

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Adaptación a microescala de dos métodos espectrofotométricos para la
determinación de fosfatos en agua.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA QUÍMICA**

PRESENTA:

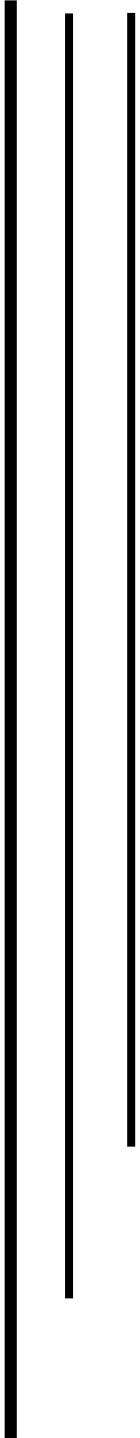
Villarnobo González Karina Edahi

Asesor:

Dr. Julio César Morales Mejía

Co-asesora:

Dra. María Gabriela Vargas Martínez



CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Adaptación a microescala de dos métodos espectrofotométricos para la determinación de fosfatos en agua

Que presenta la pasante: **Karina Edahi Villarnobo González**
Con número de cuenta: **311222577** para obtener el Título de: **Ingeniería Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Dr. José de Jesús Pérez Saavedra	
SECRETARIO	Dr. Julio César Morales Mejía	
1er. SUPLENTE	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Claudia Pérez Garrido	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**


Adaptación a microescala de dos métodos espectrofotométricos para la determinación de fosfatos en agua

Que presenta la pasante: **Karina Edahi Villarnobo González**
Con número de cuenta: **311222577** para obtener el Título de: **Ingeniería Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María Guadalupe Pérez Caballero</u>	_____
VOCAL	<u>Dr. José de Jesús Pérez Saavedra</u>	<u></u>
SECRETARIO	<u>Dr. Julio César Morales Mejía</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Claudia Pérez Garrido</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**


Adaptación a microescala de dos métodos espectrofotométricos para la determinación de fosfatos en agua

Que presenta la pasante: **Karina Edahi Villarnobo González**
Con número de cuenta: **311222577** para obtener el Título de: **Ingeniería Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María Guadalupe Pérez Caballero</u>	_____
VOCAL	<u>Dr. José de Jesús Pérez Saavedra</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dr. Julio César Morales Mejía</u>	_____ 
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Claudia Pérez Garrido</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Adaptación a microescala de dos métodos espectrofotométricos para la determinación de fosfatos en agua

Que presenta la pasante: **Karina Edahi Villarnobo González**
Con número de cuenta: **311222577** para obtener el Título de: **Ingeniería Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	_____
VOCAL	Dr. José de Jesús Pérez Saavedra	_____
SECRETARIO	Dr. Julio César Morales Mejía	_____
1er. SUPLENTE	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Claudia Pérez Garrido	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Adaptación a microescala de dos métodos espectrofotométricos para la determinación de fosfatos en agua

Que presenta la pasante: **Karina Edahi Villarnobo González**
Con número de cuenta: **311222577** para obtener el Título de: **Ingeniería Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	_____
VOCAL	Dr. José de Jesús Pérez Saavedra	_____
SECRETARIO	Dr. Julio César Morales Mejía	_____
1er. SUPLENTE	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	_____
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Claudia Pérez Garrido	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

*Hijo mío, si recibieres mis palabras,
Y mis mandatos guardares dentro de ti.
Entonces entenderás el temor de Jehová,
Y hallarás el conocimiento de Dios.
Porque Jehová da la sabiduría,
Y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.
Proverbios 2:1 y Proverbios 2:5-6*

Agradecimientos

Antes que nada quiero agradecer a Dios por que sin él nada de esto hubiera sido posible. A lo largo de mi vida ha habido personas la cuales me han ayudado a forjar mis cimientos y principios que conocen a la perfección mis valores, pasiones y carácter, y que son parte de mis alegrías y tristezas, ayudándome a superar cada obstáculo que se presenta durante la travesía para conquistar mis sueños. Por esta y muchas otras razones quiero agradecer principalmente a mis padres, Alfredo y Silvia, mis hermanos, Atzua, Michelle, Yahel y Paola, quienes me han brindado su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

También quiero agradecer tanto a mi asesor Julio y a mi co-asesora Gabriela, por haberme permitido realizar la tesis con ellos, guiándome durante el trabajo y aclarando cada duda que se me presento durante el proceso.

Además de agradezco al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnología (PAPIIT) de la UNAM Clave del proyecto IA106318, nombre del proyecto: Depositado de TiO_2 sobre soportes densos para la oxidación fotocatalítica solar de contaminantes de preocupación emergente en agua. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Índice general

Resumen.	1
Abstrat.	1
Introducción.	1
Justificación.	2
Objetivos generales.	2
Objetivos particulares.	2
Hipótesis.	3
Capítulo 1. Antecedentes.	4
1.1. Eutrofización.	5
1.1.1. Fósforo en el agua	14
1.1.2. Métodos convencionales para la cuantificación de fosfatos.	15
1.2. Kits químicos comerciales.	18
1.3. Microescala.	19
1.3.1. Importancia y métodos de empleo.	19
1.4. Espectrofotometría.	20
1.5 Validación de un método analítico.	20
Capítulo 2. Desarrollo experimental.	26
2.1. Equipos, materiales y reactivos.	26
2.2. Diagrama de flujo.	28

2.3. Metodología empleada en los kits (Hanna y Merck) para el análisis de fosfatos en agua.	29
2.3.1. Protocolo original del kit de Hanna.	29
2.3.2. Protocolo original del kit de Merck.	30
2.3.3. Método para la adaptación a microescala de los kits.	32
2.4. Procedimiento experimental de los kits.	32
2.4.1. Linealidad del sistema.	32
2.4.2. Precisión del sistema.	34
2.4.3. Linealidad del método.	36
2.4.4. Precisión del método.	37
2.4.5. Exactitud.	37
2.4.6. Sensibilidad.	37
2.4.7. Límite de detección.	37
2.4.8. Límite de cuantificación.	38
Capítulo 3. Resultados y análisis.	39
3.1. Linealidad del sistema a microescala.	41
3.2. Precisión del sistema a microescala.	45
3.3. Linealidad del método a microescala.	47
3.3.1. Curva de calibración Hanna.	47
3.3.3. Recobro Hanna.	49
3.3.2. Curva de calibración Merck.	51
3.3.4. Recobro Merck.	54
3.3.5. Efecto de Matriz Hanna.	56

3.3.6. Efecto de Matriz Merck.	57
3.4. Precisión del método a microescala.	59
3.5. Exactitud.	59
3.6. Sensibilidad.	59
3.7. Límite de detección.	60
3.8. Límite de cuantificación.	60
3.9. Comparación entre las adaptaciones a microescala.	60
Conclusiones.	63
Referencias.	64
Anexo.	67

Resumen

En este trabajo se realizó una simplificación de los kits comerciales Hanna (HI93713-0) y de Merck (1.14848) a microescala, ambos basados en los métodos del ácido ascórbico para determinar fosfatos en agua. El resultado de la valoración corrobora la confiabilidad del método a microescala, con la finalidad de que pueda utilizarse en cualquier laboratorio de tratamiento de aguas como en el laboratorio de la asignatura de Tratamiento de Aguas en esta Facultad.

Abstract

In this work, it was performed micro-volumen reduction of the Hanna (HI93713-0) and Merck (1.14848) commercial kits, both based on ascorbic acid methods to determine phosphates in water. The results of the validation corroborated the reliability of the microscale method, so that it can be used in any laboratory of water and wastewater analysis, in example, in the laboratory of the course Water Treatment at this Faculty.

Introducción

En la actualidad muchos de los cuerpos de agua presentan excesos de nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo los cuales generan la eutrofización (proceso de deterioro de la calidad del agua por exceso de nutrientes), ejerciendo grandes impactos ambientales, sanitarios y económicos a nivel regional (Ledesma, 2013). Entre ellos se encuentran la relación causa y efecto entre el consumo de aguas fosfatadas y el aumento de casos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas, además de daño renal y osteoporosis (Bolaños, 2017). Por ello es necesario mantener valores bajos de fosfatos en el agua menores a 0.025 mg/L de acuerdo con el diario oficial de la federación (DOF, 2001), además de prevenir la formación de ácido fosfórico para los procesos de producción, como son la industria alimenticia y la farmacéutica, lo cual contribuye al deterioro de las tuberías y/o alterar el producto final.

El uso de microorganismos inmovilizadores en diferentes soportes para la remediación biológica de aguas en la eliminación de contaminantes, principalmente fósforo y nitrógeno es una técnica ampliamente utilizada en el tratamiento de aguas residuales, por lo que medir

el nivel de fosfatos a lo largo de la operación de los reactores biológicos, permite evaluar la eficiencia de los mismo.

Justificación

Con la finalidad de reducir tanto los costos de análisis, así como los residuos del laboratorio se propuso la reducción a microescala de los kits comerciales Hanna (HI93713-0) y Merck (1.14848), para la cuantificación de fosfatos. Una vez obtenidos los resultados se calcularon los parámetros estadísticos adecuados de acuerdo con el Centro Nacional de Metrología (2005) y el Colegio de Químicos Fármaco Biólogos de México (Colegio de QFB's de México) (2016), para realizar la validación de ambos métodos y así determinar si son confiables para la realización de análisis rutinarios.

Objetivo general

- ✚ Reducir el procedimiento de análisis de fosfatos en agua a microescala con base en dos métodos espectrofotométricos y realizar parte de la validación, con la finalidad de determinar su confiabilidad para el análisis rutinario.

Objetivos particulares

- ✚ Proponer la serie de estándares y sistemas adecuados a través de un análisis estadístico con la finalidad de realizar la reducción a microescala de los kits Hanna y Merck.
- ✚ Evaluar la linealidad, exactitud, precisión, sesgo, sensibilidad y límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), a través de la validación del método, para las adaptaciones a microescala propuestas.
- ✚ Contribuir a la disminución de los residuos generados en los laboratorios de análisis de calidad del agua a través de aminorar los reactivos utilizados para no generar tanta contaminación con estos análisis.
- ✚ Abatir los costos de cada prueba, con la implementación del análisis a microescala, para optimizar los recursos.

Hipótesis

- ✚ Si el método a microescala cumple con los parámetros necesarios de validación, entonces podrá ser aplicado de forma confiable.

Capítulo 1. Antecedentes

Un contaminante se define como “la presencia en el aire, agua o suelo de sustancias o formas de energías no deseables en concentraciones tales que puedan afectar el entorno” (Dolores, 2011); sin embargo, hoy en día este término es muy amplio ya que va desde una amplia serie de compuestos sintéticos hasta una abundancia de nutrientes naturales,

Una de las clasificaciones de los contaminantes constituye los siguientes dos grandes grupos (Moriarty, 1990):

- ✚ Los que afectan al medio físico.
- ✚ Los que son directamente tóxicos a los organismos (seres vivos).

Además, los contaminantes pueden actuar al menos de tres formas diferentes (Kiely, 1999):

- ✚ Se establecen y provocan la muerte de organismos.
- ✚ Resultan muy tóxicos y matan directamente a otros organismos.
- ✚ Influyen indirectamente en los organismos.

Los contaminantes de interés en el presente proyecto son tanto los orgánicos en el agua, ya que estos se descomponen en presencia de oxígeno mediante la actividad bacteriana, liberando con ello nutrientes como los nitratos y los fosfatos (Kiely,1999), como los inorgánicos como fertilización y algunos productos farmacéuticos, pues ellos pueden provocar la eutrofización en cuerpos de aguas receptoras de descargas contaminadas.

1.1 Eutrofización

La eutrofización es el proceso en el cual el agua es enriquecida con nutrientes, que permiten el crecimiento de algas y plantas acuáticas, ejerciendo grandes impactos ambientales, sanitarios y económicos a escala regional (Barrientos, 2013). Existen diversos nutrientes que ayudan al crecimiento de las plantas (Moreno,2010), éstos son;

- ✚ los macronutrientes nitrógeno (N) y el fosforo (P)
- ✚ micronutrientes o también conocidos como oligoelementos.

Estas son sustancias que pueden actuar como contaminantes si se encuentran en altas concentraciones, ya que provocan el crecimiento desmedido de la flora, es decir si existen grandes cantidades de nitrógeno y fósforo, el crecimiento vegetal aumenta de forma anormal cubriendo la superficie e impidiendo el paso de la luz y la oxigenación del cuerpo de agua, en ocasiones la reducción alarmante de la transparencia a la luz aumenta la turbidez y se oscurece el agua, lo cual puede provocar la muerte de la vegetación acuática, la cual se va al fondo donde se descompone en condiciones anaerobias (Moreno, 2010).

Hay algunos factores que influyen a la aceleración de la eutrofización:

- 1.- Estado trófico (la relación entre el estado de nutrientes y el crecimiento de la materia orgánica que existe).
- 2.- Nutrientes en la masa de agua.
- 3.- Susceptibilidad a la temperatura y estratificación del oxígeno.

Sin embargo existen otros como lo son (Mas, 2017)

- 1.- Clima
- 2.- Profundidad
- 3.- Características del área de drenaje
- 4.- Geología

- ***Estado trófico.***

Con el transcurso del tiempo la acumulación de sedimentos en el fondo y la alta tasa de evaporación provocada por las plantas de la superficie, genera el desecamiento del lago y

su transformación en pantano; éste es un proceso natural el cual es acelerado por la presencia de nutrientes (Moreno, 2010) como lo muestra la Figura 1. Por la necesidad de conocer el nivel trófico en los que se encuentran los cuerpos de agua, se crea el índice de estado trófico (TRIX), éste es un índice de variables múltiples propuesto por Vollenwerder en 1998 que continua vigente, el cual analiza la condición ambiental y la estimación de grado de deterioro de los sistemas acuosos utilizando los criterios de la Tabla 1.

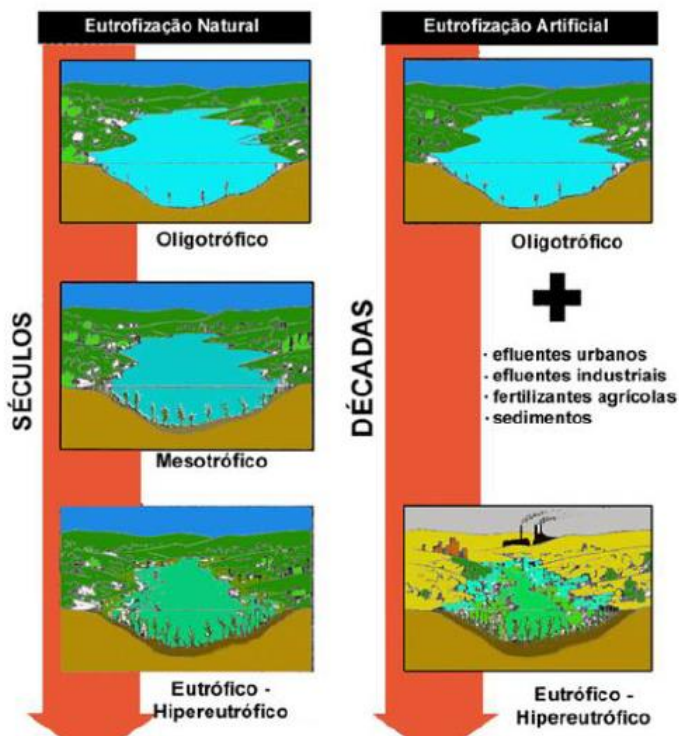


Figura 1. Estados Tróficos en eutrofización natural y cultural (Miranda, 2018).

Algunas características del agua en los estados tróficos son (Nebel y Wright, 1999)

✚ Características del estado Oligotrófico

- Agua clara
- Baja concentración de nutrientes
- Actividad biológica mínima
- Concentración de oxígeno adecuada
- Mucha penetración de luz

✚ Características del estado Mesotrófico

Mayor concentración de nutrientes

Aumento de la actividad biológica

Agua clara

Concentración de oxígeno media

Penetración de luz

✚ Características del estado Eutrófico

Concentración excesiva de nutrientes

Explosión de actividad biológica

Agua turbia

Baja concentración de oxígeno en profundidad

Poca penetración de luz

✚ Características del estado Hipereutrófico

Concentración altísima de nutrientes

Explosión de actividad biológica

Muy alta turbidez en el agua.

Muy baja concentración de oxígeno en profundidad

Muy pobre penetración de luz

En la Tabla 1 se pueden ver los valores límites para la clasificación de distintas categorías tróficas establecidos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE).

Tabla 1: Criterios de la OCDE para la clasificación trófica.

Categoría trófica	P _t (µg/L)	Clorofila (µg/L)		Transparencia D _s (m)	
		Media	Máxima	Media	Mínima
Ultraoligotróficos	< 4.0	< 1.0	< 2.5	6 >12.0	> 6.0
Oligotrófico	< 10.0	< 2.5	< 8	> 6.0	> 3.0
Mesotrófico	10-35	2.5 – 8	8.0 – 25	6.0 - 3.0	3.0 - 1.5
Eutrófico	35-100	25 – 75	25 – 75	3.0 - 1.5	1.5 - 0.7
Hipertrófico	> 100	> 75	> 75	< 1.5	< 0.7

Fuente: Miranda, 2018., P_t=fosforo total

- ***Nutrientes en el agua***

Existen diferentes sustancias químicas en los cuerpos del agua, pero estas varían dependiendo de tanto de la posición geográfica, su origen, así como del tipo de agua que sea. Un claro ejemplo de esto se presenta en la Tabla 2, y en las figuras 2 y 3.

Tabla 2. Química del agua en algunos manantiales de cuenca de Rio Duero Michoacán
(García, 2016)”

Nº	Muestra	T (°C)	pH	Conductividad eléctrica (mS/m)	Nitratos (meq/L)	Oxígeno disuelto	Saturación de oxígeno (%)	Cloruros (meq/L)	Sulfatos (meq/L)	Magnesio (meq/L)	Potasio (meq/L)	Sodio (meq/L)
1	Huecato	15.62	7.30	1.20	6.12	5.90	70.80	0.10	0.07	0.38	0.04	0.04
2	Quitzipapicho	17.00	7.30	1.31	4.90	6.85	84.60	0.11	0.07	0.45	0.06	0.45
3	Ostakuaro	17.06	7.60	1.43	5.05	6.68	82.60	0.08	0.07	0.45	0.05	0.44
4	Echorgaricho	16.71	7.20	1.48	5.14	6.12	82.40	0.08	0.09	0.45	0.02	0.44
5	Kuinio Chico	20.98	6.80	1.93	6.74	4.49	75.10	0.18	0.22	0.90	0.03	0.54



Figura 2. Ubicación geográfica de cuenca de Río Duero, Fuente: García (2016)

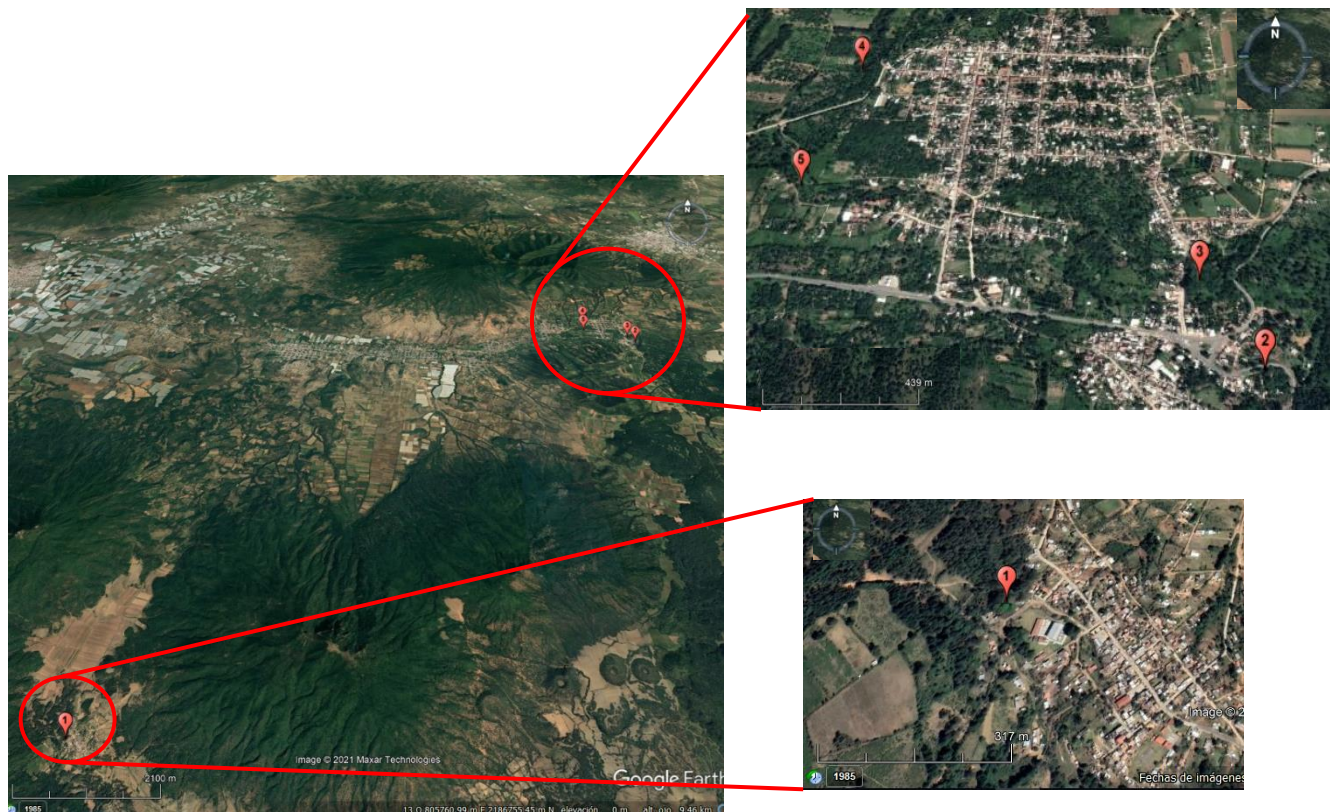


Figura 3. Ubicación geográfica de manantiales cuenca de Río Duero en Google Earth, Datos obtenidos por: García (2016)

Según estudios de Ferguson (1968), se considera al fósforo como el responsable principal en la eutrofización en aguas de lagos y embalses, el cual proviene principalmente de las aguas residuales domésticas y agrícolas (Tabla 3).

Tabla3. Origen del nitrógeno y fósforo en medio acuático (Ferguson, 1968).

Fuente	Fósforo (10^6 kg/año)	Nitrógeno (10^6 de kg/año)
Natural	245-711	1.035-4.210
Origen Antropogénico	686-1.015	3.990
Aguas residuales domésticas	387-446	1.330
Escurrecimientos de zonas urbanos	19	200
Tierras cultivadas	110-380	2.040
Zonas ganaderas	170	420
Total	931-1.726	5.020-8.200

Fuente: Ferguson, 1968.

La clasificación del estado trófico se puede dar por diferentes formas; una de ellas es por los nutrientes que se encuentran en el agua; normalmente se basa en el nutriente que *representan, el factor limitante en la mayoría de los casos es el fósforo*, criterio que sigue vigente hasta nuestros días (Janus y Vollrnweider, 1981). Otra forma de determinar el estado trófico de un cuerpo de agua es basarse directamente en sus niveles de fosfatos tal como muestra la figura 4, en donde se observa cómo cambia al aumentar la cantidad de fósforo el estado trófico hasta llegar a un estado hipertrófico.

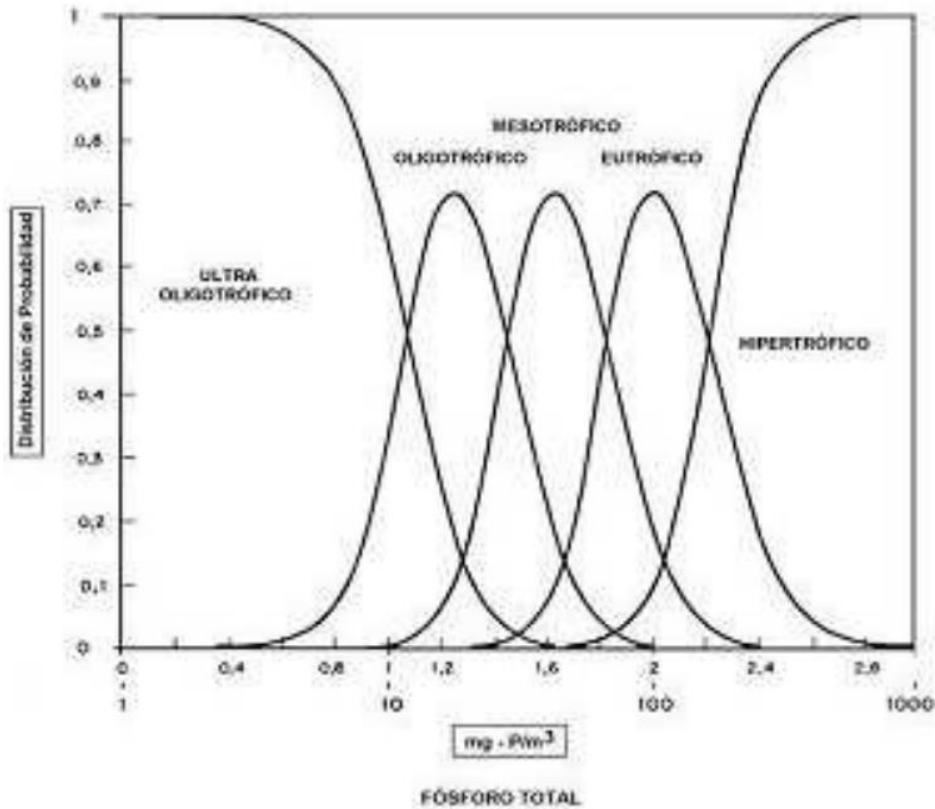


Figura 4. Distribución probabilística de las categorías tróficas basado en la concentración de fósforo. Fuente: Moreno (2010).

- ***Susceptibilidad a la temperatura y estratificación del oxígeno.***

Es importante la temperatura en el proceso de eutrofización, ya que puede influir al crecimiento tanto de plantas como de microorganismos; es decir, al estar a una temperatura cálida, tanto las plantas como los microorganismos tienden a estar en condiciones óptimas para su reproducción; mientras que, cuando se encuentran a temperaturas bajas, la reproducción de dichos organismos disminuye drásticamente (Moreno, 2010).

Cabe mencionar que, al haber mayor cantidad de plantas fotosintéticas, se crea una capa en la superficie del agua que puede evitar que la luz pase hasta aquella que se encuentran en la parte baja, por lo que éstas se descomponen y el oxígeno disuelto en el agua disminuye notoriamente; esto es provocado por la actividad bacteriana aerobia, aunque se compensa por la difusión del oxígeno de la superficie y de las zonas cercanas con mayor elevación.

concentración de este gas. No obstante, este proceso es lento y cada que el nivel de oxígeno desciende, se multiplican las bacterias anaerobias, capaces de oxidar compuestos orgánicos sin presencia de oxígeno, dando como resultado productos finales como son; el hidrógeno, el metano, el sulfuro y el amoníaco los cuales resultan tóxicos para la mayoría de los organismos superiores, esto puede causar la extinción de tanto flora como fauna (Kiely, 1999).

Por otra parte, las principales causas de la eutrofización según Moreno F. J., Quintero M. y A. López C. (2010), son las siguientes:

- ✚ La descarga de aguas residuales, ya que al ser ricas en nutrientes contribuyen al cambio trófico del cuerpo de agua receptor.
- ✚ El uso excesivo de fertilizantes que genera una contaminación del agua fundamentalmente mediante el aporte de nitrógeno (en forma de sales de nitrato y amonio) y fósforo (como fosfato).
- ✚ La deforestación y la erosión en suelos agrícolas; esto influye en la carga de nutrientes, ya que los escurrimientos lava la capa fértil al pasar por una tierra que no tiene protección, llevándose consigo los nutrientes de la misma.
- ✚ La presencia de gases ambientales tales como óxidos de nitrógeno (NO_x) y óxidos de azufre (SO_x), ya que, forman los iones (NO_3^-) e ion (SO_4^{-2}), al entrar al contacto con el agua atmosférica; Dicho iones forman sales solubles al alcanzar el suelo y reaccionar con los cationes del mismo, generando un empobrecimiento de dichos iones; dichas sales son volcadas fácilmente en los cuerpos de aguas, dando lugar a un proceso de eutrofización.

- **Alcalinidad**

Los lagos eutróficos que son ricos en materia orgánica poseen valores de pHs bajos, (aguas ácidas). Según el grado de eutrofización que tengan de 3.3 a 4.5 en aguas turbias o pantanos, pueden presentar efectos letales a pHs menores a 4.5 o superiores a 9.5.

El pH de las aguas naturales se debe a las características de los suelos que atraviesan. Las aguas calcáreas tienen un pH elevado, las que discurren por terrenos pobres en caliza o silicatos tienen un pH próximo a 7 o inferior, y las aguas de ciertas regiones volcánicas suelen ser ácidas; sin embargo, *el pH en las aguas contaminadas disminuye con la formación de ácido fosfórico* (Moreta, 2008).

Para determinar las especies que predominan en estas aguas se usa como apoyo un diagrama de distribución de especies, el cual indica que a pH de 5 la especie formada es H_2PO_4 (Figura 5).

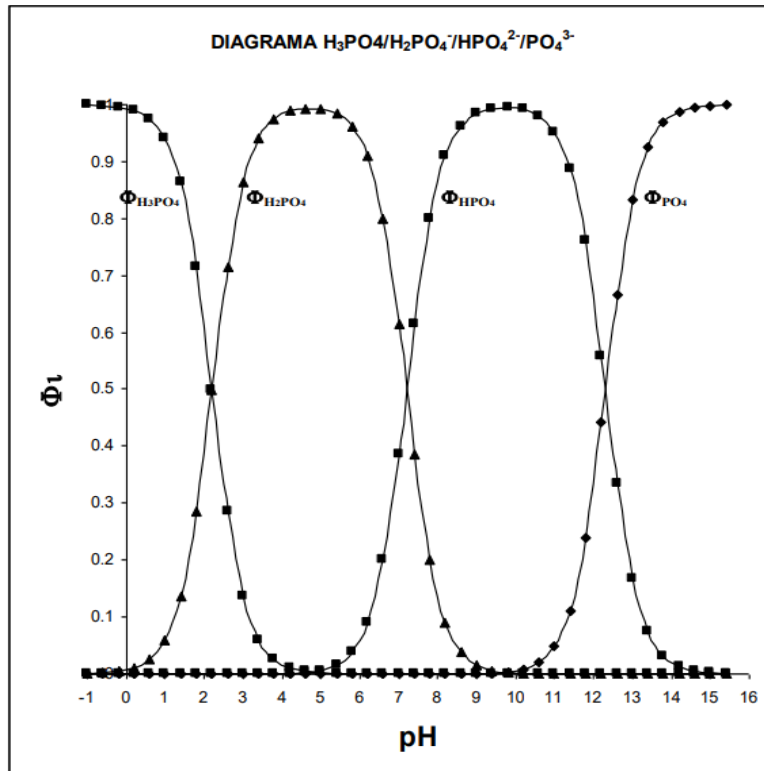


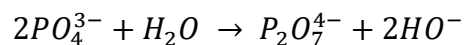
Figura 5. Diagrama de predicción de especies del PO_4 , valores de pH a 25°C (Zárate.2010)

1.1.1 Fósforo en el agua.

El fósforo puede usarse para determinar la categoría trófica de un cuerpo de agua, así mismo para determinar el grado de eutrofización. Este elemento se encuentra presente en el agua principalmente como fosfatos en el agua, los cuales pueden clasificarse de la siguiente forma:

- ✚ Ortofosfatos
- ✚ Fosfatos condensados (piro, meta y polifosfatos)
- ✚ Fosfatos orgánicos

La forma más sencilla en la que se encuentran los fosfatos en el agua son los ortofosfatos, éstos se representan como PO_4^{3-} . Mientras de los Pirofosfatos ($P_2O_7^{4-}$), son el primer miembro de la cadena de polifosfatos y se producen por la condensación de los anteriores, mediante la siguiente reacción:



Los polifosfatos pueden disminuir la concentración de equilibrio del calcio y evitar la precipitación de carbonato de calcio en tuberías; esta habilidad es utilizada en varios detergentes para evitar precipitados que afectan en su mecanismo de limpieza (Orozco, Pérez, Nieves, 2003).

Entre las fuentes de fósforo se tiene:

- ✚ Orina.
- ✚ Detergentes.
- ✚ Fertilizantes.
- ✚ Aditivos para el tratamiento de aguas potables.
- ✚ Medicamentos.

Como el fósforo puede estimular el crecimiento de algas fotosintéticas causando posteriormente la eutrofización es importante la reducción del fosfato total en aguas residuales urbanas a 2 mg PO_4^{3-} /L, éste se puede eliminar a través de una precipitación química a partir de la adición de sales metálicas entre ellos el cloruro férrico. (Krely, 1999).

1.1.2 Métodos convencionales para la cuantificación de fosfatos

Por lo visto con anterioridad es importante la cuantificación de fosfatos en el agua, por lo que, en ciertas ocasiones, es necesario la utilización de un filtro de membrana de 0.45µm diámetro de poro medio, ya que permite la separación de los fosfatos disueltos y los suspendidos, ya que la turbidez del agua afecta a la medición de los fosfatos disueltos. Los fosfatos suspendidos por lo general se obtienen por diferencia. (DOF, 2001).

Para la determinación de fosfato existen diferentes métodos, los cuales se agrupan en 2 pasos, (DOF, 2001):

- a) Proceso digestivo para la liberación de fosfatos.
- b) Determinación colorimétrica de fosfatos.

Estos consisten en la formación química de un complejo, el cual permite a través de su color medir la absorbancia y con ella obtener la concentración.

Para los procesos donde no existen sólidos suspendidos en el agua no es necesario una pre-digestión u oxidación, ya que esa sólo se da, si existe materia orgánica en grandes cantidades en el agua. Para la selección del método empleado se toma como base la concentración de fosfatos que se vaya a medir, por ejemplo, los se indica en la Tabla 4:

Tabla4. Métodos de cuantificación de fosfatos

Rango (mgP/L)	Método
1 – 20	Método del ácido vanadomolibdofosfórico
0.01- 20	Método de cloruro estañoso
0.01-6	Método de ácido ascórbico

Basada en Clescerl, Greenber, Eaton, (1992).

- ***Método del ácido vanadomolibdofosfórico***

Basados en el diario oficial de la federación (DOF, 2001), se requiere preparar una curva de calibración entre los intervalos 1 a 20 mg PO₄³⁻/L con un mínimo de 4 puntos además del valor cero, por lo que se preparan soluciones estándar en las cuales hay 1-2 mg/L de diferencia entre una y otra.

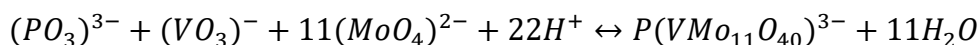
Preparación de soluciones

- Disolución de ácido clorhídrico (1:1), agregar 100 mL de ácido concentrado a 100 mL de agua lentamente.
- Disolución de heptamolibdato de amonio. Pesar 25 g de heptamolibdato de amonio y disolver en 300 mL de agua.
- Disolución de cloruro estañoso. Pesar 1.25 g de metavanadato de amonio y diluir en 300 mL de agua, calentar hasta temperatura de ebullición; enfriar y añadir 330 mL de ácido clorhídrico concentrado; dejar enfriar a temperatura ambiente.

Procedimiento:

1. A 100 mL de muestra de una concentración no mayor a 20 µg de P, libre de color y de turbidez, agregar una gota de fenolftaleína, si ésta presenta un color rosado neutralizar con una disolución de ácido fuerte.
2. Adicionar 4 mL de disolución de heptamolibdato de amonio tetrahidrolizado y 0.5 mL (10 gotas) de disolución de cloruro estañoso a temperatura ambiente y agitar fuertemente.
3. Después de 10 minutos de haber desarrollado el color, medir, mantener el mismo tiempo de medición durante toda la experimentación utilizando un espectrofotómetro a 690 nm, utilizar como blanco agua.

Reacción:



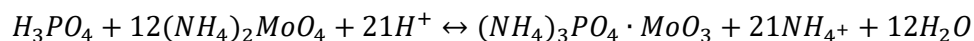
- ***Método de cloruro estañoso***

El método está basados en el Diario Oficial de la Federación (DOF, 2001) y el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Clescerl, 1992)

Procedimiento:

1. Medir el pH de la muestra, si éste es mayor a 10 adicionar una gota de fenolftaleína a 50mL de la muestra y después eliminar el color rosa con una disolución de ácido clorhídrico (1:1), antes de diluir a 100 mL.
2. Remover el color de la muestra con 20 mg de carbón activado a una muestra de 50 mL en un matraz Erlenmeyer y agitar por 5 minutos, se filtra para remover el carbón activado.
3. Tomar una alícuota que contenga de 0.5 a 1,0 mg de fósforo en un matraz volumétrico de 50 mL, añadir 10mL de la disolución reactivo vanado-molibdato y diluir hasta la marca de agua.
4. Después de 10 minutos, medir la absorbancia; es importante mantener el mismo tiempo para todas las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda fija entre 400 y 490 nm.

Reacción:



- ***Método del ácido ascórbico***

Con base en lo descrito en el libro “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (Clescerl, Greenber, Eaton, 1992), este método consiste en que el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio de potasio reaccionan a azul de molibdeno intensamente coloreado por ácido ascórbico. Se debe preparar una curva de calibración de 5 puntos por lo menos.

Preparación de soluciones:

1. Solución de ácido sulfúrico a 5N: diluir 70 mL de H₂SO₄ concentrado en 500 mL agua destilada.
2. Solución de tartrato de amonio de potasio: disolver 1.3715 g de K (SbO)C₄H₆O₆·1/2H₂O en 400 mL de agua destilada y aforar a 500 mL.
3. Solución de molibdato de amonio: disolver 20 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O en 500 mL de agua destilada almacenar en botella de vidrio con tapa.

4. Solución de ácido ascórbico 0.1 M disolver 1.76 g. de ácido ascórbico en 100 mL de agua destilada, la solución es estable durante una semana a 4°C.
5. Reactivo combinado, mezcle los reactivos anteriores en las siguientes proporciones para 100 mL de reactivo combinado: 50 mL de H₂SO₄ 5N, 5 ml de solución de tartrato de amonio de potasio, 15 mL solución de molibdato de amonio y 30 mL de solución de ácido ascórbico. Mezclar después de adicionar de cada uno del reactivo. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de mezclar; si se forma turbidez en la mezcla deje reposar unos minutos hasta que la turbidez desaparezca; ésta es estable por 4 horas.
6. Solución estándar de fosfatos: Prepara una solución de 2.5 µg P/L

Procedimiento:

1. Pipetear 50 mL de muestra en un tubo de ensayo limpio y seco. Añadir 0.05 mL (1 gota) de fenolftaleína si ésta se pinta de color rojo, adicionar gota a gota una solución de H₂SO₄ en una concentración de 5 N.
2. Añadir 8 mL del reactivo combinado y mezclar.
3. Después de 10 minutos, tomar la medición a una longitud de onda de 880 nm usando agua como blanco. Hacer esto con todas las muestras.

1.2 Kits químicos comerciales

La palabra kit se define como: conjunto de piezas separadas que conforman un todo, que se comercializa con un adjunto para el montaje. (Gran diccionario de la lengua española, 2016).

Por tanto, los kits químicos comerciales son un conjunto de elementos necesarios para realizar una prueba química en concreto, los cuales se caracterizan por tener los reactivos químicos necesarios, además de un instructivo de uso, facilitando la prueba de laboratorio ya que éstos están estandarizados.

1.3 Microescala

El análisis a microescala está basado en la utilización de aparatos e instrumentos de medición diseñados y contruidos específicamente para este propósito (Baeza, 2006); este análisis consiste en la utilización de cantidades muy pequeñas; disolventes entre 100 μ L a 5 mL y reactivos de 0.005 g a 0.5 g, (Miranda, 2010). Las técnicas a microescala son utilizadas principalmente en química sintética orgánica, química general, química sintética inorgánica y química analítica.

Uno de los puntos más importantes a considerar para el trabajo a microescala es la exactitud y esta depende del uso de la balanza analítica, el material volumétrico y de las sustancias. Por otra parte, tanto la sensibilidad como la selectividad dependen de los sistemas químicos empleados y sus adecuaciones a microescala.

1.3.1 Importancia y métodos empleados

La importancia del análisis a microescala radica en las ventajas que este tiene; a continuación se mencionan las más importantes:

- Reducir los costos de cada experimento.
- Posibilitar el aumento del número y repertorio de experimentos con un mismo presupuesto.
- Mejora la seguridad dentro del laboratorio.
- Minimizar el espacio de almacenamiento.
- Minimizar la cantidad de desechos.
- Promover el principio de las 8 R: Reevaluar, Reestructurar, Redistribuir, Relocalizar, Reducir, Reutilizar, Recuperar, Reciclar.

Las técnicas de microescala son enseñadas a estudiantes de preparatoria y universidad, en donde los principales temas tratados por la química analítica son las microtitulaciones ácido-base, aunque también se utilizan métodos fisicoquímicos de análisis, como lo son: la cromatografía de gases y líquidos, espectrofotometría, etc.

1.4 Espectrofotometría

La espectrofotometría UV-visible es un método fisicoquímico y analítico con la cual se puede obtener la concentración de un compuesto en solución, está basada en los fenómenos de absorción y de trasmisión.

El primero consiste en la absorción de energía luminosa y el almacenamiento en las moléculas como energía interna, mientras que el fenómeno de trasmisión es cuando la energía es liberada como energía luminosa.

Cabe destacar que en el rango de la luz visible se absorben distintos colores de acuerdo a la longitud de onda, por lo que se refleja el color complementario Tabla 5.

Tabla 5. Colores que reflejan en distintas longitudes de onda

Longitud de onda aproximada (nm)	Color de luz que se absorbe	Color de luz que refleja (se observa)
390- 435	Violeta	Amarillo verdoso
435-490	Azul	Amarillo
490-580	Verde	Rojo
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Azul verdoso
650-780	Rojo	Verde azulado

Fuente: Miranda, 2010

Cabe mencionar que la fuente de radiación que se utilizó, fue una lámpara de tungsteno, además que se trabajó en el área de luz visible debido a la formación del complejo colorido.

1.5 Validación de un método analítico

Es necesario recordar que un método analítico debe validarse, por lo cual hay que clasificarlo adecuadamente, por lo que, de acuerdo con el Colegio de Nacional de QFB (2016). El método empleado es fisicoquímico, ya que se tiene una respuesta física (absorción de luz), además de que la reacción se acompleja. Esto nos permite verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico.

En función de la aplicación analítica de un método, se identifican los parámetros que se deben estudiar cómo se muestran en la Tabla 6:

Con base en la Tabla 6 se determinó que los parámetros a estudiar serán los enlistados en los siguientes marcadores:

Tabla 6. Parámetro de desempeño.

Parámetro de desempeño	Contenido/ potencia/ valoración	Pruebas de impurezas		Identificación
		Contenido/ Valoración	Límite	
Precisión /educabilidad del sistema	Si	Si	Si	*
Linealidad del sistema	Si	Si	No	No
Especificidad (selectividad)	Si	Si	Si	Si
Exactitud y respetabilidad	Si	Si	No	No
Linealidad del método	Si	Si	No	No
Precisión del método	Si	Si	No	No
Estabilidad analítica de la muestra	*	*	No	No
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	No
Robustez	*	*	No	No
Tolerancia	*	*	No	No

Fuente: Colegio de QFB, 2016.

Nota:

*Puede ser requerido, depende de la naturaleza del método.

- ***Linealidad del sistema:***

Es la capacidad del método de análisis para brindar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (Hernández, 2019). Éste consiste en realizar por triplicado una curva de calibración con 5 concentraciones diferentes de solución de referencia, ya sea por diferencia de pesos (pesas independientes) o por dilución, se mide la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de trabajo y se obtienen: la pendiente (b_1), la ordenada al orden (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)) y la ecuación de la línea recta.

Donde deberá de cumplir los siguientes criterios de aceptación (Colegio Nacional de QFB, 2016):

$$r^2 \geq 0.98$$

IC (β_1), no debe incluir el cero

- ***Precisión del sistema***

Es el grado de dispersión que existe entre una serie de mediciones del analito. Éste parámetro se calcula preparando una sextuplicado de soluciones de concentración de fosfatos conocida y que, sea aproximadamente el valor medio de la curva de calibración del sistema, para posteriormente calcular el coeficiente de variación (C.V)

Donde deberá de cumplir los criterios de aceptación siguientes (Colegio Nacional de QFB, 2016)

$$CV \leq 1.5 \% \text{ para métodos fisicoquímicos}$$

- ***Linealidad del método:***

Conociendo los componentes de la muestra se prepara un placebo analítico en este caso utilizaremos agua del garrafón, a la que se le adicionara la cantidad del analito correspondiente al 100 %. Se seleccionan 2 niveles superiores e inferiores de la cantidad de fosfatos y se preparan en el placebo por triplicado. Se reporta una gráfica que muestre la cantidad recuperada de fosfatos contra la cantidad de fosfatos adicionada.

Los criterios de Aceptación son (Colegio Nacional de QFB, 2016)

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada

$$r^2 \geq 0.98$$

El intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)), debe incluir la unidad

El intervalo de confianza para la ordena al origen (IC (β_0)), debe incluir el cero

El CV del porcentaje de recobro: No debe ser mayor de 3 %

Porcentaje de recobro

El intervalo de confianza para la media poblacional (IC (μ)) debe incluir el 100 % o el promedio aritmético porcentaje de recobro se incluya en el intervalo:

$$97 - 103 \%$$

CV del porcentaje de recobro: Menor que el 3 %

- ***Precisión del método:***

Es el grado de dispersión que existe entre una serie de mediciones del analito. Este parámetro se puede determinar analizando por triplicado una muestra homogénea cuyo contenido este en el intervalo de linealidad del método.

Criterios de aceptación (Colegio Nacional de QFB, 2016).

$$CV \leq 3 \%$$

- **Exactitud**

Es el grado de concordancia entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor real convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado en la medición (Hernández, 2019). Éste puede determinarse a través de la preparación de un sextuplicado de una muestra preparada con el placebo analítico se adiciona la cantidad del analito correspondiente al 100 %, y se determina la cantidad recuperada del analito.

Criterios de aceptación (Colegio Nacional de QFB, 2016):

El intervalo de confianza de la media poblacional (IC (μ)) debe incluir el 100 % o el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo:

$$97 - 103 \%$$

CV del porcentaje de recobro:

$$\text{No mayor de } 3 \%$$

- **Sensibilidad:**

La sensibilidad nos permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una concentración (Cáñez, 2015) y está se define como la pendiente de la curva de calibración

- **Límite de detección**

Es la menor cantidad del analito en una muestra que puede ser detectada. Para su determinación se preparan al menos 3 concentraciones de la sustancia de interés medida en placebo o bien se utiliza toda la curva de calibración preparada en placebo y se calcular el límite de detección a través de la ecuación 1, (Colegio Nacional de QFB, 2016).

$$LOD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \dots \dots \dots (1)$$

Criterios de aceptación (Colegio Nacional de QFB, 2016)

$$r^2 \geq 0.98$$

IC (β_1), no debe incluir el cero

Límite de cuantificación

Es la menor cantidad el analito en una muestra que puede ser determinada con una adecuada precisión y exactitud. Para su determinación se preparan al menos 3 concentraciones de la sustancia de interés medida en placebo o bien se utiliza toda la curva de calibración preparada en placebo y se calcula el límite de cuantificación a través de la ecuación 2. (Colegio Nacional de QFB, 2016).

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \dots\dots\dots (2)$$

Criterios de Aceptación (Colegio Nacional de QFB, 2016).

$$r^2 \geq 0.98$$

IC (β_1), no debe incluir el cero

Capítulo 2. Desarrollo experimental

2.1 Equipos, materiales, reactivos y medios de disolución

En la Tabla 7 se presentan los equipos utilizados durante la experimentación.

Tabla 7: Equipos de laboratorio utilizados

Equipo	Especificación
Balanza analítica	Marca: Radwag Modelo: -ASR 2
Espectrofotométrico	VE-5600UV Marca: Velab
	UV-1601 Marca: Shimadzu
Digestor	HI 839800 Marca: Hanna

En la Tabla 8 se presentan los materiales de laboratorio utilizados durante la experimentación, tanto a escala normal, así como en la reducción a microescala.

Tabla 8. Material de laboratorio.

Material	Cantidad	Capacidad
Tubos de ensayo	10	10 mL
Matraz aforado de	3	5 mL
	1	250 mL
Pipetas volumétricas	2	1 mL
	1	2 mL
	1	3 mL
Pro-pipeta	1	
Vasos de precipitado	1	10 mL
		50 mL

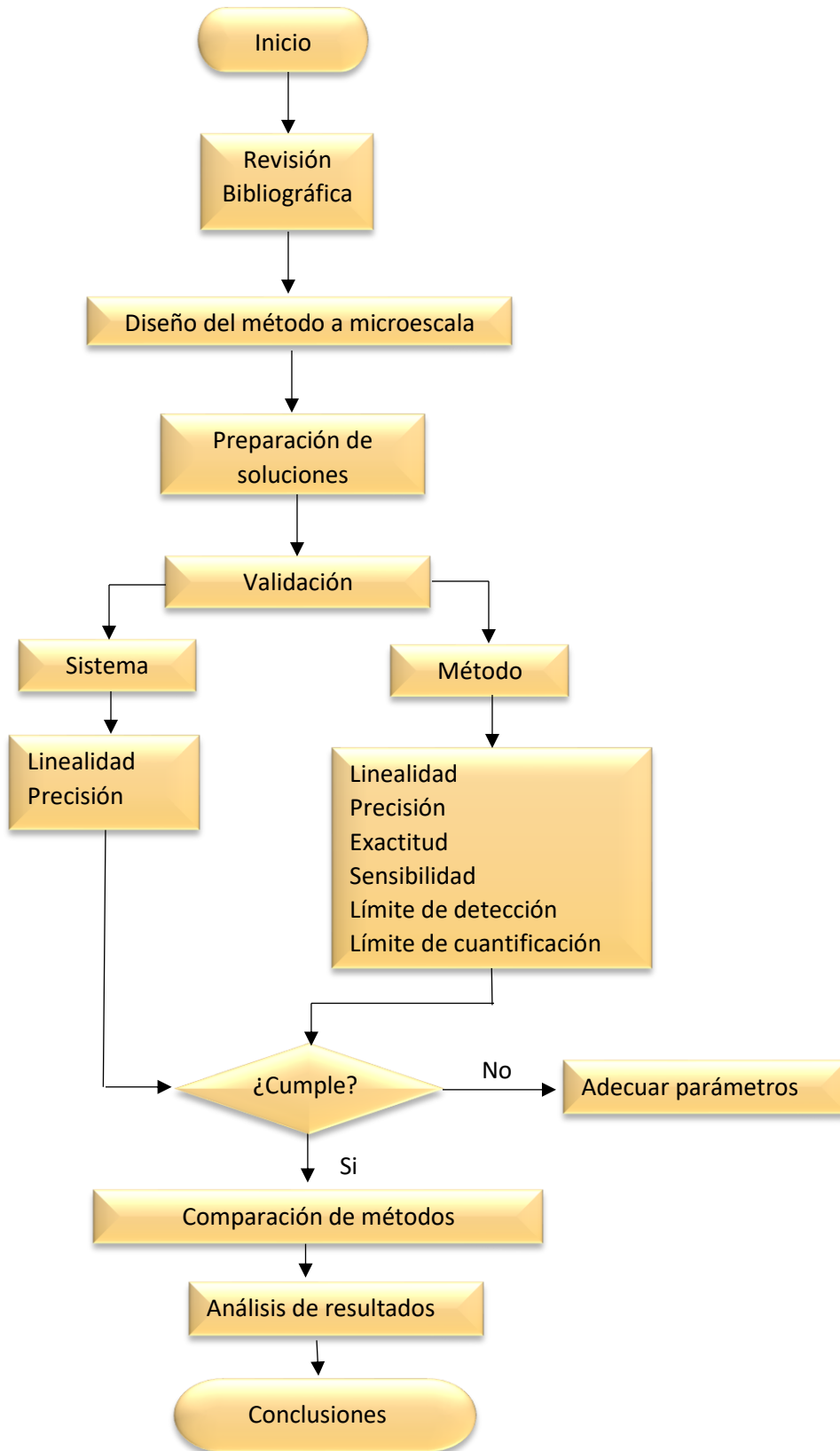
Envases de plástico	10	2 mL
Celdas de plástico	5	7 mL

Finalmente, en la Tabla 9 se presentan los reactivos utilizados durante el trabajo experimental.

Tabla 9. Reactivos utilizados durante experimentación

Reactivo	Especificaciones
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Peso molecular: 138.0 Pureza: 99.0 %
Kit Hanna	Sobre de 0.18 g
Kit Merck	Reactivo fosfatos 1(ácido sulfúrico) Reactivo fosfatos 2
Agua tridestilada	Conductividad (μS/cm a 25°C) 0.25 Resistividad (MO/cm a 25°C) 4
Agua del garrafón	E-pura

2.2. Diagrama de flujo

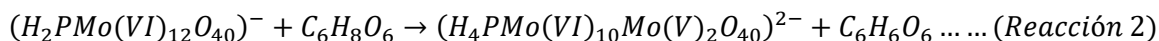


2.3. Metodología empleada en los kits (Hanna y Merck) para el análisis de fosfatos en agua

En estos dos kits comerciales, aunque no explican con detalle el tipo de reacción que se lleva a cabo para la determinación de los fosfatos, especifican que se basan en el método del ácido ascórbico. Por lo anterior se considera que como primer paso se lleve a cabo la reacción de los fosfatos con molibdato en solución ácida, que forma un complejo fosfomolibdato de color amarillo, (Reacción 1).



El complejo de fosfomolibdato puede ser reducido enseguida por el ácido ascórbico, causando las características especies del azul de molibdeno, Reacción 2.



Varias estructuras para la especie azul de molibdeno se han sugerido en la literatura, entre las más probables se encuentran: $HMoO_4^-$ (a pH = 4.58), $Mo_2O_7^{2-}$ (a pH = 4.58) y $Mo_7O_{24}^{6-}$ (a pH = 4.30) debido el intervalo de PH (4-6) que se manejó (Killeffer, 1952 y Nagula, 2015); éste puede determinarse espectrofotométricamente.

2.3.1. Protocolo original del kit de Hanna.

Preparación de la muestra:

Verificar que el material empleado este limpio, en caso de turbidez filtrar la muestra, lavar las celdas inmediatamente después de utilizar ya que de lo contrario se mancharán.

Técnica:

Añadir a 10 mL de la muestra un sobre del polvo contenido en el kit, agitar vigorosamente por 2 minutos, esperar a que se estabilice durante 3 minutos, inmediatamente después tomar la medición.

2.3.2. Protocolo original del kit de Merck.

Para emplear la metodología de este kit es importante considerar los intervalos de medición propuestos en el kit Tabla 10. Además, emplear de manera correcta la técnica especificada.

Tabla10. Intervalos de medición,

Paso óptico de la celda Mm	Intervalo de medida		
	mg/L PO ₄ ³⁻ , P	mg/L PO ₄ ³⁻	mg/L P ₂ O ₅
50	0.010-1.000	0.03-3.07	0.02-2.29
20	0.03-2.5	0.09-7.67	0.07-5.73
10	0.05-5.00	0.2-15.3	0.11-11.46

Fuente: Merck (2013)

Preparación de la muestra:

Enjuagar el material de vidrio solamente con detergentes exentos de fosfatos. En otro caso dejarlo llenado con ácido clorhídrico (aproximadamente al 10 %) durante varias horas.

Analizar las muestras inmediatamente después de la toma de muestra.

Fósforo total puede determinarse después de la preparación de la muestra con uno de los reactivos provenientes del kit.

Las muestras con más de 5.00 mg/L de PO₄ deben diluirse con agua destilada antes de la disgregación.

El valor del pH debe encontrarse en el intervalo de 4-6. Si es necesario, ajuste con ácido sulfúrico.

Filtrar las muestras turbias.

Tabla 11. Técnica original para el kit Merck

Sustancia	Cantidad	Actividad
Muestra preparada (10-35°C)	5.0 mL	Pipetear en un tubo de ensayo
Reactivo PO ₄ -1	5 gotas	Añadir y mezclar
Reactivo PO ₄ -2	1 microcuchara azul rasa (en tapa del frasco PO ₄ -2)	Añadir y agitar vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente.
Nota: Dejar en reposo 5 minutos (tiempo de reacción), luego introducir la muestra de medición en la celda y leer en el fotómetro		

Los PO₄-1 y PO₄-2 son los nombres que se les dan a los reactivos en el kit, como las medidas que establece el kit no son muy confiables (Tabla 11), se realizó una estandarización (Tabla 19).

Notas:

Se prepara un blanco para ajustar la curva de calibración a cero con agua tridestilada.

La muestra del blanco presenta un color amarillo.

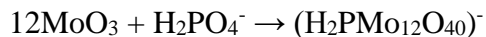
Para la medición fotométrica las celdas deben estar limpias.

La turbidez después de acabada la reacción da como resultado valores falsamente elevados.

El color de la solución de medición permanece estable mínimo 60 minutos después de transcurrido el tiempo de reacción antes indicado.

2.3.3. Método para la adaptación a microescala de los Kits

Con la finalidad de no alterar la estequiometría de la reacción se propone reducir tanto la cantidad, como los volúmenes de los reactivos, así como el medio de análisis (agua).



En el caso del kit Hanna una décima parte y en el caso del kit Merck una quinta parte, como lo indica la Tabla 12. Para determinar el peso que se utilizó del reactivo en polvo en los kits se realizó el promedio del peso de 5 muestras del reactivo análisis original, dividiéndolo en el caso de Merck en una quinta parte, y en el caso se Hanna en una décima parte.

Tabla 12: Reducción del análisis mediante los kits de Hanna y Merck a microescala

Kits	Método original			Método estudio a microescala		
	Reactivo comercial del kit (g)	Reactivo líquido (gotas)	Volumen de muestra problema (mL)	Reactivo comercial del kit (g)	Reactivo líquido (gotas)	Volumen de muestra problema (mL)
Hanna	0.18	-	10	0.018	-	1
Merck	0.11	5	5	0.022	1	1

2.4. Procedimiento experimental

Para la validación del método lo primero que se realizó fue la selección de la longitud de onda óptima, la cual se obtuvo a través de la medición del espectro de adsorción en el intervalo de 400-800 nm de longitud de onda, ya que se trabajó en la zona de luz visible.

2.4.1. Linealidad del sistema

La medición de 5 niveles de concentración se realizó por triplicado y se obtuvo su coeficiente de determinación (r^2), de resultados mayores a 0.98 para su aceptación. Cabe destacar que para este procedimiento se utilizó agua tridestilada y se siguió la técnica establecida en cada kit adaptado a microescala.

Preparación de soluciones para la linealidad del sistema Hanna. Se prepara un stock en 250 mL de agua tridestilada, por lo que se realizó el cálculo de la cantidad que se necesitaba pesar de, para obtener una concentración de $1.8 \text{ mg } \text{PO}_4^{3-} / \text{L}$

$$\frac{1.8 \text{ mg } PO_4^{3-}}{L} \times 0.250L \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}} \times \frac{138 \text{ mg } R_p}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \times \frac{100 \text{ mg } R_{RA}}{99 \text{ mg } R_p} \times \frac{1 \text{ g } R_{RA}}{1000 \text{ mg } R_{RA}} = 0.00066 \text{ g}$$

Donde R_{RA} es reactivo analítico, y R_P es reactivo puro.

Sin embargo, la cantidad pesada realmente fue de 0.00072 g de NaH_2PO_4 por lo que se recalcula la concentración

$$0.00072 \text{ g } R_{RA} \times \frac{1000 \text{ mg } R_{RA}}{1 \text{ g } R_{RA}} \times \frac{99 \text{ mg } R_p}{100 \text{ mg } R_{RA}} \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{138 \text{ mg } R_p} \times \frac{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \times \frac{1}{0.250 \text{ L}} = 1.9621 \text{ mg } PO_4^{3-}/L$$

Una vez obtenido el stock se prepara los sistemas presentados en la Tabla 13.

Tabla 13. Preparación de diluciones para la curva de calibración linealidad de Hanna (NaH_2PO_4)

Sistemas	Sustancia de la alícuota	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (mg PO_4^{3-} /L)
A	NaH_2PO_4	1	5	0.39242
B	NaH_2PO_4	2	5	0.78484
C	NaH_2PO_4	3	5	1.17726
D	NaH_2PO_4	4	5	1.56968
E	NaH_2PO_4	5	5	1.96210

Preparación de soluciones para la linealidad del sistema Merck. Se prepara un stock en 250 mL de agua tridestilada, por lo que se realizó el cálculo de la cantidad que se necesitaba pesar de NaH_2PO_4 para obtener una concentración de $20 \text{ mg } PO_4^{3-}/L$.

$$\frac{20 \text{ mg } PO_4^{3-}}{L} \times 0.250L \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}} \times \frac{138 \text{ mg } R_p}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \times \frac{100 \text{ mg } R_{RA}}{99 \text{ mg } R_p} \times \frac{1 \text{ g } R_{RA}}{1000 \text{ mg } R_{RA}} = 0.0073388 \text{ g}$$

Donde R_{RA} es reactivo analítico, y R_P es reactivo puro.

Sin embargo, la cantidad pesada fue de 0.0074 g de NaH_2PO_4 por lo que se recalculó la concentración

$$0.00748 \text{ g } R_{RA} \times \frac{1000 \text{ mg } R_{RA}}{1 \text{ g } R_{RA}} \times \frac{99 \text{ mg } R_p}{100 \text{ mg } R_{RA}} \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{138 \text{ mg } R_p} \times \frac{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \times \frac{1}{0.250 \text{ L}} = 20.4 \text{ mg } PO_4^{3-}/L$$

Una vez obtenido el stock se preparan los sistemas presentados en la Tabla 14

Tabla14. Preparación de diluciones para la curva de calibración linealidad de Merck con el primer stock (NaH₂PO₄)

Sistema	Sustancia de la alícuota	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)
1	NaH ₂ PO ₄	1	10	2.04
2	NaH ₂ PO ₄	1	5	4.08
3	NaH ₂ PO ₄	2	5	8.16
4	NaH ₂ PO ₄	3	5	12.24
5	NaH ₂ PO ₄	4	5	16.32
6	NaH ₂ PO ₄	10	10	20.40

Una vez obtenidas estas diluciones, se tomó el sistema 1 como segundo stock para preparar los sistemas de diluciones presentados en la Tabla 15.

Tabla15. Preparación de diluciones para la curva de calibración linealidad de Merck con el segundo stock (NaH₂PO₄)

Sistema	Sustancia de la alícuota	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)
2	NaH ₂ PO ₄	1	5	0.4114
3	NaH ₂ PO ₄	2	5	0.8228
4	NaH ₂ PO ₄	3	5	1.2342
5	NaH ₂ PO ₄	4	5	1.6456
6	NaH ₂ PO ₄	10	10	2.0400

2.4.2. Precisión del sistema

Para determinar la precisión del sistema se realizó un sextuplicado de la concentración intermedia en la curva de calibración del sistema para ambos kits,

- Hanna

Se prepara un stock de PO₄³⁻

$$2.0933 \frac{\text{mg } PO_4^{3-}}{\text{L}} \times 0.250\text{L} \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}} \times \frac{138 \text{ mg } R_p}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \times \frac{100 \text{ mg } R_{RA}}{99 \text{ mg } R_p} \\ \times \frac{1 \text{ g } R_{RA}}{1000 \text{ mg } R_{RA}} = 0.00076 \text{ g}$$

Sin embargo, la cantidad pesada fue de 0.00075 g de NaH_2PO_4 por lo que se recalculó la concentración:

$$0.00075 \text{ g } R_{RA} \times \frac{1000 \text{ mg } R_{RA}}{1 \text{ g } R_{RA}} \times \frac{99 \text{ mg } R_p}{100 \text{ mg } R_{RA}} \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{138 \text{ mg } R_p} \times \frac{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \\ \times \frac{1}{0.250 \text{ L}} = 2.043 \text{ mg } PO_4^{3-} / \text{L}$$

Se prepara una dilución de 2:5 quedando

$$2.043 \frac{\text{mg } PO_4^{3-}}{\text{L}} \times \frac{3}{5} = 1.2266 \text{ mg } PO_4^{3-} / \text{L}$$

- Merck

Se preparó un stock de acuerdo con el cálculo siguiente:

$$\frac{20 \text{ mg } PO_4^{3-}}{\text{L}} \times 0.250\text{L} \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}} \times \frac{138 \text{ mg } R_p}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \times \frac{100 \text{ mg } R_{RA}}{99 \text{ mg } R_p} \\ \times \frac{1 \text{ g } R_{RA}}{1000 \text{ mg } R_{RA}} = 0.0073388 \text{ g}$$

La cantidad pesada fue de 0.0074 g de NaH_2PO_4 por lo que se recalculó la concentración:

$$0.00740 \text{ g } R_{RA} \times \frac{1000 \text{ mg } R_{RA}}{1 \text{ g } R_{RA}} \times \frac{99 \text{ mg } R_p}{100 \text{ mg } R_{RA}} \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{138 \text{ mg } R_p} \times \frac{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \\ \times \frac{1}{0.250 \text{ L}} = 20.166 \text{ mg } PO_4^{3-} / \text{L}$$

Se prepara una dilución de 2:5 quedando:

$$20.166 \frac{\text{mg } PO_4^{3-}}{\text{L}} \times \frac{2}{5} = 8.0666 \text{ mg } PO_4^{3-} / \text{L}$$

Para Hanna se utilizó una concentración de 1.2263 mg/L., mientras que para Merck se utilizó una concentración de 8.0666 mg/L, utilizando agua tridestilada para su preparación

2.4.3. Linealidad del método

Empleando agua de garrafón, la medición se realizó por triplicado con 5 niveles de concentración, con la técnica descrita en cada kit; se trabajó para obtener la ecuación de la curva de calibración del método.

- Preparación de soluciones para la linealidad del método Hanna

Para calcular con concentraciones requeridas para llevar a cabo la curva de calibración del método utilizamos el mismo caculo hecho en el caso del stock en agua tridestilada con la diferencia de que se utilizara agua del garrafón (E-pura).

Se debieron pesar 0.00066 g de NaH_2PO_4 , sin embargo, lo que se pesó en realidad fueron 0.00062 g de NaH_2PO_4 por lo que hay que recalcular la concentración del stock.

$$0.00062 \text{ g } R_{RA} \times \frac{1000 \text{ mg } R_{RA}}{1 \text{ g } R_{RA}} \times \frac{99 \text{ mg } R_p}{100 \text{ mg } R_{RA}} \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{138 \text{ mg } R_p} \times \frac{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \\ \times \frac{1}{0.250 \text{ L}} = 1.6896 \text{ mg } PO_4^{3-} / \text{L}$$

Una vez obtenido el stock se prepara los sistemas presentados en la Tabla 16.

Tabla16. Preparación de diluciones para la curva de calibración del método de Hanna (NaH_2PO_4).

Sistemas	Sustancia de la alícuota	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (mg PO_4^{3-} /L)
A2	NaH_2PO_4	1	5	0.33792
B2	NaH_2PO_4	2	5	0.67584
C2	NaH_2PO_4	3	5	1.01376
D2	NaH_2PO_4	1	5	1.35168
E2	NaH_2PO_4	5	5	1.68960

- Preparación de soluciones para la linealidad del método Merck

Para calcular con concentraciones requeridas para llevar a cabo la curva de calibración del método utilizamos el mismo caculo hecho en el caso del stock en agua tridestilada con la diferencia de que se utiliza agua del garrafón (E-pura).

Se debieron pesar 0.007338 g de NaH_2PO_4 , sin embargo, lo que se pesó en realidad fueron 0.00762 g de NaH_2PO_4 por lo que hubo que recalcular la concentración del stock.

$$0.00762 \text{ g } R_{RA} \times \frac{1000 \text{ mg } R_{RA}}{1 \text{ g } R_{RA}} \times \frac{99 \text{ mg } R_p}{100 \text{ mg } R_{RA}} \times \frac{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}}{138 \text{ mg } R_p} \times \frac{94.97 \text{ mg } PO_4^{3-}}{1 \text{ mmol } PO_4^{3-}} \\ \times \frac{1}{0.250 \text{ L}} = 20.76 \text{ mg } PO_4^{3-} / \text{L}$$

Una vez obtenido el stock se preparó los sistemas presentados en la Tabla 17

Tabla 17. Preparación de diluciones para la curva de calibración del método de Merck (NaH₂PO₄).

Sistemas	Sustancia de la alícuota	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)
1	NaH ₂ PO ₄	1	10	2.07
2	NaH ₂ PO ₄	1	5	4.15
3	NaH ₂ PO ₄	2	5	8.31
4	NaH ₂ PO ₄	3	5	12.47
5	NaH ₂ PO ₄	1	5	16.62
6	NaH ₂ PO ₄	5	5	20.70

2.4.4. Precisión del método

La medición de concentración intermedia en la curva de calibración del sistema para ambos kits, se tomó por triplicado durante dos días diferentes, para el kit Hanna se utilizó una concentración de 1.01 mg/L, mientras que para Merck se utilizó una concentración de 8.31 mg/L, utilizando agua de garrafón para su preparación.

2.4.5 Exactitud

Con los valores obtenidos durante la precisión se calculan a través de la ecuación 6.

2.4.6 Sensibilidad

Se obtiene con los valores de las pendientes de las curvas de calibración tanto para el sistema como para el método.

2.4.7 Limite de detección

Lo podemos obtener con los valores obtenidos de las curvas de calibración tanto para el sistema, así como para el método a partir de la ecuación 1.

2.4.8 Limite de cuantificación

La podemos obtener con los valores obtenidos de las curvas de calibración tanto para el sistema, así como para el método a partir de la ecuación 2.

Capítulo 3. Resultados y análisis

Lo primero que se reporta es el comportamiento del espectro del producto colorido (azul de molibdeno) obtenido tras la aplicación de los reactivos de ambos kits comerciales para medir fosfatos en una misma muestra de agua a dos diferentes concentraciones.

La Figura 6 se puede observar como los espectros de ambos métodos son muy similares entre sí. Cabe mencionar que en ambos métodos se utilizó agua tridestilada, para Hanna se utilizó una concentración de 1.96 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$ mientras que para Merck se usó una concentración de 2.4 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{L}$. Se puede apreciar que la longitud de onda optima se encuentra entre 711 a 712.5 nm, por lo cual se determinó trabajar en 711 nm.

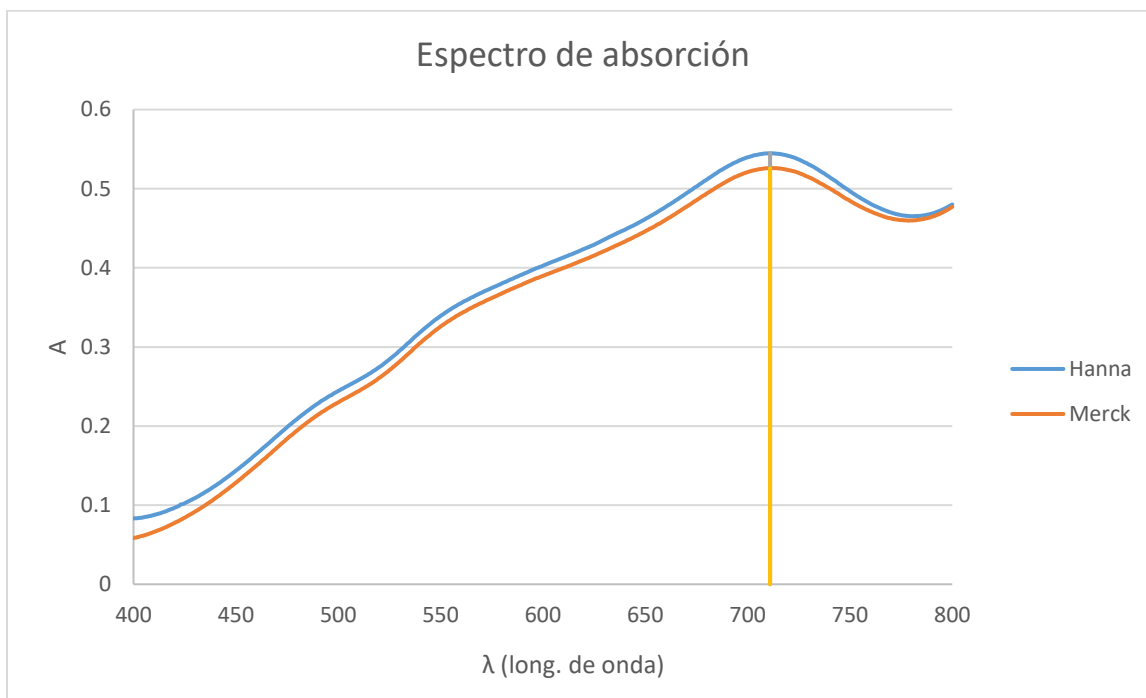


Figura 6. Espectro de adsorción de PO_4 , para ambos kits a 585 mm Hg y 20°C

Determinación de los pesos para la reducción a microescala

- Hanna

En este caso el kit consta de un sobre el cual indica un peso de 0.18 g de reactivo en polvo, para cerciorarnos de esto se realizó un muestreo del peso de 5 bolsas teniendo como resultado:

Tabla 18. Pesos obtenidos en una bolsa del reactivo en polvo

N° de muestra	Peso (g)
1	0.1729
2	0.1809
3	0.1780
4	0.1761
5	0.1728

Con estos resultados se obtuvo un promedio, su desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación, para determinar la relación que existe entre ellos.

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} = \frac{0.1729 + 0.1809 + 0.1780 + 0.1761 + 0.1728}{5} = 0.1761 \text{ g}$$

$$S = 0.00345$$

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 = \frac{0.00345}{0.1761} \times 100 = 1.95\%$$

Aunque según el estudio que hicimos indica que hay diferencia significativa entre el peso de las bolsas, por lo que se decidió tomar el peso establecido en ves del promedio siendo 0.18 g el peso del reactivo en polvo que se reducirá una décima parte dando como resultado 0.018 g del peso propuesto para el método a microescala.

- Merck

Para el método original el kit nos dice que se ponga una cucharada del reactivo en polvo, con la finalidad de poder reducir el procedimiento, se pesaron 5 cucharadas del reactivo en polvo teniendo como resultado:

Con estos resultados se obtuvo un promedio, su desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación, para determinar la relación que existe entre ellos.

Tabla 19. Pesos obtenidos en una cucharada del reactivo en polvo

N° de muestra	Peso (g)
1	0.11014
2	0.11616
3	0.11464
4	0.11528
5	0.11358

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} = \frac{0.11014 + 0.11616 + 0.11464 + 0.11528 + 0.11358}{5} = 0.11396 \text{ g}$$

$$S = 2.333 \times 10^{-3}$$

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 = \frac{2.333 \times 10^{-3}}{0.11396} \times 100 = 2.04768\%$$

Con los resultados obtenidos se establece que no existe diferencia significativa entre el peso del reactivo en polvo proporcionada en una cucharada, por lo que se tomaron las cifras significativas del promedio, siendo así 0.11 g el peso necesario del reactivo en polvo para realizar el análisis original.

Dicho valor fue reducido una quinta parte quedando 0.022 g como el valor del reactivo en polvo propuesto para el método a microescala.

3.1 Linealidad del sistema

Es importante destacar que para evaluar la linealidad del sistema se preparó una solución stock con agua tridestilada tal como es descrito en la metodología experimental.

- *Kit Hanna a microescala.*

Tabla 20. Resultados experimentales para linealidad del sistema a partir del kit de Hanna a microescala

Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3	
Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A
0	0	0	0	0	0
0.39242	0.113	0.39242	0.124	0.39242	0.123
0.78484	0.214	0.78484	0.236	0.78484	0.230
1.17726	0.327	1.17726	0.333	1.17726	0.338
1.56968	0.442	1.56968	0.453	1.56968	0.455
1.96210	0.528	1.96210	0.552	1.9621	0.566

Se utilizó el programa Statgraphis Centurion XVI para el análisis de los datos, para obtener el modelo de regresión, con los resultados de la Tabla 20.

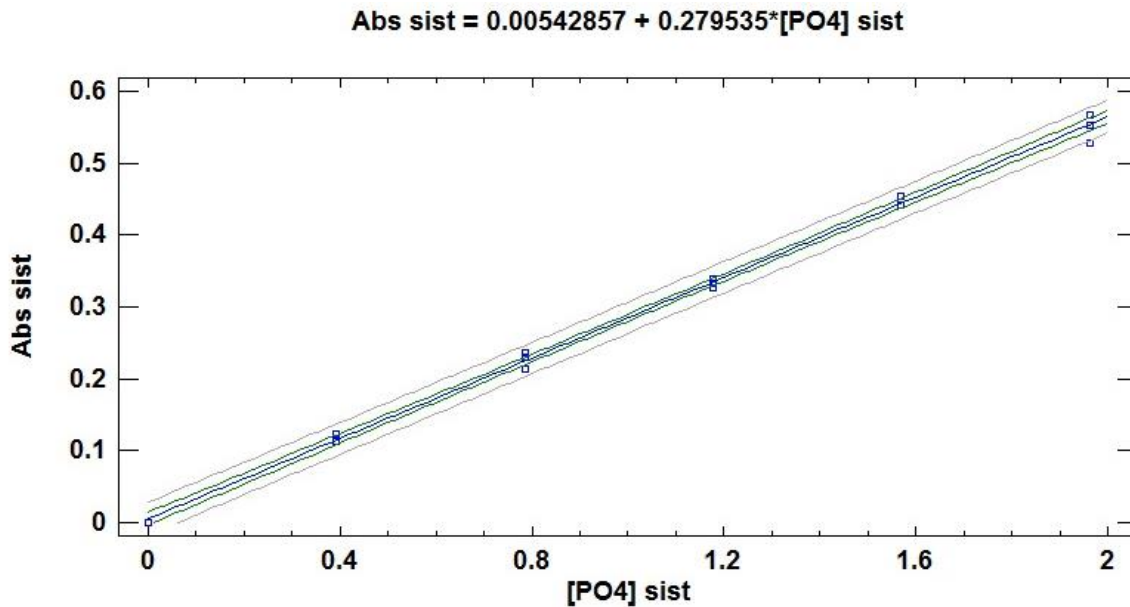


Figura 7. Curva de calibración del sistema Hanna a microescala

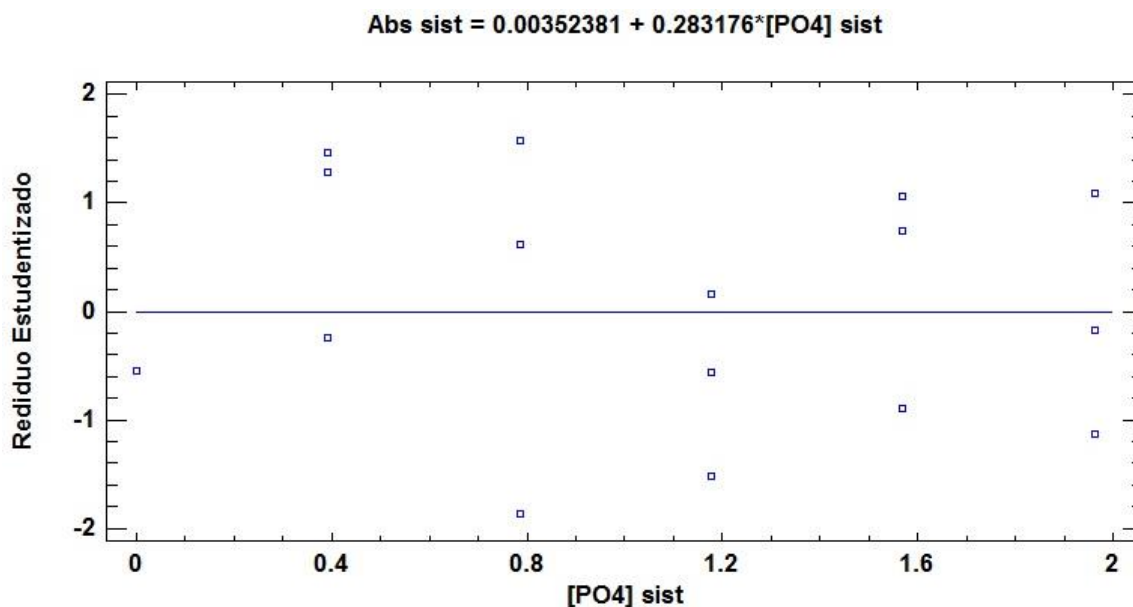


Figura 8. Diagrama de residuales del sistema Hanna a microescala

Es importante hacer un análisis estadístico para determinar si verdaderamente cumple con la linealidad del sistema, para posteriormente comparar los resultados obtenidos con los criterios de aceptación, (Colegio Nacional de QBF, 2016).

Por otra parte, el diagrama de dispersión de los datos permite obtener una impresión sobre el supuesto de linealidad y homocedasticidad, (la varianza de los errores es constante a lo largo del tiempo), esto se aprecia en Figura 5. Además, al no tener residuales atípicos se puede confirmar la impresión inicial y validar los supuestos de Normalidad e Independencia, existentes entre los datos. Es decir, observamos que las muestras fueron tomadas de forma aleatoria.

Aplicando los criterios de aceptación ya antes mencionados, se puede decir que como r^2 (0.997485) obtenido es mayor que r^2 (0.98) de aceptación, y el IC (β_1) no incluye el cero el sistema es lineal.

El análisis estadístico completo se puede ver en el Anexo 1.

- ***Kit Merck a microescala***

En la Tabla 21 podemos ver los resultados obtenidos para la determinar la linealidad del sistema para el kit Merck a microescala, Se utilizó el programa statgraphics centurion XVI para el análisis de los datos.

Tabla 21. Resultados experimentales para linealidad del sistema a partir del kit de Merck a microescala

Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3	
Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A
0	0	0	0	0	0
0.81	0.014	0.81	0.011	0.81	0.012
0.16	0.02	0.16	0.018	0.16	0.016
0.24	0.068	0.24	0.052	0.24	0.072
1.22	0.165	1.22	0.157	1.22	0.164
2.04	0.328	2.04	0.36	2.04	0.287
4.08	0.691	4.08	0.643	4.08	0.673
8.16	1.415	8.16	1.416	8.16	1.423
12.24	2.051	12.24	1.961	12.24	2.018
16.32	2.428	0.01632	2.431	0.01632	2.374

En la Figura 9 podemos apreciar los intervalos de confianza y predicción para los resultados obtenidos en la Tabla 22. A través de un análisis ANOVA, con un 95% de confianza y producción, cabe mencionar que la concentración está en mg PO₄³⁻/L.

$$\text{Abs} = 0.018119 + 0.155052 \cdot [\text{PO4}]$$

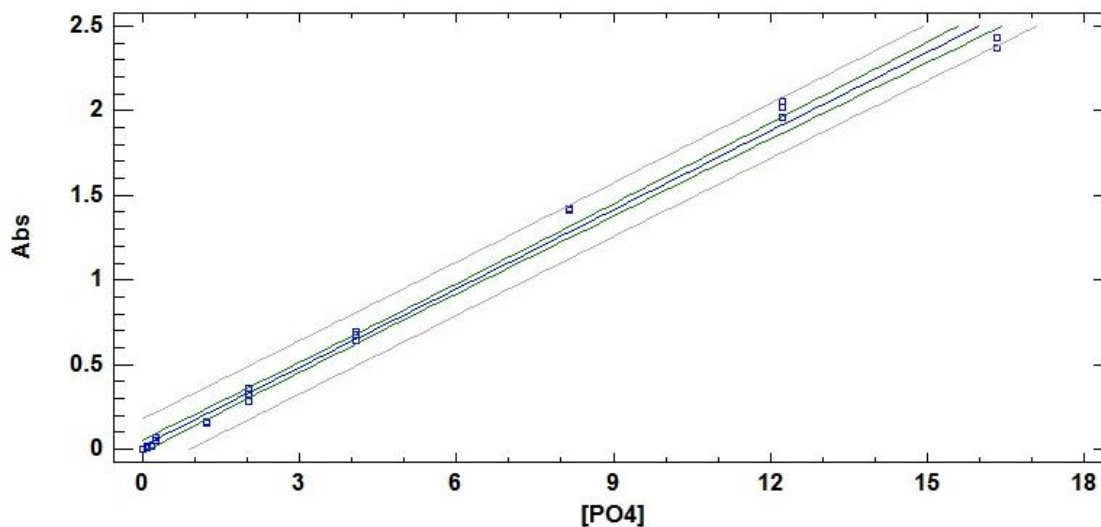


Figura 9. Curva de calibración del sistema Merck a microescala.

Al igual que en el caso del kit Hanna es importante hacer un análisis estadístico para determinar si verdaderamente cumple con la linealidad del sistema, para posteriormente comparar los resultados obtenidos con los criterios de aceptación (Colegio Nacional de QBF, 2016).

La ecuación de la curva de calibración encontrada experimentalmente fue:

$$A = 0.018119 + 0.155051 * [PO_4^{3-}] \dots \dots \dots (4)$$

Al igual que en el caso anterior se realizó el análisis de residuos lo cual se muestra en la Figura 10. Se puede determinar que tiene una distribución homogénea lo que nos indica que las muestras fueron tomadas de manera aleatoria. Además de tener homoscedasticos y que existe independencia entre los datos.

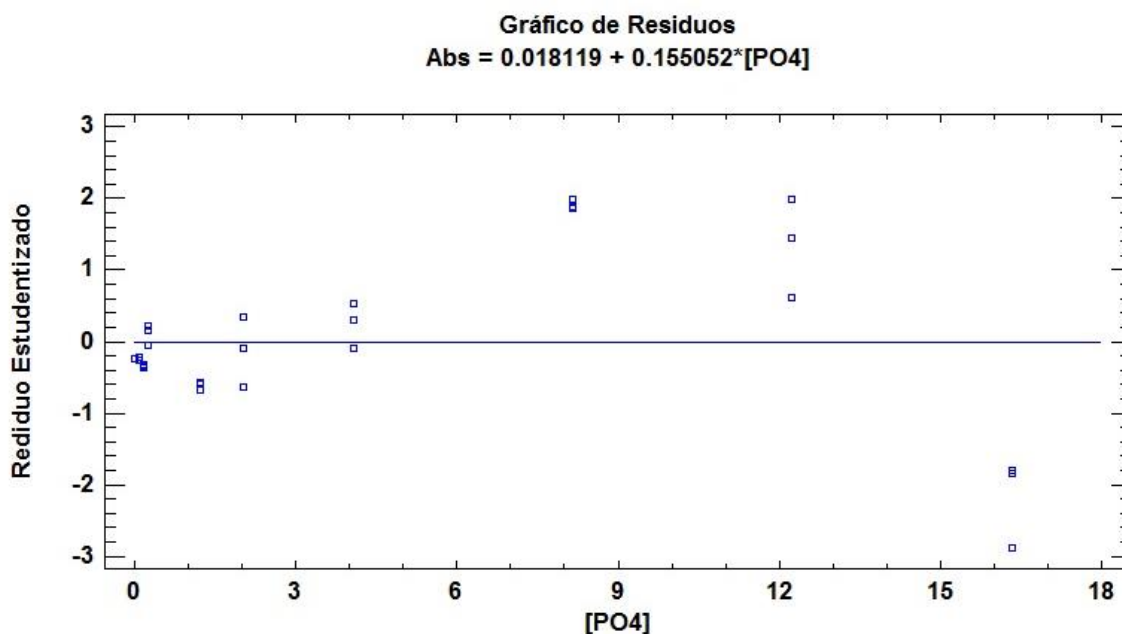


Figura 10. Diagrama de residuales del sistema Merck a microescala.

Aplicando los criterios de aceptación ya antes mencionados, se puede decir que como r^2 obtenido (0.992827), es mayor que r^2 de aceptación (0.98), y el IC (β_1) no incluye el cero el sistema es lineal.

El análisis estadístico completo de los datos se puede ver en el Anexo 1.

3.2 Precisión del sistema

Se prepararon las soluciones descritas en el apartado 2.4.2 del procedimiento experimental. Con los resultados obtenidos experimentalmente se realizó la tabla 22. Se analizaron para obtener la precisión del sistema en ambos casos.

Tabla 22. Resultados obtenidos para la precisión del sistema a microescala

	A experimentales					
	1	2	3	4	5	6
Hanna	0.37	0.35	0.355	0.355	0.371	0.368
Merck	1.416	1.448	1.439	1.434	1.457	1.458

Con estos resultados se obtuvo un promedio, su desviación estándar y el coeficiente de variación, para determinar la relación que existe entre ellos (Tabla24).

- Kit Hanna a microescala

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} = \frac{0.37 + 0.35 + 0.355 + 0.355 + 0.371 + 0.368}{6} = 0.3615$$

$$S = 0.0091$$

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 = \frac{0.0091}{0.3615} \times 100 = 2.5398 \%$$

- Kit Merck a microescala

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} = \frac{1.416 + 1.448 + 1.439 + 1.434 + 1.457 + 1.458}{6} = 1.442$$

$$S = 0.0159$$

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 = \frac{0.0159}{1.442} \times 100 = 1.1034 \%$$

Tabla 23. Cálculo de propiedades estadísticas

Parámetro	Hanna	Merck
Promedio	0.3615	1.442
Desviación estándar (S)	0.0091	0.0159
Coficiente de Variación (C.V)	2.5398	1.1034

Aplicando los criterios de aceptación para la linealidad del sistema nos damos cuenta que el porcentaje del coeficiente de variación del kit Hanna a microescala (2.5398) es mayor del porcentaje del coeficiente de variación de aceptación (1.5), por lo que se determina que el sistema no es preciso, mientras que para el kit Merck a microescala se puede decir que el porcentaje del coeficiente de variación obtenido (1.1034) es menor que el porcentaje del coeficiente de aceptación (1.5), por lo que el sistema Merck a microescala se considera preciso.

3.3 Linealidad del método a microescala

Para llevar a cabo la linealidad del método se tiene que realizar una curva de calibración, con las soluciones de la Tabla 19 y 20, descrita como linealidad del sistema en ese apartado (p.31) a través de una solución stock. Utilizando la metodología correspondiente para el kit de análisis. Cabe destacar que el placebo analítico que se utilizó fue agua de garrafón.

- *Curva de calibración del método de Hanna*

Para determinar la linealidad del método se prepararon 5 niveles de concentración creciente de estándar de fosfatos como se describe en el apartado 2.4.3, los cuales se midieron por triplicado obteniendo los resultados de la Tabla 24.

Tabla 24. Resultados experimentales para linealidad del sistema a partir del kit de Hanna a microescala

Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3	
Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A
0.0000	0.000	0.00000	0.000	0.00000	0.000
0.33792	0.091	0.33792	0.092	0.33792	0.113
0.67584	0.195	0.67584	0.222	0.67584	0.222
1.01376	0.300	1.01376	0.321	1.01376	0.351
1.35168	0.437	1.35168	0.451	1.35168	0.468
1.68960	0.559	1.68960	0.540	1.68960	0.539

Para el análisis de los resultados de la Tabla 25 se utilizó el programa statgraphics centurion XVI, mostrados en la Figura 11. Es importante hacer un análisis estadístico para determinar si verdaderamente se cumplió con la linealidad de la curva de calibración y así poder establecer la ecuación correspondiente, para poder calcular el porcentaje de recobro.

Siendo la ecuación 5 la obtenida en el análisis.

$$A = -0.00636508 + 0.329833 * [PO_4^{3-}] \dots \dots \dots (5)$$

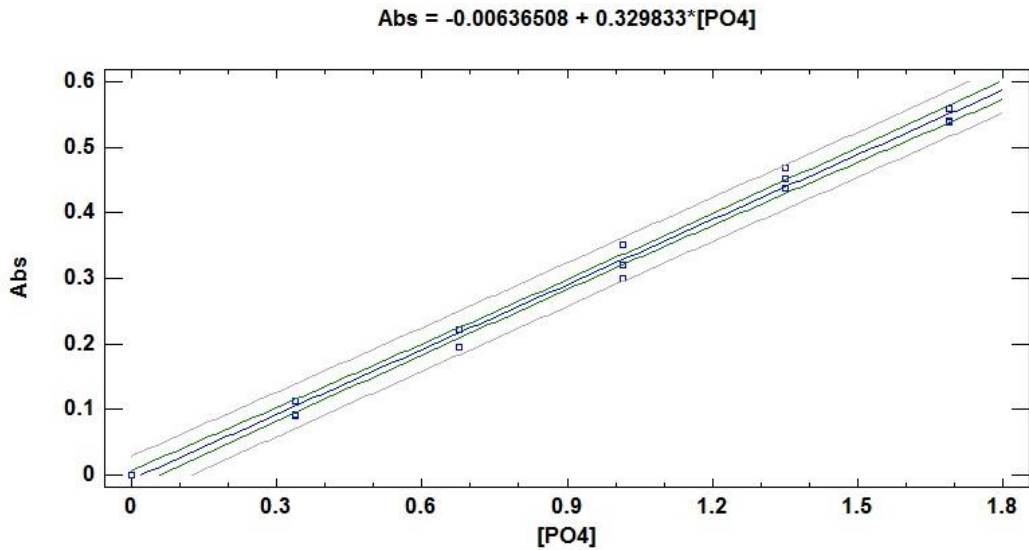


Figura 11. Curva de calibración del método del kit Hanna a microescala.

Al igual que en el caso anterior se realizó el análisis de residuos lo cual se muestra en la Figura 12. Con podemos determinar que tiene una distribución homogénea lo que nos indica que las muestras fueron tomadas de manera aleatoria. Además de ser homocedásticos por lo que existe independencia entre los datos.

Aplicando los criterios de evaluación ya antes mencionados se puede decir que, ya que el r^2 (0.994328), es mayor que r^2 (0.98) y el IC (β_1) no incluye el cero, el sistema es lineal.

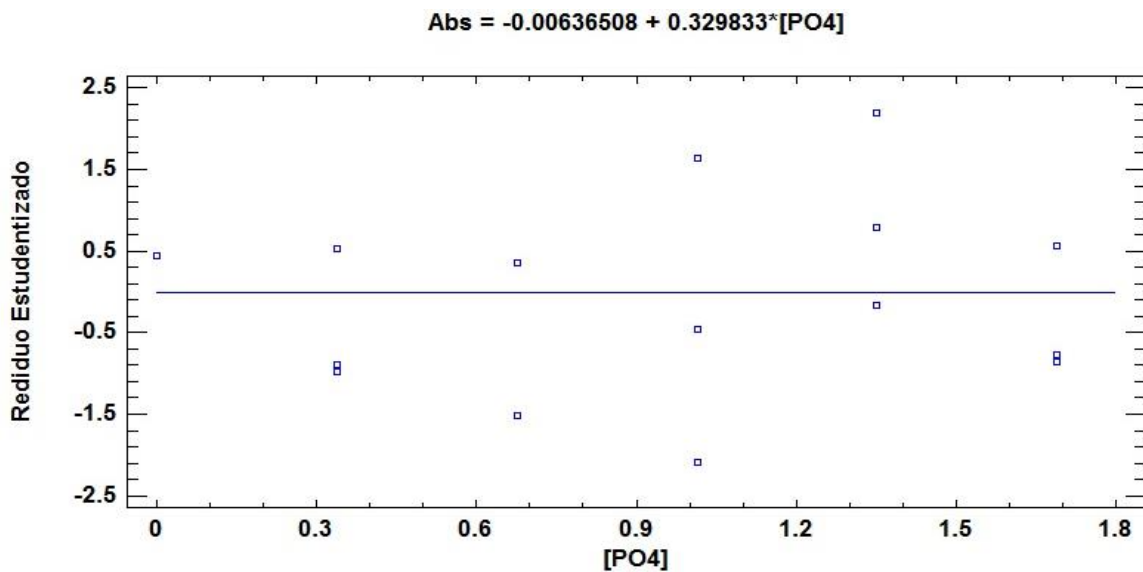


Figura 12. Diagrama de residuales de la Curva de calibración del sistema Hanna a microescala.

- **Recobro del kit Hanna**

Una vez obtenida la ecuación de la curva de calibración se despeja la concentración de fosfatos y se calcula (Tabla 25); a esta se le llama “concentración de fosfatos recuperada” y la graficó como función de la “concentración de fosfatos adicionada” (ver Figura 9). Además se obtuvo el porcentaje de recobro, con la ecuación 6.

$$\text{Recobro (\%)} = \left(\frac{[\text{Fosfatos recuperada}]}{[\text{Fosfatos adicionada}]} \right) \times 100 \dots \dots \dots (6)$$

Tabla 25. Resultados obtenidos de las soluciones para evaluar la linealidad del método Hanna a microescala

Corrida 1	Concentración Adicionada (mg PO ₄ ³ /L)	0	0.34	0.68	1.01	1.35	1.69
	A	0	0.091	0.195	0.300	0.437	0.559
	Concentración recuperada (mg PO ₄ ³ /L)	0	0.29	0.61	0.93	1.35	1.71
	Recobro (%)		87.35	90.33	91.62	99.44	101.44
Corrida 2	Concentración Adicionada (mg PO ₄ ³ /L)	0	0.34	0.68	1.01	1.35	1.69
	A	0	0.092	0.222	0.321	0.451	0.54
	Concentración recuperada (mg PO ₄ ³ /L)	0	0.30	0.69	0.99	1.38	1.66
	Recobro (%)		88.25	102.44	97.90	102.58	98.04
Corrida 3	Concentración Adicionada (mg PO ₄ ³ /L)	0	0.34	0.68	1.01	1.35	1.69
	A	0	0.113	0.222	0.351	0.468	0.539
	Concentración recuperada (mg PO ₄ ³ /L)	0	0.36	0.69	1.08	1.44	1.65
	Recobro (%)		107.09	102.44	106.87	106.40	97.86

Tabla 27. Coeficientes estadísticos para el recobro linealidad del método Hana.

Promedio de recobro (%)	98.67
Desviación estándar de recobro (%)	6.58
CV de recobro (%)	6.67

Por ello se graficó la concentración de fosfatos adicionada vs la concentración de fosfatos recuperada. Figura 13.

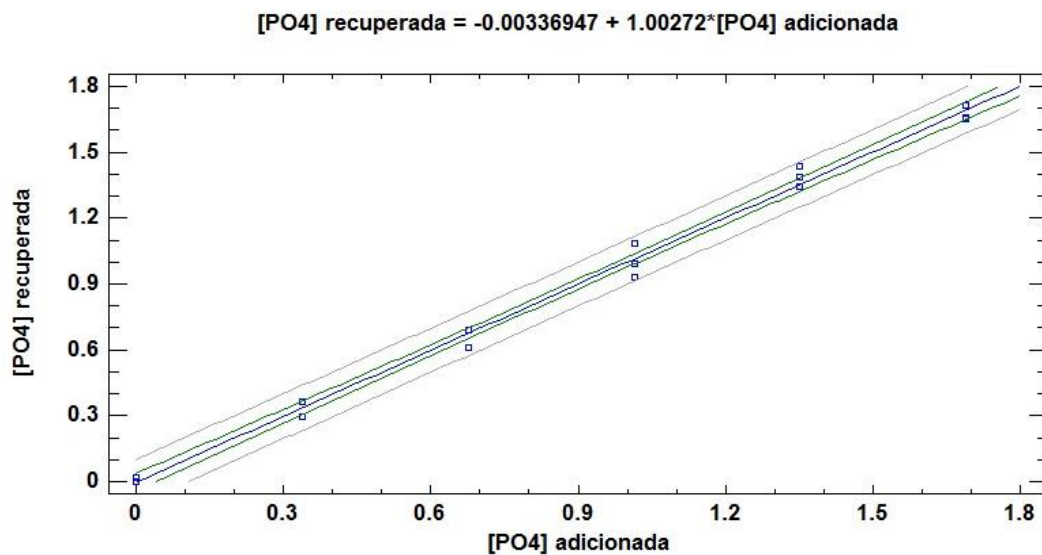


Figura 13. Recobro del método del kit Hanna a microescala.

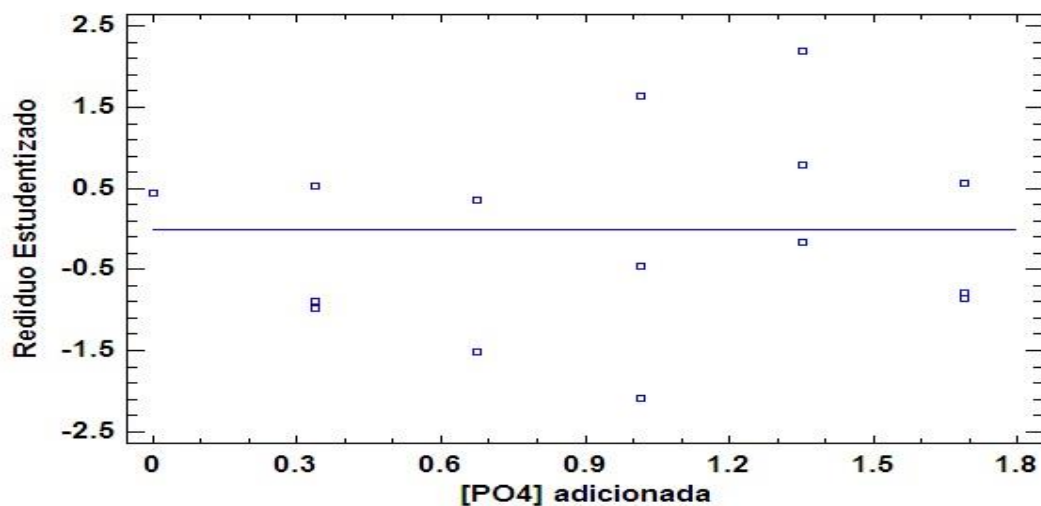


Figura 14. Diagrama de residuales del Recobro del método Hanna a microescala.

Gracias al análisis de los coeficientes estadísticos establecidos obtenidos en esta prueba Tabla 28, en donde se observa que su intercepto (ordenada al origen) es muy cercana a cero, mientras que su pendiente es prácticamente de uno, esto nos indica que no existe una diferencia significativa entre la concentración de fosfatos adicionada y la recuperada. Análisis completo se puede ver ANEXO 1.

Tabla 28. Coeficientes estadísticos para la linealidad del método de Hanna

Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-0.00336947	0.0191936	-0.175552	0.8628
Pendiente	1.00272	0.0187601	53.4494	0.0000

Por lo que se puede establecer una relación entre la concentración de fosfatos adicionada y la recuperada como se puede observar en la Figura 10, quedando de la siguiente manera:

$$[PO_4^{3-}]_{recuperada} = -0.00336947 + 1.00272 * [PO_4^{3-}]_{adicionada} \dots \dots \dots (7)$$

Con los resultados obtenidos se puede aplicar los criterios de aceptación (Colegio Nacional QFB, 2016), y comprobar si el método de Hanna fue lineal o no.

Como el coeficiente de determinación (r^2) obtenido es 0.997211 y este fue mayor que el coeficiente de determinación (r^2) que es de 0.98, el IC (β_1) va de 0.9839599 a 1.0214801 por lo que incluye la unidad, mientras que el IC (β_0) va de -0.02256307 a 0.01582413 por lo que incluye el cero, tal como se muestra en la tabla 30, se puede decir que es lineal tanto por los residuales, como por el r^2 aunque su C. V sea mayor a 3%

- **Curva de calibración del método Merck**

Para determinar la linealidad del método se realizó tres repeticiones con 5 niveles distintos, de concentración que se prepararon según el apartado 2.4.3, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Resultados experimentales para linealidad del método partir del kit de Merck a microescala

Corrida 1		Corrida 2		Corrida 3	
Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A	Concentración (mg PO ₄ ³⁻ /L)	A
0	0	0	0	0	0
2.04	0.355	2.04	0.503	2.04	0.29
4.08	0.761	4.08	0.731	4.08	0.737
8.16	1.487	8.16	1.528	8.16	1.552
12.24	2.067	12.24	2.044	12.24	2.046
16.62	2.893	16.62	2.839	16.62	2.865

Para el análisis de los resultados de la Tabla 29 se utilizó el programa statgraphics centurion XVI en los cuales se aplicó en un análisis ANOVA, con intervalos de confianza y predicción al 95%, puede verse el análisis completo ANEXO1, mostrados en la Figura 15.

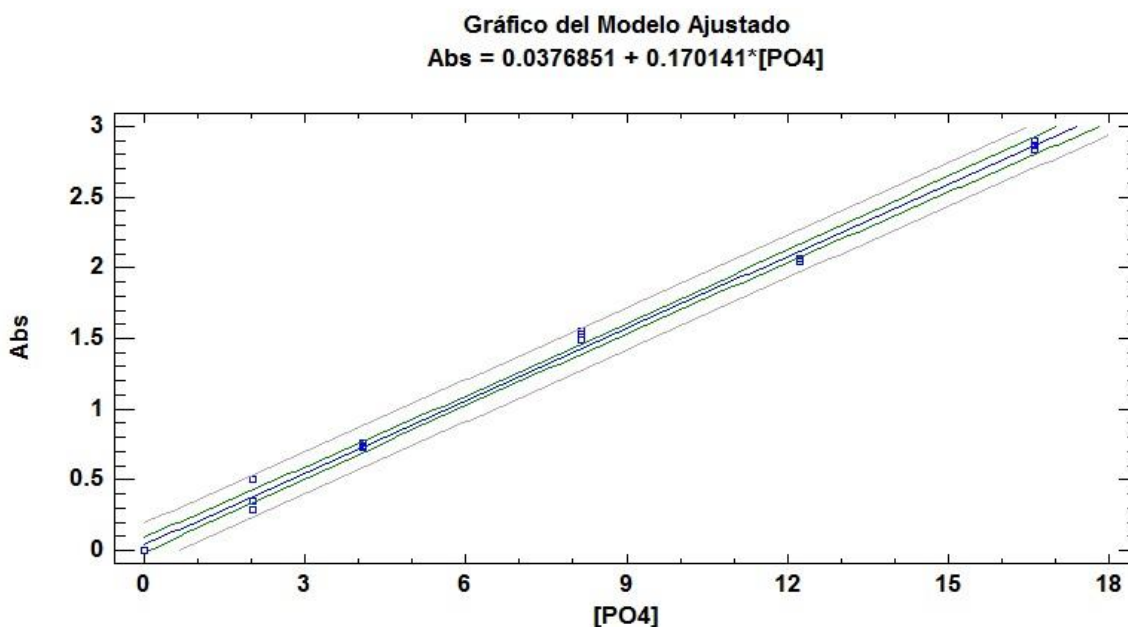


Figura 15. Curva de calibración del sistema Merck a microescala

Al igual que en el caso de Hanna es importante hacer un análisis estadístico para determinar si verdaderamente cumple con la linealidad en la curva de calibración y así poder establecer la ecuación correspondiente, para poder calcular el porcentaje de recobro.

$$A = 0.0376851 + 0.170141 * [PO_4^{3-}] \dots \dots \dots (8)$$

Coefficiente de correlación (r)= 0.997894

Coefficiente de determinación (r^2) = 0.995793

Al igual que en el caso anterior se realizó el análisis de residuos lo cual se muestra en la Figura 16. Con podemos determinar que tiene una distribución homogénea lo que nos indica que las muestras fueron tomadas de manera aleatoria. Además de ser homoscedástico y que existe independencia entre los datos.

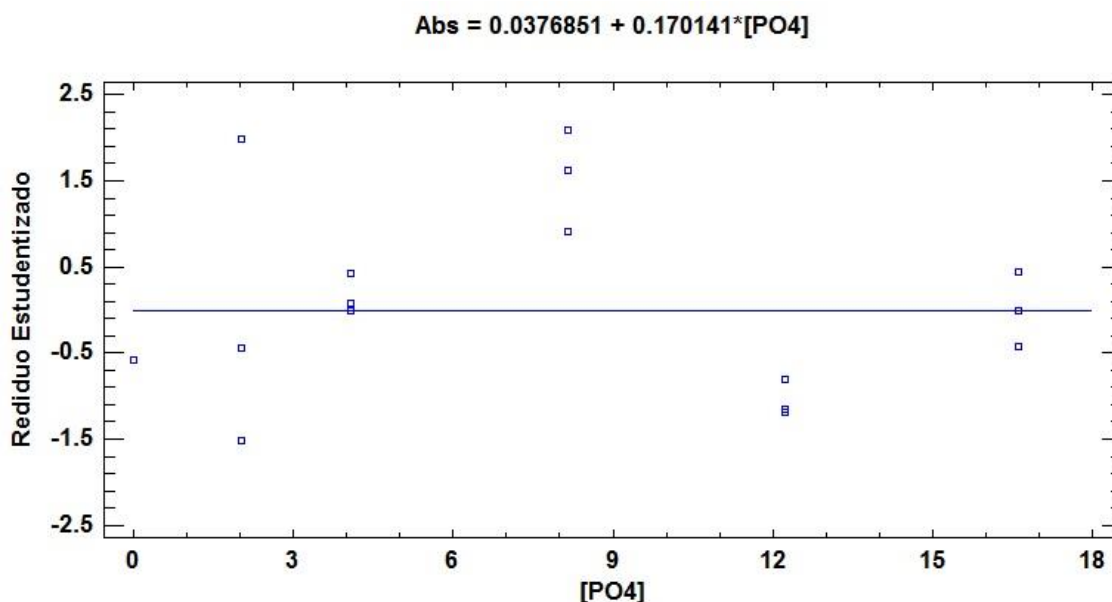


Figura 16. Diagrama de dispersión Curva de calibración de Merck

Una vez determinada la ecuación de la curva de calibración del método se utiliza para calcular la concentración de fosfatos recuperada, para posteriormente graficarla con la cantidad de fosfatos adiciona con ella calcular el Recobro y evaluar los criterios de aceptación de la misma forma que se hizo con el kit de Hanna.

Recobro de Merck

Tabla 30. Resultados obtenidos la linealidad del método Merck a microescala

Corrida 1	Concentración Adicionada (mg PO ₄ ³ /L)	0.000	2.040	4.080	8.160	12.240	16.620
	A	0.000	0.355	0.761	1.487	2.067	2.893
	Concentración recuperara (mg PO ₄ ³ /L)	0.000	1.870	4.250	8.520	11.93	16.79
	Recobro (%)		91.420	104.190	104.34	97.440	10.097
Corrida 2	Concentración Adicionada (mg PO ₄ ³ /L)	0.000	2.040	4.080	8.16	12.24	16.62
	A	0.000	0.503	0.731	1.528	2.044	2.839
	Concentración recuperara (mg PO ₄ ³ /L)	0.000	2.73	4.07	8.16	12.24	16.46
	Recobro (%)		134.06	99.87	107.34	96.34	99.06
Corrida 3	Concentración Adicionada (mg PO ₄ ³ /L)	0.000	2.04	4.08	8.16	12.24	16.62
	A	0.000	0.29	0.737	1.552	2.046	2.865
	Concentración recuperara (mg PO ₄ ³ /L)	0.000	1.49	4.11	8.90	11.80	16.62
	Recobro (%)		72.69	100.74	109.07	96.43	99.98

Se estimó que la cantidad de fosfatos recuperados esta entre los intervalos de 101.00 ± 12.94 de la concentración total de fosfatos.

Tabla 31. Coeficientes estadísticos para el recobro linealidad del método del kit Merck

Promedio de recobro (%)	101.00
Desviación estándar de recobro (%)	12.94
CV de recobro (%)	12.801

Se graficó la concentración de fosfatos adicionada vs la concentración de fosfatos recuperada de los datos de la Tabla 30, los cuales se apreciarán en la Figura 17.

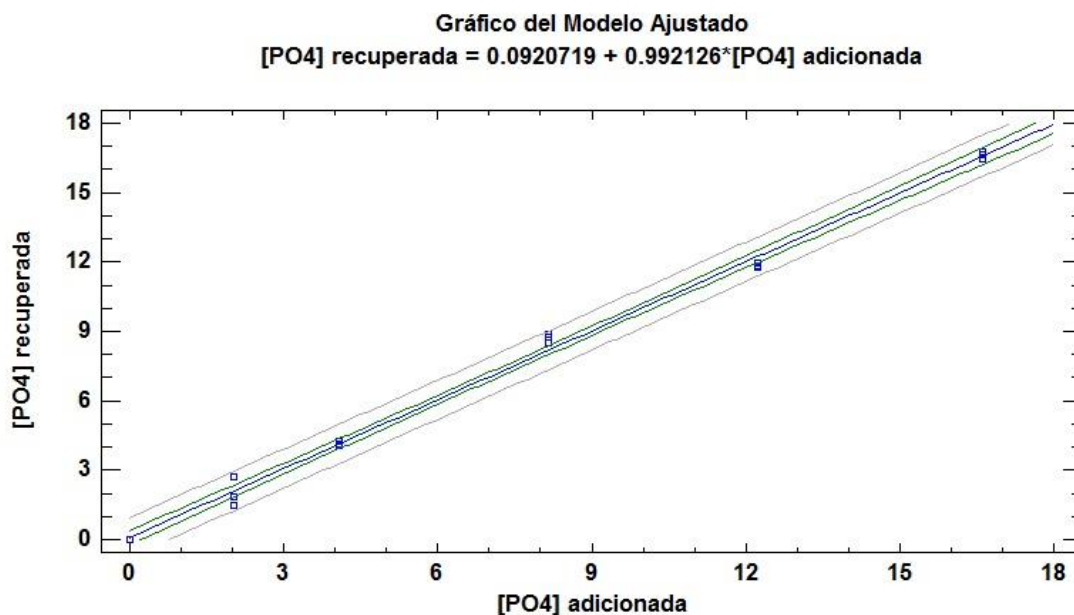


Figura 17. Linealidad del método del kit Merck a microescala

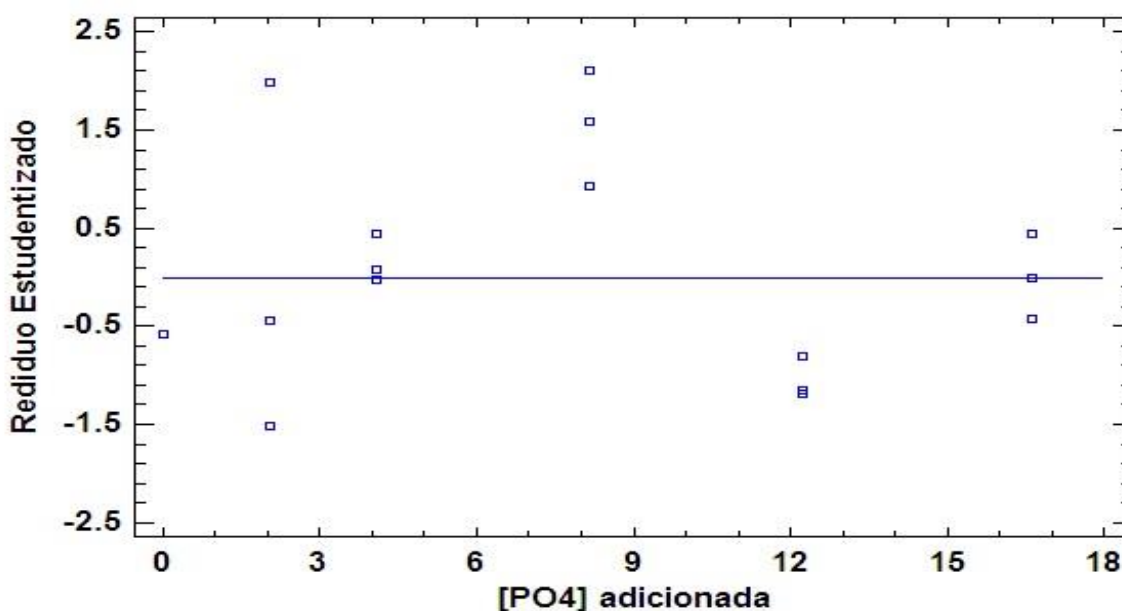


Figura 18. Efecto de matriz para Merck

A través del análisis de los coeficientes estadísticos establecidos obtenidos en esta prueba Tabla 32, se nota que su intercepto (ordenada al origen) es muy cercano a cero, mientras que su pendiente es prácticamente de uno Tabla 35; esto indica que no existe una diferencia significativa entre la concentración de fosfatos adicionada y la recuperada; (Puede apreciarse el análisis completo en el Anexo 1).

Tabla 32. Coeficientes estadísticos para la linealidad del método de Merck

Parámetro	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.0920719	0.143688	0.640775	0.5307
Pendiente	0.992126	0.0155329	63.8724	0.0000

A través de la Tabla 35. Se establece la relación que existe ente la concentración de fosfatos adicionada y la concentración de fosfatos recuperada tal como lo muestra la Figura 14. Quedando de la siguiente manera:

$$[PO_4^{3-}]_{\text{recuperada}} = 0.0920719 + 0.992126 * [PO_4^{3-}]_{\text{adicionada}} \dots \dots \dots (9)$$

Como el coeficiente de determinación (r^2) obtenido es 0.996093 y este es mayor que el coeficiente de determinación (r^2) que es de 0.98, el IC (β_1) incluye la unidad, el IC (β_0) incluye el cero se puede determinar que es un sistema lineal, aunque tenga el porcentaje del coeficiente de variación mayor 3 el cual solo nos indica la precisión del sistema.

- **Efecto de matriz**

El efecto de matriz es un efecto indeterminado de las especies que *rodean* a la muestra, cuando el efecto de una especie es determinado se conoce como interferencia (McNaught, 1997), para evaluar este efecto se hace la comparación de dos curvas de calibración; una con un placebo analítico (agua de garrafón) y la otra con disolvente (agua tridestilada), para ambos kits, si existe diferencia entre la sensibilidad de las curva se dice que existe efecto de matriz, esto se vuelve evidente con la diferencia entre los valores de las pendientes.

Efecto matriz Hanna

Al comparar las curvas de calibración (Figura 19), podemos darnos cuenta como existe diferencia entre las pendientes (Tabla 33), por lo que decimos que existe el efecto de matriz, también nos damos cuenta que la pendiente del agua de garrafón es mayor que la del agua tridestilada, esto se puede deber por las siguientes interferencias que se encuentra en el agua; Ag^+ , AsO_4^{3-} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , CN^- , Cr^{3+} , $Cr_2O_7^{2-}$, Cu^{2+} , F^- , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , NH_4^+ , Ni^{2+} , NO_2^- , Pb^{2+} , S^{2-} , SiO_3^{2-} , SO_3^{2-} , Zn^{2+} , EDTA, Surfactantes, Na-acetato, NaCl, Na_2SO_4 , $NaNO_3$, (Programming Data for Spectrophotometer and Spectroquant®, 2017).

Tabla 33. Comparación de coeficientes para Hanna

Matriz	Intercepto	Pendiente
Garrafón	-0.00636508	0.329833
tridestilada	0.00657692	0.278737

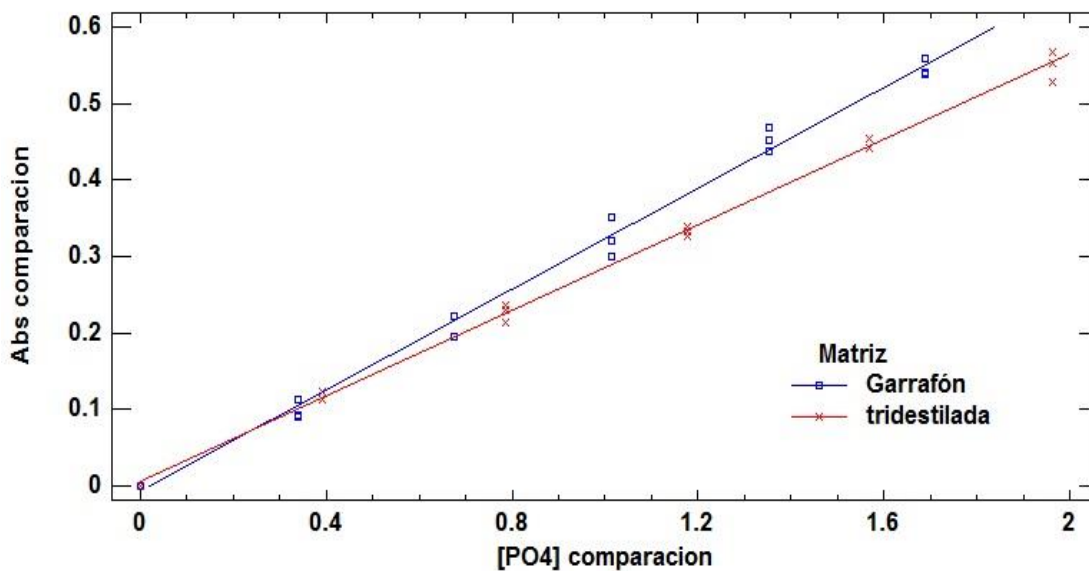


Figura 19. Efecto de matriz para Hanna

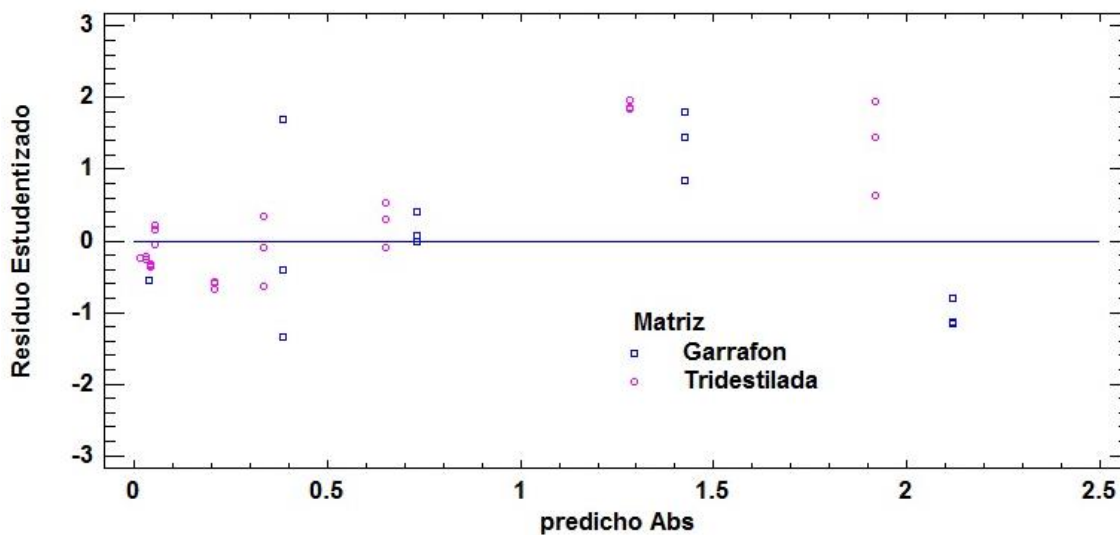


Figura 20. Comparación de residuales de agua tridestilada vs agua de garrafón para el kit Hanna

○ *Efecto matriz Merck*

La Figura 21 nos muestra la comparación de las curvas de calibración, y la Tabla 34 nos muestra como las pendientes de ambas curvas son diferentes, también vemos que la

pendiente de la curva preparada en agua de garrafón es mayor y esto se puede deber a las mismas interacciones descritas en la p. 46, el análisis completo puede verse en el Anexo 1.

Tabla 34. Comparación de coeficientes para Merck

Matriz	Intercepto	Pendiente
Garrafón	0.0377845	0.170114
Tridestilada	0.018119	0.155052

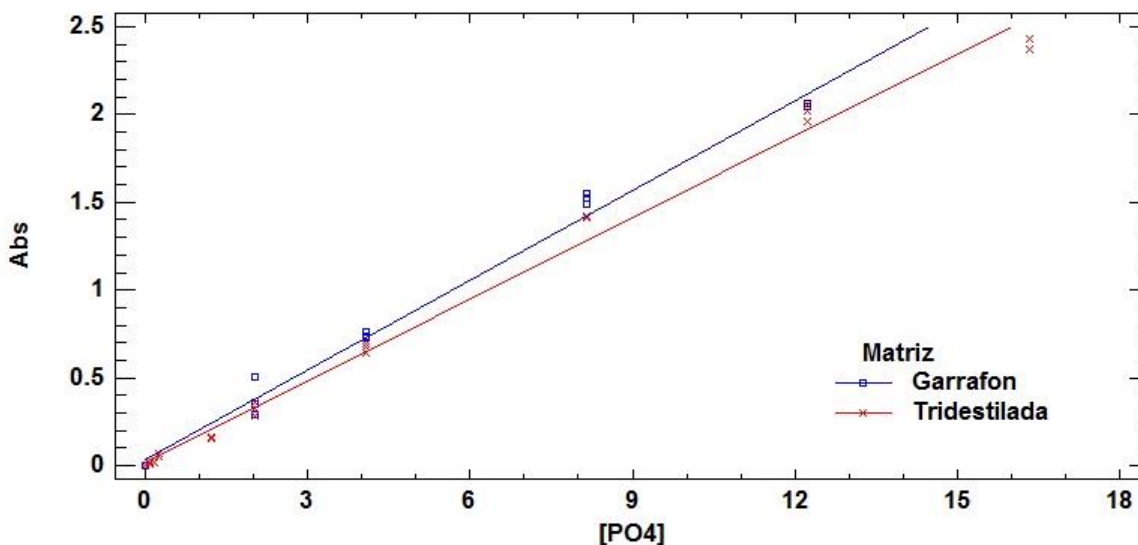


Figura 21. Efecto de matriz para Merck.

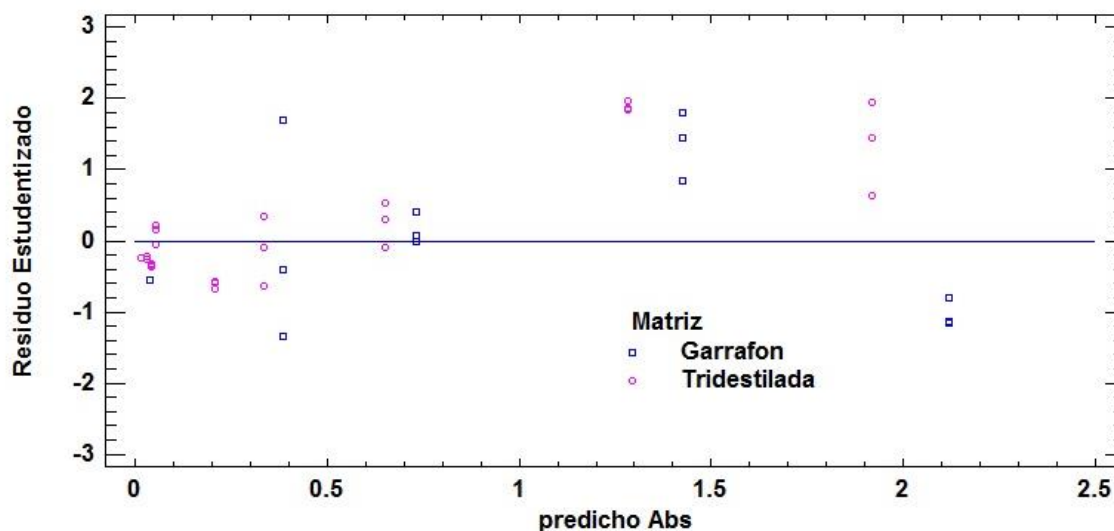


Figura 22. Comparación de residuales de agua tridestilada vs agua de garrafón para el kit Merck.

En la figura 22, se puede comparar los residuales que existen en el sistema, en ambos casos se puede decir que fueron tomados de forma aleatoria y que existe homocedasticidad las curvas.

3.4 Precisión del método

Para determinar la precisión de un método analítico se debe tomar una muestra analítica por triplicado, dos días diferentes, y hacer el análisis para determinar si cumple o no con los criterios de aceptación ya antes mencionados.

En la tabla 35 se presentan los resultados experimentales obtenidos para ambos kits.

Tabla 35. Resultados obtenidos para la precisión del método

Muestra	A experimentales					
	1	2	3	1	2	3
Hanna	0.352	0.346	0.363	0.357	0.365	0.357
Merck	1.392	1.4	1.426	1.425	1.393	1.47

Tabla 36. Coeficientes estadísticos para la precisión del método

	Hanna	Merck
Promedio	0.3566	1.4176
Desviación estándar para la precisión del método	0.0070	0.0298
CV para la precisión del método (%)	1.962	2.102

En la Tabla 36, podemos notar que el porcentaje del coeficiente de variación para Hanna (1.962) y para Merck (2.102), aplicando los criterios de evaluación podemos notar que ambos kits cumplen al tener un porcentaje de variación menor del 3 % establecido por el colegio de QFB's.

3.5. Exactitud

Podemos establecer la exactitud del método a través de los resultados obtenidos de comparar como se aprecia en la Tabla 44 donde para Merck (96.85 % a 99.31%) y para Hanna (79.86% a 83%), en donde podemos notar que para ambos kits a microescala el Recobro no incluye el 100%, por lo que no son exactos.

3.6. Sensibilidad

La sensibilidad nos permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una concentración (Frik, 1979), y es la pendiente de la curva de calibración de cada uno de los kits a microescala. La sensibilidad del kit Merck a microescala fue de 0.17114 L/mg PO₄³⁻ mientras que la sensibilidad del kit Hanna a microescala es de 0.329833L/mg PO₄³⁻. Por lo que podemos darnos cuenta que el método de Hanna es más sensible que el de Merck ya

que su capacidad de respuesta es mayor, lo que confirma que esa pudiera ser la razón por la que es recomendado para utilizarse en un rango bajo de concentraciones de fosfatos.

3.7. Límite de detección (LOD)

Para calcular el límite de detección utilizamos la ecuación 1; los cálculos pueden ver en el Anexo 2, obteniendo los resultados de la Tabla 37:

Tabla 37. Límites de detección.

	Método del kit Hanna (mg/L)	Método del kit Merck (mg/L)
LOD	0.15	1.45

3.8. Límite de cuantificación (LOQ)

Para calcular el límite de detección utilizamos la ecuación 2; los cálculos pueden verse en el Anexo 2, obteniendo los siguientes resultados Tabla 38:

Tabla 38. Límites de cuantificación.

	Método Hanna (mg/L)	Método de Merck (mg/L)
LOQ	0.46	4.40

En el caso del método del kit Hanna se obtuvo un LOD más bajo y de igual manera un límite de cuantificación (LOQ) menor que el del kit Merck.

Por otra parte, tanto el límite de cuantificación y detección e fueron calculados a partir de la desviación estándar de regresión de las curvas de calibración ($S_{y/x}$), (Colegio Nacional de QFB, 2016).

3.9. Comparación entre los kits Hanna y Merck

Una vez establecidos tanto los límites de detección y cuantificación para determinar si hay diferencia significativa entre ambos kits se prepararon una serie de 5 mediciones para una concentración mayor que 1.45 mg PO_4^{3-} /L ya que esta es la cantidad mínima detectada por el kit Merck y menor a 1.65 mg PO_4^{3-} /L ya que esta es la cantidad máxima de nuestra curva de calibración en el kit de Hanna por estas razones se trabajó a una concentración de 1.57 mg PO_4^{3-} /L; (Tabla 39).

Tabla 39. Comparación entre los kits Hanna y Merck

Réplica	Absorbancia		Concentración recuperada PO_4^{3-} (mg/L)	
	Hanna	Merck	Hanna	Merck
1	0.527	0.292	1.61	1.50
2	0.54	0.308	1.65	1.59
3	0.52	0.307	1.60	1.59
4	0.555	0.291	1.70	1.49

Se pudo comparar ambos resultados a través de un diagrama de caja con bigotes el cual es un estudio no paramétrico que nos permite identificar si la diferencia es significativa entre medias y varianzas; también se comparó por una prueba de Fisher, el cual es un estudio paramétrico que al igual que el anterior, permite saber si hay diferencia significativa entre las medias para ambos kits.

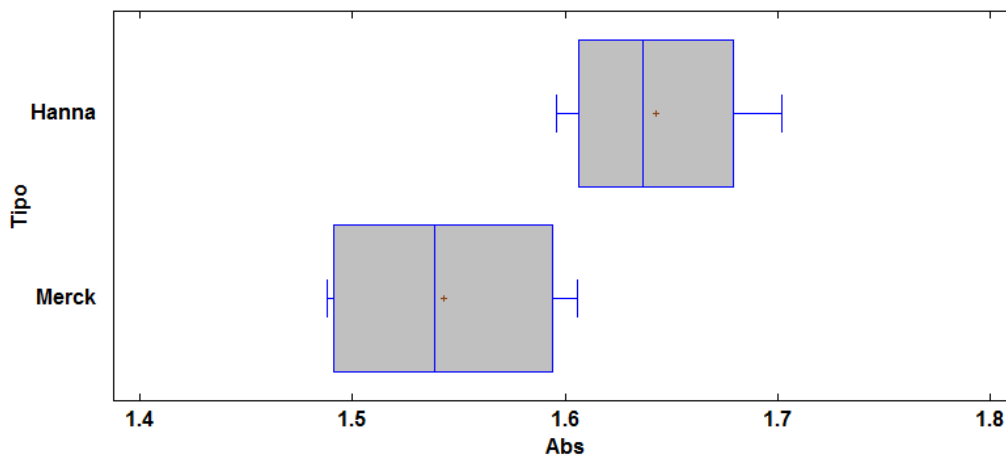


Figura 23. Comparación de los kits a través de un estudio no paramétrico (caja con bigotes)

En la figura 23 se puede apreciar con claridad cómo, al no coincidir las cajas, se vuelve evidente que si existe diferencia significativa entre las medias.

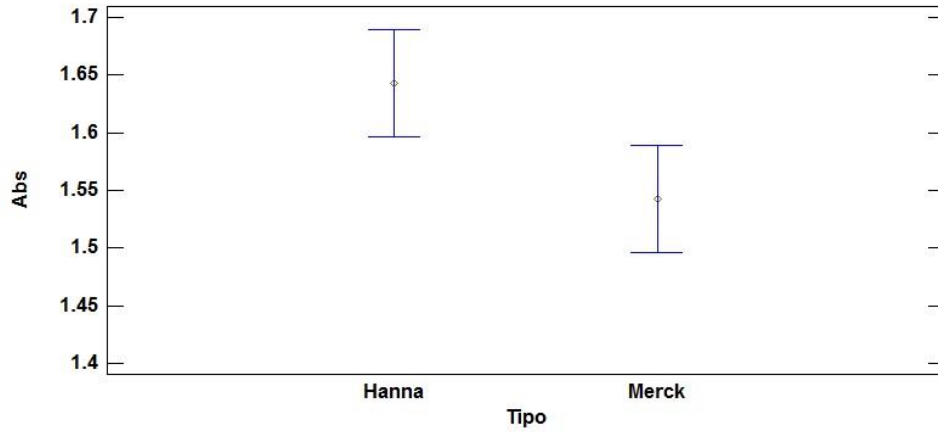


Figura 24. Comparación de los kits a través de un estudio paramétrico (Fisher).

A través de la Figura24, fue posible confirmar que, si existen diferencias significativas entre las medias de ambos kits; esto se puede ver en el Figura 21, ya a que no hay un traslape ente los intervalos.

Conclusiones

- ✚ Se validaron exitosamente los kits comerciales Hanna y Merck para su utilización a microescala que la determinación de fosfatos, lo cual nos beneficiará al reducir de forma significativa el uso de reactivos, al disminuir el costo de análisis y reduciendo la generación de residuos.
- ✚ El kit de Hanna a microescala fue más sensible, por lo que su límite de detección y de cuantificación menores a comparación con el del kit Merck.
- ✚ Es importante considerar que el kit de Hanna solo se utiliza en un intervalo bajo de concentraciones de fosfatos, pero posee una menor precisión.
- ✚ Ambos kits probaron ser precisos.
- ✚ Ninguno de los 2 kits probó ser exacto puesto que el Recobro obtenido para ambos casos no incluyó el 100 %.
- ✚ Considerando que las determinaciones de fosfatos en muestras reales se realizan en cuerpos de agua de muy diferente composición y a veces de naturaleza compleja. Se pudo identificar que la composición de la matriz donde se midieron los fosfatos tiene una influencia significativa en su correcta determinación por lo que se necesitará hacer la curva de calibración del sistema en particular.

Referencias

- ✚ Baeza. A. (2006). Química a microescala total, Facultad de química. UNAM, México.
- ✚ Barrientos. L. (2013). Eutrofización en ríos brasileños. Enciclopedia Biósfera. Brazil.
- ✚ Cádiz, M.G., Monserrat, G. A. (2015). Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible. Biotecnia, XVII, 32.
- ✚ Catalano, M. (1960). Química analítica Cuantitativa Teoría y práctica. Buenos Aires: Kapelusz.
- ✚ Centro Nacional de Metrología (2005). Método analítico adecuado a su propósito, guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. México: Eurachem.
- ✚ Clescerl, L. S., Greenber, A. E., Eaton, A. D. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Eashington, Estados Unidos: Board.
- ✚ Condesa F. V. Condesa.R.V. Condesa R.L.A. Ross G.V. (1997). Metodología para la evaluación del impacto ambiental 3ª ed. Ediciones Mundi-Presa. España Madrid
- ✚ DOF (2001). NMX-AA-029-SCFI-2001. Análisis de aguas - determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
- ✚ Ferguson, A. (1968), Environmental science and Technology, American Chemical Society. Estados Unidos
- ✚ Frick, J. S., Schenk, G. H. (1979). Química Analítica Cuantitativa. México: Limusa.
- ✚ Guía de validación del método analítico (2016), 2nd Edición, Colegio Nacional de químicos farmacéuticos biólogos A.C.
- ✚ García S. Ochoa E.S. Cruz C.G Nava. V. J. Villalpando. B.F (2016) Manantiales y ríos Duero Michoacán. Operación, calidad y cantidad. Revista Internacional de la Contaminación Ambiental 31 (1) 55- 68
- ✚ Kemmer F.N. McCallion. J (1989) Manual del agua Su naturaleza, tratamiento y aplicaciones, Tomo 1 , 1ª edn, McGraw-Hill, México.
- ✚ Kiely G., Veza J. M. (1999). Ingeniería Ambiental: fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. España: Mc Graw-Hill interamericana de España.

- ✚ López. M. Madroñero. S. (2015). Estado trófico de un lago tropical de montaña: caso Laguna de Cocha. Ciencia e Ingeniería Neogranadina. Disponible en : <http://www.scielo.org.co/pdf/cein/v25n2/v25n2a02.pdf>
- ✚ Organización mundial de la salud. Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio (2005).
- ✚ Mas. M (2017). Uso de la teledetección de los SIG en la vigilancia de la calidad del agua: aplicación al Mar Menor. Universidad Politécnica de Cartagena. España.
- ✚ McNaught A.D, Wilkinson A. (1997) Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the “Gold Book”). IUPAC.Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- ✚ Miranda G.G.F. Rosales M. V. (2018) Eutrofización, una amenaza para el recurso hídrico. UNAM.México. disponible en : http://ru.iiec.unam.mx/4269/1/2-Vol2_Parte1_Eje3_Cap5-177-Garc%C3%ADa-Miranda.pdf
- ✚ Miranda, R. R. (2010). Prácticas de laboratorio química orgánica verde. Costa Rica: Tecnología de Costa Rica.
- ✚ Moreno F. Quintero M. J. López C.A .(2010) Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia , México, disponible en: <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/eutrofia2.pdf>
- ✚ Moriarty.F. (1990) Ecotoxicology: A Study of Pollutants in Ecosystems, 2nd edn. Academic Press, London.
- ✚ Morris Bader (1980) .A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. J.Chem.Educ. 57 (10) 703.
- ✚ Moss,B (1998). Ecology of Freshwaters Man and Medium, 2nd, ED. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- ✚ Orozco, B. C., Pérez S. A., Nieves G.M. (2003). Contaminación ambiental una visión desde la química. Madrid, España: Thomson.
- ✚ Merck (2017). Programming Data for Spectrophotometer and Spectroquant® Test Kits measured with a Reference Spectrophotometer.
- ✚ Turk, J., Wittes, J. (1973). Ecología contaminación medio ambiente. México: Interamericana.
- ✚ Vogel, A. I. (1960),Química Analítica Cuantitativa Teoría y Práctica, Argentina:Kapelusz

- ✚ Zárate, A. (2010), Química Analítica expresión gráfica de las reacciones químicas, México, UNAM, .disponible en :
http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/LIBRO_TEXTO_DIAGRAMAS_ALEX_BAEZA_2010_17628.pdf
- ✚ Dolores M. Encinas. M (2011), Medio ambiente y contaminación principios básicos, 1^{ar}, ,México, Autor-editor, disponible en :
<https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/16784/Medio%20Ambiente%20y%20Contaminaci%C3%B3n.%20Principios%20b%C3%A1sicos.pdf?sequence=6>

Anexo 1

Análisis ANOVA para la linealidad del sistema

Podemos establecer la linealidad del sistema a través del coeficiente de determinación estableciendo la curva de calibración, así como un análisis estadístico ANOVA para determinar si el modelo elegido es el adecuado.

- Sistema Hanna a microescala

Para determinar si la ordenada al origen (intercepto) es igual a cero se hace un análisis estadístico tanto de t Studen, así como de p de probabilidad.

$$H_0: b_0 = 0$$

$$H_1: b_0 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, Anexo 3, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 41, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (1.30195) es menor a 2.16 y p (0.2114) es mayor que 0.05 por lo que se acepta la hipótesis, y se puede decir que la ordenada al origen es igual a 0.

Del mismo modo que se utilizó para la ordenada al origen, aplica una prueba de hipótesis para la pendiente quedando de la siguiente manera:

$$H_0: b_1 = 0$$

$$H_1: b_1 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Student, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 40, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (79.6531) es mayor a 2.16 y p (0.0000) es menor que 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis lo que implica que la pendiente es diferente de 0.

Tabla 40. Coeficiente estadístico para la linealidad del sistema de Hanna a microescala

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0.00542857	0.00416957	1.30195	0.2114
Pendiente	279.535	3.50941	79.6531	0.0000

Para la determinar si un modelo se ajusta o no es necesario hacer un ANOVA con falta de ajuste, teniendo así la siguiente prueba de hipótesis:

H_0 : Existe evidencia de que el modelo no se ajuste a los datos

H_1 : El modelo no se ajusta a los datos

Se acepta si

$$F_{v_1, v_2}^{\alpha} > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^{α} ($F_{4, 12}^{0.05} = 3.259$) a través de los grados de libertad de la Tabla 41 y la tabla de Fisher con un $\alpha=0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (0.89) es menor que F_{v_1, v_2}^{α} y como P (0.5015) es mayor que 0.05 se acepta la H_0 por lo que se dice que el modelo se ajusta a los datos.

Tabla 41. ANOVA con carencia de ajuste para la linealidad del sistema de Hanna a microescala

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.631735	1	0.631735	6344.62	0.0000
Residuo	0.00159312	16	0.0000995702		
Carencia de Ajuste	0.000363124	4	0.000090781	0.89	0.5015
Error Puro	0.00123	12	0.0001025		
Total (Corr.)	0.633328	17			

- Sistema Merck a microescala

Para determinar si la ordenada al origen (intercepto) es igual a cero se hace un análisis estadístico tanto de t Studen, así como de p de probabilidad.

$$H_0: b_0 = 0$$

$$H_1: b_0 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, Anexo 3, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 42, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (1.02352) es menor a 2.16 y p (0.3148) es mayor que 0.05 por lo que se acepta la hipótesis, y se puede decir que la ordenada al origen es igual a 0.

Del mismo modo que se utilizó para la ordenada al origen, aplica una prueba de hipótesis para la pendiente quedando de la siguiente manera:

$$H_0: b_1 = 0$$

$$H_1: b_1 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 42, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (62.2516) es mayor a 2.16 y p (0.0000) es menor que 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis lo que implica que la pendiente es diferente de 0.

Tabla 42. Coeficiente estadístico para la linealidad del sistema de Merck a microescala

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0.018119	0.0177026	1.02352	0.3148
Pendiente	155.052	2.49074	62.2516	0.0000

Para la determinar si un modelo se ajusta o no es necesario hacer un ANOVA con falta de ajuste, teniendo así la siguiente prueba de hipótesis:

H_0 : Existe evidencia de que el modelo no se ajuste a los datos

H_1 : El modelo no se ajusta a los datos

Se acepta si

$$F_{v_1, v_2}^\alpha > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^α ($F_{8, 20}^{0.05} = 2.447$) a través de los grados de libertad de la Tabla 43 y la tabla de Fisher con un $\alpha=0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (36.02) es mayor que F_{v_1, v_2}^α y como P (0.000) es menor que 0.05, Tabla 43, se dice que existe un modelo que se adecua más a los datos, sin embargo en la Tabla 44 el modelo de linealidad tiene un coeficiente de correlación es de 0.9964 por lo que su coeficiente de determinación es de 0.9928 mayor que el establecido en la guía de QFB', llegando a la conclusión de que aunque existe un modelo que se ajusta mejor el modelo linear se puede utilizar ya que cumple con los criterios establecidos para la linealidad.

Tabla 43. ANOVA con carencia de ajuste para la linealidad del sistema de Merck a microescala

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	22.1162	1	22.1162	3875.26	0.0000
Residuo	0.159797	28	0.00570703		
Carencia de Ajuste	0.149426	8	0.0186783	36.02	0.0000
Error Puro	0.0103707	20	0.000518533		
Total (Corr.)	22.276	29			

Tabla 45: Comparación de modelos alternos para la linealidad del sistema de Merck a microescala

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Raíz Cuadrada Doble	0.9977	99.54%
Lineal	0.9964	99.28%
Cuadrado Doble	0.9915	98.31%
Cuadrado de Y	0.9827	96.56%
Raíz Cuadrada de X	0.9739	94.85%
Raíz Cuadrada de Y	0.9594	92.05%
Cuadrado de X	0.9430	88.92%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	0.9075	82.36%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	0.8587	73.73%
Exponencial	<sin ajuste>	
Inversa de Y	<sin ajuste>	
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	

Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	
Logaritmo de X	<sin ajuste>	
Raíz Cuadrada-Y Log-X	<sin ajuste>	
Multiplcativa	<sin ajuste>	
Inversa-Y Log-X	<sin ajuste>	
Cuadrado-Y Log-X	<sin ajuste>	
Inversa de X	<sin ajuste>	
Raíz Cuadrada-Y Inversa de X	<sin ajuste>	
Curva S	<sin ajuste>	
Doble Inverso	<sin ajuste>	
Cuadrado-Y Inversa de X	<sin ajuste>	
Log-Y Cuadrado-X	<sin ajuste>	
Inversa-Y Cuadrado-X	<sin ajuste>	
Logístico	<sin ajuste>	
Log probit	<sin ajuste>	

Análisis ANOVA para la linealidad de la curva de calibración del método

Podemos establecer la linealidad del sistema a través del coeficiente de determinación estableciendo la curva de calibración, así como un análisis estadístico ANOVA para determinar si el modelo elegido es el adecuado.

- Curva de calibración Hanna a microescala

Para determinar si la ordenada al origen (intercepto) es igual a cero se hace un análisis estadístico tanto de t Studen, así como de p de probabilidad.

$$H_0: b_0 = 0$$

$$H_1: b_0 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, Anexo 3, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 45, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la $t_{exp} (-0.008983)$ es menor a 2.16 y p (0.3327) es mayor que 0.05 por lo que se acepta la hipótesis, y se puede decir que la ordenada al origen es igual a 0.

Del mismo modo que se utilizó para la ordenada al origen, aplica una prueba de hipótesis para la pendiente quedando de la siguiente manera:

$$H_0: b_1 = 0$$

$$H_1: b_1 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Student, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 45, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (52.9624) es mayor a 2.16 y p (0.0000) es menor que 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis lo que implica que la pendiente es diferente de 0.

Tabla 45. Coeficiente estadístico para la curva de calibración del método de Hanna a microescala

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.00636508	0.00637156	-0.998983	0.3327
Pendiente	329.833	6.22768	52.9624	0.0000

Para la determinar si un modelo se ajusta o no es necesario hacer un ANOVA con falta de ajuste, teniendo así la siguiente prueba de hipótesis:

H_0 : Existe evidencia de que el modelo no se ajuste a los datos

H_1 : El modelo no se ajusta a los datos

Se acepta si

$$F_{v_1, v_2}^{\alpha} > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^{α} ($F_{4, 12}^{0.05} = 3.259$) a través de los grados de libertad de la Tabla 46 y la tabla de Fisher con un $\alpha = 0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (0.92) es menor que F_{v_1, v_2}^{α} y como P (0.4822) es mayor que 0.05 se acepta la H_0 por lo que se dice que el modelo se ajusta a los datos.

Tabla 46. ANOVA con carecía de ajuste para la curva de calibración del método Hanna a microescala

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.652191	1	0.652191	2805.02	0.0000
Residuo	0.00372014	16	0.000232509		
Carencia de Ajuste	0.000875473	4	0.000218868	0.92	0.4822
Error Puro	0.00284467	12	0.000237056		
Total (Corr.)	0.655912	17			

- Curva de calibración Merck a microescala

Para determinar si la ordenada al origen (intercepto) es igual a cero se hace un análisis estadístico tanto de t Studen, así como de p de probabilidad.

$$H_0: b_0 = 0$$

$$H_1: b_0 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, Anexo 3, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 47, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (1.24494) es menor a 2.16 y p (0.2350) es mayor que 0.05 por lo que se acepta la hipótesis, y se puede decir que la ordenada al origen es igual a 0.

Del mismo modo que se utilizó para la ordenada al origen, aplica una prueba de hipótesis para la pendiente quedando de la siguiente manera:

$$H_0: b_1 = 0$$

$$H_1: b_1 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 47, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (38.6063) es mayor a 2.16 y p (0.0000) es menor que 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis lo que implica que la pendiente es diferente de 0.

Tabla 47. Coeficiente estadístico para la curva de calibración del método de Merck a microescala

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0.0377845	0.0303503	1.24494	0.2351
Pendiente	170.114	4.40637	38.6063	0.0000

Para la determinar si un modelo se ajusta o no es necesario hacer un ANOVA con falta de ajuste, teniendo así la siguiente prueba de hipótesis:

H_0 : Existe evidencia de que el modelo no se ajuste a los datos

H_1 : El modelo no se ajusta a los datos

Se acepta si

$$F_{v_1, v_2}^{\alpha} > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^{α} ($F_{3, 10}^{0.05} = 3.708$) a través de los grados de libertad de la Tabla 48 y la tabla de Fisher con un $\alpha=0.05$, Anexo 3.

Tabla 48, ANOVA con carencia de ajuste para la curva de calibración del método Merck a microescala

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	8.38199	1	8.38199	1490.44	0.0000
Residuo	0.0731097	13	0.00562382		
Carencia de Ajuste	0.0462877	3	0.0154292	5.75	0.0150
Error Puro	0.026822	10	0.0026822		
Total (Corr.)	8.4551	14			

Se puede establecer que como F (5.75) es mayor que F_{v_1, v_2}^{α} y como P (0.0150) es menor que 0.05, Tabla 48, se dice que existe un modelo que se adecua más a los datos, sin embargo en la Tabla 49 el modelo de linealidad tiene un coeficiente de correlación es de 0.9957 por lo que su coeficiente de determinación es de 0.9914 mayor que el establecido en la guía de QFB', llegando a la conclusión de que aunque existe un modelo que se ajusta mejor el modelo lineal se puede utilizar ya que cumple con los criterios establecidos para la linealidad.

Tabla 49: Comparación de modelos alternos para la curva de calibración del método de Merck a microescala

<i>Modelo</i>	<i>Correlación</i>	<i>R-Cuadrada</i>
Raíz Cuadrada Doble	0.9969	99.38%
Lineal	0.9957	99.14%
Cuadrado Doble	0.9940	98.80%
Cuadrado de Y	0.9788	95.81%
Raíz Cuadrada de X	0.9614	92.43%
Cuadrado de X	0.9433	88.98%
Raíz Cuadrada de Y	0.9400	88.36%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	0.8737	76.33%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	0.8246	67.99%
Exponencial	<sin ajuste>	
Inversa de Y	<sin ajuste>	
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	
Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	
Logaritmo de X	<sin ajuste>	
Raíz Cuadrada-Y Log-X	<sin ajuste>	
Multiplicativa	<sin ajuste>	
Inversa-Y Log-X	<sin ajuste>	
Cuadrado-Y Log-X	<sin ajuste>	
Inversa de X	<sin ajuste>	
Raíz Cuadrada-Y Inversa de X	<sin ajuste>	
Curva S	<sin ajuste>	
Doble Inverso	<sin ajuste>	
Cuadrado-Y Inversa de X	<sin ajuste>	
Log-Y Cuadrado-X	<sin ajuste>	
Inversa-Y Cuadrado-X	<sin ajuste>	
Logístico	<sin ajuste>	
Log probit	<sin ajuste>	

Análisis ANOVA para la linealidad del método

Podemos establecer la linealidad del sistema a través del coeficiente de determinación estableciendo la curva de calibración, así como un análisis estadístico ANOVA para determinar si el modelo elegido es el adecuado.

- Linealidad del método de Hanna a microescala

Para determinar si la ordenada al origen (intercepto) es igual a cero se hace un análisis estadístico tanto de t Studen, así como de probabilidad.

$$H_0: b_0 = 0$$

$$H_1: b_0 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, Anexo 3, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 50, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (-1.87988) es menor a 2.16 y p (0.0785) es mayor que 0.05 por lo que se acepta la hipótesis, y se puede decir que la ordenada al origen es igual a 0.

Del mismo modo que se utilizó para la ordenada al origen, aplica una prueba de hipótesis para la pendiente quedando de la siguiente manera:

$$H_0: b_1 = 0$$

$$H_1: b_1 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 50, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (56.9033) es mayor a 2.16 y p (0.0000) es menor que 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis lo que implica que la pendiente es diferente de 0.

Tabla 50. Coeficiente estadístico para la linealidad del método de Hanna a microescala

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.0000341203	0.0000181502	-1.87988	0.0785
Pendiente	1.00948	0.0177404	56.9033	0.0000

Para la determinar si un modelo se ajusta o no es necesario hacer un ANOVA con falta de ajuste, teniendo así la siguiente prueba de hipótesis:

$$H_0: \text{Existe evidencia de que no es el modelo}$$

$H_1: Es\ el\ modelo$

Se acepta si

$$F_{v_1, v_2}^\alpha > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^α ($F_{4, 12}^{0.05} = 3.259$) a través de los grados de libertad de la Tabla 51 y la tabla de Fisher con un $\alpha=0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (3237.99) es menor que F_{v_1, v_2}^α y como P (0.000) es mayor que 0.05 se rechaza la H_0 por lo que se dice que es el modelo.

Tabla 51: ANOVA con carecía de ajuste para la linealidad del método de Hanna a microescala

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00000610923	1	0.00000610923	3237.99	0.0000
Residuo	3.01878E-8	16	1.88674E-9		
Carencia de Ajuste	3.01878E-8	4	7.54695E-9		
Error Puro	0	12	0		
Total (Corr.)	0.00000613942	17			

- Linealidad del método de Merck a microescala

Para determinar si la ordenada al origen (intercepto) es igual a cero se hace un análisis estadístico tanto de t Studen, así como de p de probabilidad.

$$H_0: b_0 = 0$$

$$H_1: b_0 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, Anexo 3, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 52, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (-0.00000) es menor a 2.16 y p (1.00) es mayor que 0.05 por lo que se acepta la hipótesis, y se puede decir que la ordenada al origen es igual a 0.

Del mismo modo que se utilizó para la ordenada al origen, aplica una prueba de hipótesis para la pendiente quedando de la siguiente manera:

$$H_0: b_1 = 0$$

$$H_1: b_1 \neq 0$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$t_{exp} < t_{tab}$$

$$p > 0.05$$

Podemos establecer el $t_{tab} = 2.16$ a través de la tabla t Studen, tanto el t_{exp} como p de probabilidad puede ver en la Tabla 52, al aplicar los criterios de aceptación tenemos que la t_{exp} (38.6063) es mayor a 2.16 y p (0.0000) es menor que 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis lo que implica que la pendiente es diferente de 0.

Tabla 52. Coeficiente estadístico para la linealidad del método de Hanna a microescala

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-2.0977E-10	0.000178412	-0.00000117576	1.0000
Pendiente	0.999997	0.0259025	38.6063	0.0000

Para la determinar si un modelo se ajusta o no es necesario hacer un ANOVA con falta de ajuste, teniendo así la siguiente prueba de hipótesis:

H_0 : Existe evidencia de que no es el modelo

H_1 : Es el modelo

Se acepta si

$$F_{v_1, v_2}^\alpha > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^α ($F_{3, 13}^{0.05} = 3.411$) a través de los grados de libertad de la Tabla 53 y la tabla de Fisher con un $\alpha = 0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (5.75) es mayor que F_{v_1, v_2}^α y como P (0.0150) es menor que 0.05, se puede decir que existe un modelo que ajusta mejor a los datos, sin embargo en la Tabla 54 podemos ver como el modelo que mejor se ajusta es una raíz doble cuadrada, sin embargo el modelo de linealidad tiene un coeficiente de correlación es de por lo que su

coeficiente de determinación (r^2) es igual a ,mayor que el establecido en la guía de QFB's, se puede concluir que el modelo linear se puede utilizar, para predecir el comportamiento de la curva.

Tabla 53: ANOVA con carecía de ajuste para la linealidad del método de Hanna a microescala

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0.000289646	1	0.000289646	1490.44	0.0000
Residuo	0.00000252636	13	1.94335E-7		
Carencia de Ajuste	0.0000015995	3	5.33168E-7	5.75	0.0150
Error Puro	9.26854E-7	10	9.26854E-8		
Total (Corr.)	0.000292172	14			

Tabla 54: Comparación de modelos alternos para la linealidad del método de Merck a microescala

<i>Modelo</i>	<i>Correlación</i>	<i>R-Cuadrada</i>
Lineal	0.9957	99.14%
Raíz Cuadrada de X	0.9614	92.43%
Cuadrado de X	0.9433	88.98%
Raíz Cuadrada de Y	<sin ajuste>	
Exponencial	<sin ajuste>	
Inversa de Y	<sin ajuste>	
Cuadrado de Y	<sin ajuste>	
Raíz Cuadrada Doble	<sin ajuste>	
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	
Inversa-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	<sin ajuste>	
Logaritmo de X	<sin ajuste>	
Raíz Cuadrada-Y Log-X	<sin ajuste>	
Multiplicativa	<sin ajuste>	
Inversa-Y Log-X	<sin ajuste>	
Cuadrado-Y Log-X	<sin ajuste>	
Inversa de X	<sin ajuste>	
Raíz Cuadrada-Y Inversa de X	<sin ajuste>	
Curva S	<sin ajuste>	
Doble Inverso	<sin ajuste>	
Cuadrado-Y Inversa de X	<sin ajuste>	
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	<sin ajuste>	
Log-Y Cuadrado-X	<sin ajuste>	
Inversa-Y Cuadrado-X	<sin ajuste>	
Cuadrado Doble	<sin ajuste>	
Logístico	<sin ajuste>	
Log probit	<sin ajuste>	

Análisis ANOVA para el efecto matriz

Podemos establecer la linealidad del sistema a través del coeficiente de determinación estableciendo la curva de calibración, así como un análisis estadístico ANOVA para determinar si el modelo elegido es el adecuado.

- Análisis ANOVA para el efecto matriz del método a microescala de Hanna

Para determinar si la ordenada al origen (intercepto) es igual a cero se hace un análisis estadístico tanto de F de Fisher, así como de p de probabilidad.

$$H_0: b_0 (\text{tridestilada}) = b_0 (\text{garrafón})$$

$$H_1: b_0 (\text{tridestilada}) \neq b_0 (\text{garrafón})$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$F_{v_1, v_2}^\alpha > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^α ($F_{1,3}^{0.05} = 10.128$) a través de los grados de libertad de la Tabla 55 y la tabla de Fisher con un $\alpha=0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (60.53) es mayor que F_{v_1, v_2}^α y como P (0.0000) es menor que 0.05, se puede decir que existe diferencia entre los interceptos.

Prueba de hipótesis para la pendiente:

$$H_0: b_1 (\text{tridestilada}) = b_1 (\text{garrafón})$$

$$H_1: b_1 (\text{tridestilada}) \neq b_1 (\text{garrafón})$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$F_{v_1, v_2}^\alpha > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^α ($F_{1,3}^{0.05} = 10.128$) a través de los grados de libertad de la tabla 55 y la tabla de Fisher con un $\alpha=0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (52.45) es mayor que F_{v_1, v_2}^α y como P (0.0000) es menor que 0.05, se puede decir que existe diferencia entre las pendientes.

Tabla 55: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para el efecto matriz de Hanna

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
[PO4]	1.26566	1	1.26566	7622.63	0.0000
Interceptos	0.0100509	1	0.0100509	60.53	0.0000
Pendientes	0.00870869	1	0.00870869	52.45	0.0000
Modelo	1.28442	3			

- Análisis ANOVA para el efecto matriz del método a microescala de Merck

Para determinar si la ordenada al origen (intercepto) es igual a cero se hace un análisis estadístico tanto de F de fisher, así como de p de probabilidad.

$$H_0: b_0 (\text{tridestilada}) = b_0 (\text{garrafón})$$

$$H_1: b_0 (\text{tridestilada}) \neq b_0 (\text{garrafón})$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$F_{v_1, v_2}^\alpha > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^α ($F_{1,3}^{0.05} = 10.128$) a través de los grados de libertad de la Tabla 56 y la tabla de Fisher con un $\alpha=0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (16.29) es mayor que F_{v_1, v_2}^α y como P (0.0002) es menor que 0.05, se puede decir que existe diferencia entre los interceptos.

Prueba de hipótesis para la pendiente:

$$H_0: b_1 (\text{tridestilada}) = b_1 (\text{garrafón})$$

$$H_1: b_1 (\text{tridestilada}) \neq b_1 (\text{garrafón})$$

Parámetros de aceptación

Se acepta H_0 si

$$F_{v_1, v_2}^\alpha > F$$

$$p > 0.05$$

Ponemos determinar el F_{v_1, v_2}^α ($F_{1,3}^{0.05} = 10.128$) a través de los grados de libertad de la Tabla 56 y la tabla de Fisher con un $\alpha=0.05$, Anexo 3.

Se puede establecer que como F (8.80) es menor que F_{v_1, v_2}^α , pero el como P (0.0050) es menor que 0.05, se puede decir que existe diferencia entre las pendientes, ya que no cumple las dos condicionantes.

Tabla 56: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para el efecto matriz de Hanna

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
[PO4]	30.8899	1	30.8899	5437.75	0.0000
Interceptos	0.0925502	1	0.0925502	16.29	0.0002
Pendientes	0.0499695	1	0.0499695	8.80	0.0050
Modelo	31.0324	3			

Anexo 2

- *Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)*

Para la determinación del límite de detección se utilizó la fórmula 1, (Colegio Nacional de QFB, 2016)

$$LOD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \dots\dots\dots (1)$$

Mientras que para el límite de cuantificación se utilizó la fórmula 2, (Colegio Nacional de QFB, 2016)

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \dots\dots\dots (2)$$

En donde:

$S_{y/x}$ = *desviación estandar de regresión*

b_1 = *pendiente*

Estos valores fueron obtenidos a través del análisis estadístico hecho durante la obtención de la curva de calibración para el método tanto para el caso de Hanna, así como en el caso de Merck.

- Hanna

$$S_{y/x} = 0.0152482$$

$$b_1 = 0.329833$$

Sustituyendo valores en la fórmula 1.

$$LOD = \frac{3.3 \times 0.0152482}{0.329833} = 0.15259$$

Sustituyendo valores en la fórmula 2.

$$LOQ = \frac{10 \times 0.0152482}{0.329833} = 0.4623$$

- Merck

$$S_{y/x} = 0.0749921$$

$$b_1 = 0.170114$$

Sustituyendo valores en la fórmula 1.

$$LOD = \frac{3.3 \times 0.0749921}{0.170114} = 1.454753$$

Sustituyendo valores en la fórmula 2.

$$LOQ = \frac{10 \times 0.0749921}{0.170114} = 4.408343$$

Anexo 3

Tabla 57. t de Student

Percentiles de la distribución t de Student con n grados de libertad.
En la última fila aparecen los percentiles de la Normal (0, 1) para $n \rightarrow \infty$

n \ p	0.75	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.000000	3.07768	6.31375	12.7062	31.8205	63.6567
2	0.816497	1.88562	2.91999	4.30285	6.96456	9.92484
3	0.764892	1.63774	2.35336	3.18245	4.54070	5.84091
4	0.740697	1.53321	2.13185	2.77645	3.74695	4.60409
5	0.726687	1.47588	2.01505	2.57058	3.36493	4.03214
6	0.717558	1.43976	1.94318	2.44691	3.14267	3.70743
7	0.711142	1.41492	1.89458	2.36462	2.99795	3.49948
8	0.706387	1.39682	1.85955	2.30600	2.89646	3.35539
9	0.702722	1.38303	1.83311	2.26216	2.82144	3.24984
10	0.699812	1.37218	1.81246	2.22814	2.76377	3.16927
11	0.697445	1.36343	1.79588	2.20099	2.71808	3.10581
12	0.695483	1.35622	1.78229	2.17881	2.68100	3.05454
13	0.693829	1.35017	1.77093	2.16037	2.65031	3.01228
14	0.692417	1.34503	1.76131	2.14479	2.62449	2.97684
15	0.691197	1.34061	1.75305	2.13145	2.60248	2.94671
16	0.690132	1.33676	1.74588	2.11991	2.58349	2.92078
17	0.689195	1.33338	1.73961	2.10982	2.56693	2.89823
18	0.688364	1.33039	1.73406	2.10092	2.55238	2.87844
19	0.687621	1.32773	1.72913	2.09302	2.53948	2.86093
20	0.686954	1.32534	1.72472	2.08596	2.52798	2.84534
21	0.686352	1.32319	1.72074	2.07961	2.51765	2.83136
22	0.685805	1.32124	1.71714	2.07387	2.50832	2.81876
23	0.685306	1.31946	1.71387	2.06866	2.49987	2.80734
24	0.684850	1.31784	1.71088	2.06390	2.49216	2.79694
25	0.684430	1.31635	1.70814	2.05954	2.48511	2.78744
26	0.684043	1.31497	1.70562	2.05553	2.47863	2.77871
27	0.683685	1.31370	1.70329	2.05183	2.47266	2.77068
28	0.683353	1.31253	1.70113	2.04841	2.46714	2.76326
29	0.683044	1.31143	1.69913	2.04523	2.46202	2.75639
30	0.682756	1.31042	1.69726	2.04227	2.45726	2.75000
31	0.682486	1.30946	1.69552	2.03951	2.45282	2.74404
32	0.682234	1.30857	1.69389	2.03693	2.44868	2.73848
33	0.681997	1.30774	1.69236	2.03452	2.44479	2.73328
34	0.681774	1.30695	1.69092	2.03224	2.44115	2.72839
35	0.681564	1.30621	1.68957	2.03011	2.43772	2.72381
36	0.681366	1.30551	1.68830	2.02809	2.43449	2.71948
37	0.681178	1.30485	1.68709	2.02619	2.43145	2.71541
38	0.681001	1.30423	1.68595	2.02439	2.42857	2.71156
39	0.680833	1.30364	1.68488	2.02269	2.42584	2.70791
40	0.680673	1.30308	1.68385	2.02108	2.42326	2.70446
41	0.680521	1.30254	1.68288	2.01954	2.42080	2.70118
42	0.680376	1.30204	1.68195	2.01808	2.41847	2.69807
43	0.680238	1.30155	1.68107	2.01669	2.41625	2.69510

Fuente: Fernández L.C y Mansilla M.A (2012)

Tabla 58. F de Fisher-Snedecor

Percentiles de la distribución F de Fisher-Snedecor
con m grados de libertad en el numerador y n en el denominador

n	p	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0.9	39.003	49.590	53.903	55.833	57.240	58.204	58.966	59.439	59.850	60.195	60.473	60.705	60.903	61.073	61.220
	0.95	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	242.98	243.91	244.69	245.36	245.95
	0.975	647.79	799.50	864.16	899.58	921.85	937.11	948.22	956.68	963.28	968.83	973.03	976.71	979.84	982.53	984.87
	0.99	4052.2	4999.5	5403.4	5624.6	5763.6	5859.0	5928.4	5981.1	6022.5	6053.8	6083.3	6106.3	6129.9	6142.7	6157.3
	0.995	162.11	19999	21615	22590	23056	23437	23715	23925	24091	24224	24334	24426	24505	24572	24630
2	0.9	8.5263	9.6090	9.1618	9.2434	9.2924	9.3250	9.3491	9.3668	9.3805	9.3916	9.4006	9.4081	9.4145	9.4200	9.4247
	0.95	18.513	19.090	19.164	19.247	19.296	19.330	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.413	19.419	19.424	19.429
	0.975	38.596	39.090	39.165	39.248	39.298	39.331	39.355	39.373	39.387	39.398	39.407	39.415	39.421	39.427	39.431
	0.99	98.593	99.090	99.166	99.249	99.299	99.333	99.356	99.374	99.388	99.399	99.408	99.416	99.422	99.428	99.433
	0.995	198.50	199.09	199.17	199.25	199.30	199.33	199.36	199.37	199.39	199.40	199.41	199.42	199.42	199.43	199.43
3	0.9	5.5388	5.4624	5.3900	5.3426	5.3092	5.2847	5.2662	5.2517	5.2400	5.2304	5.2224	5.2156	5.2098	5.2047	5.2003
	0.95	10.129	9.5521	9.2766	9.1172	9.0135	8.9406	8.8907	8.8452	8.8123	8.7855	8.7633	8.7446	8.7287	8.7149	8.7029
	0.975	17.443	16.044	15.439	15.101	14.885	14.735	14.624	14.540	14.473	14.419	14.374	14.337	14.304	14.277	14.253
	0.99	34.116	30.817	29.457	28.710	28.237	27.911	27.672	27.489	27.345	27.229	27.133	27.052	26.983	26.924	26.872
	0.995	55.552	48.799	47.467	46.195	45.392	44.838	44.434	44.126	43.882	43.686	43.524	43.387	43.271	43.172	43.085
4	0.9	4.5448	4.3246	4.1909	4.1072	4.0506	4.0097	3.9790	3.9549	3.9357	3.9199	3.9067	3.8955	3.8859	3.8776	3.8704
	0.95	7.7086	6.9643	6.5914	6.3882	6.2561	6.1651	6.0967	6.0410	5.9988	5.9644	5.9358	5.9117	5.8911	5.8733	5.8578
	0.975	12.218	10.649	9.9792	9.6045	9.3645	9.1973	9.0741	8.9796	8.9047	8.8439	8.7939	8.7512	8.7150	8.6838	8.6565
	0.99	21.198	18.090	16.694	15.977	15.522	15.207	14.976	14.799	14.659	14.546	14.452	14.374	14.307	14.249	14.198
	0.995	31.333	26.284	24.259	23.155	22.456	21.975	21.622	21.352	21.139	20.967	20.824	20.705	20.603	20.515	20.438
5	0.9	4.0694	3.7797	3.6195	3.5202	3.4530	3.4045	3.3679	3.3393	3.3163	3.2974	3.2816	3.2682	3.2567	3.2468	3.2380
	0.95	6.6079	5.7881	5.4995	5.1922	5.0503	4.9503	4.8759	4.8183	4.7725	4.7351	4.7040	4.6782	4.6552	4.6358	4.6188
	0.975	10.037	8.4338	7.7638	7.3879	7.1484	6.9777	6.8531	6.7572	6.6811	6.6192	6.5678	6.5245	6.4876	6.4558	6.4277
	0.99	16.258	13.274	12.060	11.382	10.967	10.672	10.456	10.289	10.150	10.051	9.9626	9.8883	9.8248	9.7700	9.7222
	0.995	22.785	18.314	16.530	15.596	14.940	14.513	14.200	13.961	13.772	13.618	13.491	13.384	13.293	13.215	13.146
6	0.9	3.7159	3.4633	3.2888	3.1898	3.1075	3.0546	3.0145	2.9830	2.9577	2.9369	2.9195	2.9047	2.8920	2.8809	2.8712
	0.95	5.9874	5.1433	4.7571	4.5337	4.3874	4.2839	4.2067	4.1468	4.0990	4.0600	4.0274	3.9999	3.9764	3.9559	3.9381
	0.975	8.8131	7.2599	6.5980	6.2272	5.9876	5.8198	5.6955	5.5996	5.5234	5.4613	5.4098	5.3662	5.3290	5.2968	5.2687
	0.99	13.745	10.925	9.7795	9.1483	8.7459	8.4661	8.2690	8.1017	7.9761	7.8741	7.7896	7.7183	7.6575	7.6049	7.5590
	0.995	18.635	14.544	12.917	12.028	11.484	11.073	10.786	10.568	10.391	10.250	10.133	10.034	9.9501	9.8774	9.8140
7	0.9	3.5894	3.2574	3.0741	2.9655	2.8833	2.8274	2.7849	2.7516	2.7247	2.7025	2.6839	2.6681	2.6545	2.6426	2.6322
	0.95	5.5914	4.7374	4.3468	4.1203	3.9715	3.8660	3.7870	3.7257	3.6767	3.6365	3.6030	3.5747	3.5503	3.5292	3.5107
	0.975	8.0727	6.5415	5.8898	5.5226	5.2852	5.1106	4.9949	4.8993	4.8232	4.7611	4.7095	4.6658	4.6285	4.5961	4.5678
	0.99	12.246	9.5466	8.4513	7.8466	7.4604	7.1914	6.9628	6.8409	6.7188	6.6201	6.5382	6.4691	6.4106	6.3590	6.3143
	0.995	16.236	12.404	10.882	10.050	9.5221	9.1553	8.8854	8.6781	8.5138	8.3893	8.2897	8.1984	8.1167	8.0429	7.9768
8	0.9	3.4579	3.1131	2.9238	2.8064	2.7284	2.6683	2.6241	2.5893	2.5612	2.5380	2.5188	2.5020	2.4876	2.4752	2.4642
	0.95	5.3177	4.4590	4.0662	3.8379	3.6875	3.5806	3.5005	3.4381	3.3881	3.3472	3.3130	3.2839	3.2596	3.2374	3.2184
	0.975	7.5799	6.0985	5.4160	5.0526	4.8173	4.6517	4.5286	4.4333	4.3572	4.2951	4.2434	4.1987	4.1622	4.1297	4.1012
	0.99	11.259	8.4491	7.5910	7.0061	6.6318	6.3707	6.1776	6.0289	5.9106	5.8143	5.7343	5.6667	5.6089	5.5589	5.5151
	0.995	14.688	11.042	9.5963	8.8051	8.3018	7.9520	7.6941	7.4899	7.3386	7.2106	7.1045	7.0149	6.9384	6.8721	6.8143
9	0.9	3.3933	3.0495	2.8129	2.6927	2.6106	2.5509	2.5035	2.4694	2.4463	2.4243	2.4031	2.3839	2.3666	2.3510	2.3368
	0.95	5.1174	4.2585	3.8625	3.6331	3.4817	3.3738	3.2927	3.2296	3.1789	3.1373	3.1025	3.0729	3.0475	3.0250	3.0061
	0.975	7.2093	5.7147	5.0781	4.7181	4.4844	4.3197	4.1970	4.1020	4.0260	3.9639	3.9121	3.8682	3.8306	3.7980	3.7694
	0.99	10.581	8.0215	6.9919	6.4221	6.0569	5.8018	5.6129	5.4671	5.3511	5.2585	5.1779	5.1114	5.0545	5.0052	4.9621
	0.995	13.614	10.107	8.7171	7.9559	7.4712	7.1339	6.8849	6.6933	6.5411	6.4172	6.3142	6.2274	6.1530	6.0887	6.0325
10	0.9	3.2850	2.9245	2.7277	2.6053	2.5216	2.4606	2.4140	2.3772	2.3473	2.3226	2.3018	2.2841	2.2687	2.2553	2.2430
	0.95	4.9646	4.1028	3.7083	3.4780	3.3258	3.2172	3.1395	3.0717	3.0204	2.9782	2.9430	2.9130	2.8872	2.8647	2.8450
	0.975	6.9387	5.4594	4.8256	4.4683	4.2381	4.0721	3.9498	3.8549	3.7790	3.7168	3.6649	3.6209	3.5832	3.5504	3.5217
	0.99	10.044	7.3594	6.5523	5.9943	5.6383	5.3858	5.2091	5.0567	4.9424	4.8491	4.7715	4.7059	4.6496	4.6008	4.5581
	0.995	12.826	9.4270	8.0807	7.3428	6.8724	6.5446	6.3025	6.1159	5.9676	5.8467	5.7462	5.6613	5.5887	5.5257	5.4707
11	0.9	3.2252	2.8590	2.6402	2.5162	2.4312	2.3691	2.3246	2.2894	2.2615	2.2382	2.2189	2.2017	2.1863	2.1725	2.1601
	0.95	4.8443	3.9823	3.5874	3.3567	3.2039	3.0946	3.0123	2.9480	2.8922	2.8536	2.8179	2.7876	2.7614	2.7386	2.7186
	0.975	6.7241	5.2559	4.6300	4.2751	4.0440	3.8907	3.7586	3.6438	3.5479	3.4679	3.3977	3.3426	3.2917	3.2450	3.2027
	0.99	9.6480	7.2057	6.2167	5.6683	5.3160	5.0692	4.8861	4.7449	4.6315	4.5393	4.4624	4.3974	4.3416	4.2932	4.2509
	0.995	12.226	8.9122	7.6904	6.8989	6.4217	6.1016	5.8648	5.6821	5.5369	5.4183	5.3197	5.2363	5.1649	5.1031	5.0489
12	0.9	3.1785	2.8068	2.6055	2.4801	2.3940	2.3310	2.2820	2.2446	2.2135	2.1878	2.1660	2.1474	2.1313	2.1173	2.1049
	0.95	4.7472	3.8853	3.4903	3.2592	3.1059	2.9966	2.9134	2.8486	2.7964	2.7534	2.7173	2.6866	2.6602	2.6371	2.6169
	0.975	6.5538	5.0959	4.4742	4.1212	3.8911	3.7283	3.6045	3.5118	3.4358	3.3736	3.3215	3.2773	3.2393	3.2062	3.1772
	0.99	9.3302	6.9286	5.9525	5.4120	5.0643	4.8206	4.6395	4.4994	4.3875	4.2981	4.2198	4.1553	4.0999	4.0518	4.0086
	0.995	11.754	8.5096	7.2258	6.5211	6.0711	5.7570	5.5245	5.3451	5.2021	5.0855	4.9884	4.9062	4.8358	4.7748	4.7213
13	0.9	3.1362	2.7632	2.5603	2.4337	2.3467	2.2830	2.2341	2.1953	2.1638	2.1376	2.1155	2.0966	2.0802		