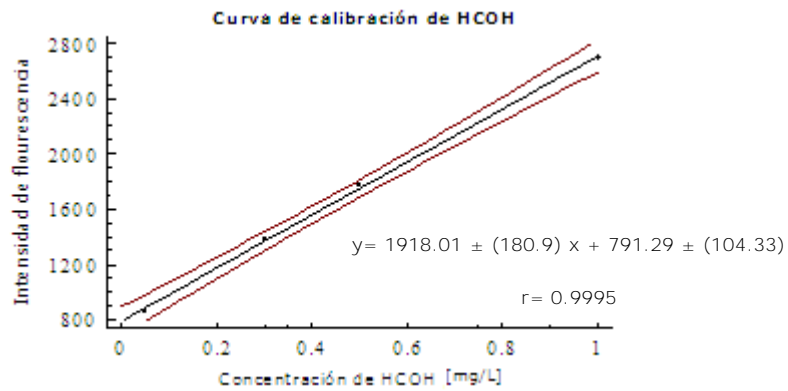
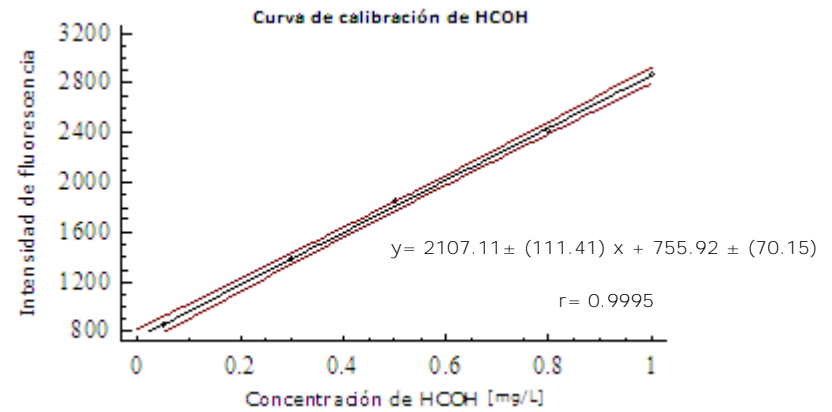
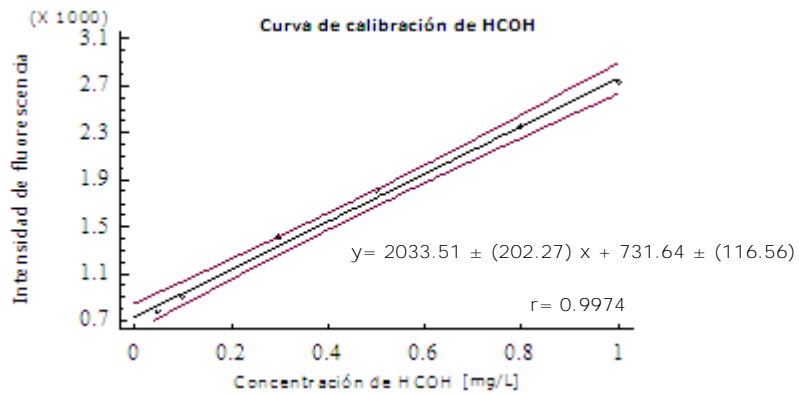
Certification Date May 07, 2015
Version 970-572015


2931 Soldier Springs Rd. Laramie, Wyoming 82070 USA
 307-742-5452
 r1techgroup@sial.com www.sigma-aldrich.com

Page 1 of 1

Anexo III. Curvas de calibración



Anexo IV. Tabla I Valores críticos de F para un contraste de dos colas.

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

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

Anexo V. Incertidumbre de la C_{HCOH} de la disolución madre.

$$\frac{u_{C_{HCOH}}}{C_{HCOH}} = \sqrt{\left(\frac{u_{C_{HCl}}}{C_{HCl}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{gastado\ HCl}}}{V_{gastado\ HCl}}\right)^2 + \left(\frac{u_{PM_{HCOH}}}{PM_{HCOH}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{alícuota\ HCOH}}}{V_{alícuota\ HCOH}}\right)^2}$$

- Incertidumbre de la concentración de HCl ($u_{C_{HCl}}$).

$$C_{HCl} = \frac{C_{NaOH} V_{gastado\ NaOH}}{V_{alícuota\ HCl}} \quad \frac{u_{C_{HCl}}}{C_{HCl}} = \sqrt{\left(\frac{u_{C_{NaOH}}}{C_{NaOH}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{gastado\ NaOH}}}{V_{gastado\ NaOH}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{alícuota\ HCl}}}{V_{alícuota\ HCl}}\right)^2}$$

$$C_{NaOH} = \frac{m_{BFK}}{PM_{BFK} V_{gastado\ NaOH}} \quad \frac{u_{C_{NaOH}}}{C_{NaOH}} = \sqrt{\left(\frac{u_{m_{BFK}}}{m_{BFK}}\right)^2 + \left(\frac{u_{PM_{BFK}}}{PM_{BFK}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{gastado\ NaOH}}}{V_{gastado\ NaOH}}\right)^2}$$

$$u_{m_{BFK}} = \frac{1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$$

$$u_{PM_{BFK}} = \sqrt{(8u_C)^2 + (5u_H)^2 + (4u_O)^2 + (u_K)^2}$$

$$u_{V_{gastado\ NaOH}} = \frac{1 \times 10^{-4}}{\sqrt{6}}$$

- Incertidumbre del volumen gastado de HCl para llegar al punto final de valoración ($u_{V_{gastado\ HCl}}$).

$$u_{V_{gastado\ HCl}} = \frac{1 \times 10^{-4}}{\sqrt{6}}$$

- Incertidumbre del peso molecular del formaldehído ($u_{PM_{HCOH}}$)

$$u_{PM_{HCOH}} = \sqrt{(u_C)^2 + (2u_H)^2 + (u_O)^2}$$

- Incertidumbre de la alícuota de formaldehído ($u_{V_{alícuota\ HCOH}}$)

$$u_{V_{alícuota\ HCOH}} = \frac{1 \times 10^{-5}}{\sqrt{6}}$$

Anexo VI. Tratamiento de residuos.

Como ya se ha mencionado en el Capítulo 1 de este trabajo, la reacción de Hantzsch es una reacción multicomponentes en la cual todos los reactivos empleados forman parte del producto [**Figura 2**] por lo que no se generan subproductos.

Con el sistema SIA por cada análisis de una muestra se generan 2.0 mL de residuos y la concentración del producto de reacción es del orden de 2.3 mmol/L y según lo establecido por la NOM-052-SEMARNAT-2005 los residuos obtenidos no presentan características CRETIB.

El producto de la reacción se puede recuperar mediante una recristalización con etanol, sin embargo la cantidad obtenida sería mínima e implicaría el gasto de un disolvente orgánico, por lo que se sugiere la evaporación del disolvente (H_2O) mientras que el sólido que se obtenga se incinera o confina.