



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPACTO DEL COMPORTAMIENTO LINEAL EN LA
CALIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS
ACTIVAS AL AZUL DE METILENO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA DE SISTEMAS-SISTEMAS DE CALIDAD

PRESENTA:

CAROLINA FLORES AVILA

TUTOR

MARÍA DE LOS ÁNGELES OLVERA TREVIÑO

FACULTAD DE QUÍMICA

México, D.F. octubre 2013



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. José Sabino Samano Castillo
Secretario: M. en C. Francisco Rojo Callejas
Vocal: Dr. Omar Amador Muñoz
1 er. Suplente: Dr. Alejandro Barragán Ocaña
2 d o. Suplente: Dra. Ma. De los Ángeles Olvera Treviño

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Departamento de Control Analítico, Facultad de Química, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES OLVERA TREVIÑO

FIRMA

**COMO PARTE FUNDAMENTAL PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO
QUIERO DAR UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL A:**

- Departamento de Control analítico de la Facultad de Química UNAM, a cargo de la **Q.F.B. María Luisa Carmen García y Padilla**, por todas las facilidades otorgadas para el desarrollo de la parte experimental.
- **Dra. María de los Ángeles Olvera Treviño** por su dirección y apoyo.
- **M. en C. Norma Ruth López Santiago** y al **Dr. Omar Amador Muñoz** por su tiempo y sus valiosas aportaciones.
- A los miembros del jurado: **Dr. José Sabino Samano Castillo, M. en C. Francisco Rojo Callejas** y **Dr. Alejandro Barragán Ocaña**.

Dedico este trabajo a todos los que me han apoyado, a veces, simplemente con escuchar y estar ahí, facilitándome las cosas o haciéndolas más ligeras.

De manera especial a mis padres, Luz y Rodolfo, a Kary, Javier y Edgar.

A Gabriel, Maestra Tere, Maestra María Luisa y Martha

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue verificar el comportamiento homocedástico del método de sustancias activas al azul de metileno, indicado en Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA-2002 "Productos y servicios, agua y hielo para consumo humano, envasado y a granel. Especificaciones Sanitarias", numeral 9.2, y evaluar su impacto en la calidad de las mediciones .

En este método está indicado como estándar de referencia el dodecilsulfonato de sodio (DBSNa) puesto que, por sus cualidades como surfactante aniónico, es un ingrediente básico en las formulaciones de detergentes, y por lo tanto, un contaminante muy frecuente en agua .

La metodología consistió en preparar 10 curvas de calibración de dodecilsulfonato de sodio independientes en cantidades de 10 a 200 μg . Se evaluó su ajuste lineal por mínimos cuadrados y su comportamiento homocedástico. El análisis mostró heterocedasticidad en las varianzas por lo que se efectuó un tratamiento de recta ponderado. Con ambos modelos de ajuste, ponderado y no ponderado, se calcularon los parámetros de regresión y el error de estimación.

Se analizaron seis muestras de ensayo cuya concentración de DBSNa se encontraban en los niveles de bajo, medio y alto de la curva, se obtuvieron los resultados utilizando ambos modelos, homocedástico y heterocedástico, y se evaluó si existía diferencia significativa entre ellos. Después del análisis de datos realizado se llegó a la conclusión de que, para éste método, en las condiciones descritas, los resultados no son estadísticamente diferentes.

(Palabras clave: regresión lineal, mínimos cuadrados, curva de calibración, homocedasticidad, heterocedasticidad, sustancias activas al azul de metileno)

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the behavior homocedástico of the method of active substances to methylene blue, indicated in Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA-2002 "products and services, water and ice for human consumption bottled and in bulk. Sanitary specifications", paragraph 9.2, and evaluate their impact on the quality of the measurements.

In this method is indicated as a reference standard dodecylbencensulfonato of sodium (DBSNa), for their qualities as anionic surfactant, it's a basic ingredient in detergents formulations, and therefore, a contaminant in water.

The methodology consisted in preparing 10 sodium dodecylbencensulfonato calibration curves in amounts of 10 to 200 μg . Its linear least squares adjustment and homocedástico behaviour were evaluated. The analysis showed heterocedasticity in the variances by what was a straight weighted treatment. With both models adjustment, weighted and non weighted, calculated the regression parameters and estimation error

Analysed six test samples with a concentration of DBSNa were in the levels of low, medium and high of curve, the results were obtained using both models, homocedástico and heterocedastico, and evaluate whether there was significant difference between them. After the data analysis it was concluded that, for this method, under the conditions above, the results are not statistically different.

(Key words: linear regression, least squares, curve calibration, homoscedasticity, heteroscedasticity, methylene blue active substances)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
1 INTRODUCCIÓN	16
1.1 SURFACTANTES	19
1.1.1 PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN DE SURFACTANTES.....	20
1.1.2 SURFACTANTES Y AMBIENTE.....	26
1.1.3 DETERMINACIÓN DE SURFACTANTES	28
1.1.4 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA EL ANÁLISIS DE SUSTANCIAS ACTIVAS AL AZUL DE METILENO	29
1.2 PRINCIPIO DE LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA Y VISIBLE	30
1.3 REGRESIÓN LINEAL SIMPLE	31
1.4 CALIBRACIÓN INDIRECTA O ANALÍTICA	31
1.5 ANÁLISIS DE REGRESIÓN	32
1.6 HOMOCEDASTICIDAD Y HETEROCEDASTICIDAD: LA DISTRIBUCIÓN DE LOS RESIDUALES	33
1.7 RECTAS DE MÍNIMOS CUADRADOS.....	34
1.7.1 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN LINEAL r	35
1.7.2 CÁLCULO DE ERRORES	36

1.7.3	HETEROCEDASTICIDAD: FACTORES DE PONDERACIÓN	38
1.8	PRUEBAS DE HIPÓTESIS	39
1.9	CONTRASTES DE LA NORMALIDAD DE UNA DISTRIBUCIÓN.....	40
1.10	ENSAYOS DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS	41
2	METODOLOGÍA	43
2.1	PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ESTÁNDAR	43
2.2	PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	43
2.3	ANÁLISIS INSTRUMENTAL	43
2.4	PROCEDIMIENTO.....	43
2.4.1	EXTRACCIÓN Y DESARROLLO DE COLOR	45
2.4.2	ACONDICIONAMIENTO DEL MÉTODO.....	46
2.4.3	CÁLCULOS.....	46
2.5	APLICACIONES A DISOLUCIONES Y MUESTRAS.....	48
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1	RESULTADOS SIN TRATAMIENTOS	50
3.2	RESULTADOS CONSIDERANDO LOS DATOS HOMOCEDÁSTICOS, (SIN PONDERAR).....	52
3.2.1	RESULTADOS DE LA REGRESIÓN	52
3.2.2	RESULTADOS DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR NO PONDERADA PARA LAS PREDICIONES EN LOS DIEZ NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN (S_{x_0}).....	55
3.2.3	RESULTADOS DE LÍMITES DE CONFIANZA	57
3.2.4	LÍMITE DE DETECCIÓN.....	60
3.2.5	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	61
3.3	PRUEBAS DE ADECUACIÓN DEL MODELO DE MÍNIMOS CUADRADOS	61
3.3.1	ANÁLISIS DE RESIDUOS.....	62

3.4	RESULTADOS CONSIDERANDO DATOS HETEROCEDÁSTICOS (RECTAS PONDERADAS)	72
3.4.1	RESULTADOS DE LA REGRESIÓN PONDERADA	72
3.4.2	RESULTADOS DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE UNA PREDICCIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN (s_{x_0w}).....	73
3.4.3	LÍMITES DE CONFIANZA PONDERADO.....	74
3.4.4	LÍMITE DE DETECCIÓN.....	77
3.4.5	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	78
3.5	COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE EL TRATAMIENTO DE DATOS NO PONDERADO Y PONDERADO	78
3.6	CONCENTRACIÓN DEL DBSNa EN MUESTRAS REALES	87
	RECOMENDACIONES	95
	BIBLIOGRAFÍA	96
	ANEXO A	99
	CÁLCULOS CONSIDERANDO COMPORTAMIENTO HOMOCEDÁSTICOS	99
	ANEXO B	102
	CÁLCULOS CONSIDERANDO DATOS HETEROCEDÁSTICOS (RECTAS PONDERADAS)	102
	ANEXO C	105
	PORCIENTO DE RECOBRO	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura química de un jabón _____	16
Figura 2 Micelas _____	20
Figura 3 Representaciones esquemáticas del arreglo de las moléculas del surfactante alrededor de la concentración micelar crítica _____	21
Figura 4 Ejemplos de surfactantes de acuerdo a su grupo hidrofílico _____	26
Figura 5 Ley de Beer _____	30
Figura 6 Tipo de varianzas de los residuales _____	33
Figura 7 Ejemplo de valores de r _____	35
Figura 8 Ponderación de errores en el cálculo de regresión. _____	39
Figura 9 Errores α y β _____	40
Figura 10 Método de sustancias activas al azul de metileno paso A _____	44
Figura 11 Método de sustancias activas al azul de metileno paso B. _____	45
Figura 12 Tendencia de probabilidad normal ideal _____	66

LISTA DE CUADROS

Cuadro I Producción mundial de detergentes. _____	18
Cuadro II Valores de la concentración micelar crítica _____	22
Cuadro III Aplicaciones generales de los surfactantes con base en su HLB _____	22
Cuadro IV Puntos de nube de diferentes surfactantes no-iónicos _____	23
Cuadro V Características de las rectas con datos _____	34
Cuadro VI Condiciones de validez del modelo de regresión _____	37
Cuadro VII Volúmenes de curva patrón _____	43
Cuadro VIII Muestras de ensayo _____	48
Cuadro IX Resultados promedio de las absorbancias _____	51
Cuadro X Resultados de los coeficientes de regresión _____	53
Cuadro XI Predicciones y su desviación estándar. _____	56
Cuadro XII Intervalos de confianza de la recta no ponderada _____	57
Cuadro XIII Desviaciones estándar relativas de predicciones _____	60
Cuadro XIV Contraste de bondad del ajuste de Kolmogorov _____	69
Cuadro XV Predicción en recta ponderada y su desviación estándar (s_{x_0}) _____	74
Cuadro XVI Intervalos de confianza de la recta ponderada _____	75
Cuadro XVII Desviación estándar relativa en predicciones ponderadas _____	76
Cuadro XVIII Comparación de parámetros de regresión _____	79
Cuadro XIX Comparación de la desviación estándar de la predicción _____	80
Cuadro XX Pruebas estadísticas para evaluar si existen diferencias significativas en los parámetros de regresión entre los tratamientos homocedástico y heterocedástico _____	83
Cuadro XXI Pruebas estadísticas para evaluar si existen diferencias significativas en las desviaciones estándar de las predicciones (s_{x_0}) entre los tratamiento de datos homocedástico y heterocedástico _____	84
Cuadro XXII Límites de detección y cuantificación _____	86
Cuadro XXIII Muestras de agua analizadas _____	87
Cuadro XXIV Resultados de la cantidad de DBSNa en las muestras de agua con su desviación estándar e intervalos de confianza con $\alpha=0.05$. _____	88
Cuadro XXV Comparación de las concentraciones de las muestras de ensayo entre los tratamientos ponderado y no ponderado _____	89
Cuadro XXVI comparación de la desviación estándar de las muestras de ensayo obtenidas con los tratamientos ponderado y no ponderado _____	90

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Curvas experimentales del DBSNa. _____	50
Gráfica 2 Curva promedio de DBSNa _____	52
Gráfica 3 Recta de regresión homocedástica _____	53
Gráfica 4 Límites de confianza de la recta no ponderada _____	58
Gráfica 5 Residuales en función de los μg de DBS de Na _____	63
Gráfica 6 Residuales en función de los valores ajustados de "y" _____	64
Gráfica 7 Probabilidad normal _____	67
Gráfica 8 Método Kolmogorov _____	70
Gráfica 9 Límites de confianza ponderados del DBSNa _____	75
Gráfica 10 Comparación de intervalos de confianza _____	92

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo y contaminación del agua en el presente siglo se ha convertido en un tema de preocupación a nivel mundial, esto como consecuencia del aumento de la población y de la actividad industrial principalmente. La baja calidad del agua repercute directamente en la cantidad efectiva de la misma con que se dispone, puesto que el agua contaminada no puede utilizarse. Se considera como contaminación del agua a la cantidad de toda sustancia química o de otra naturaleza en concentración superior a la encontrada de forma natural. Por lo tanto, para garantizar la sostenibilidad ambiental ha sido necesario tomar acciones que están dirigidas a controlar, mejorar y conservar la calidad del agua (Organización Mundial de la Salud, 2013; SEMARNAT, 2012)

La evaluación de la calidad del agua dependerá del uso al que será destinada, existen normas oficiales mexicanas que establecen las especificaciones que se deben cumplir y las metodologías analíticas que se deben utilizar para determinar los parámetros que se deben controlar y la concentración de cada contaminante (Secretaría de Economía). Muchas de estas metodologías se basan en la determinación de la concentración del contaminante de interés a través de la construcción de curvas de calibración y el ajuste por mínimos cuadrados. Un ejemplo son las metodologías analíticas desarrolladas en el numeral 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA-2002, que establece las especificaciones sanitarias que deben cumplir, el agua y el hielo para consumo humano, ya sea envasado o a granel, donde 9 de las 11 metodologías descritas, aplican dicho principio. Los contaminantes determinados en dichas metodologías son: boro, fluoruros, cianuros, nitratos, nitritos, cloro residual, formaldehído, trihalometanos, y sustancias activas al azul de metileno (SAAM) (Secretaría de Salud, 2002; Secretaría de Economía; Harris, 2001).

Los detergentes se consideran como uno de los contaminantes más comúnmente encontrados en el agua. La importancia de su cuantificación radica en las grandes cantidades arrojadas a los sistemas de alcantarillado tanto por su uso doméstico (en el que no existe ningún control) como industrial. Su concentración se evalúa a través de la determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM) de acuerdo al numeral 9.12 de la NOM-201-SSA-2002 a través del trazo de una curva de calibración (Secretaría de Salud, 2002).

En una curva de calibración, la respuesta analítica se grafica en función de la concentración de la referencia para conocer la mejor ecuación que explique la

dispersión de los datos, el cálculo de los mínimos cuadrados ha sido un método ampliamente empleado (Harris, 2001; Miller & Miller, 2002). Sin embargo, a menudo obviamos y no demostramos que los niveles de calibración experimental muestran un comportamiento lineal homocedástico, como lo supone el método de los mínimos cuadrados, siendo que muestran un comportamiento heterocedástico, sin evaluar el impacto que puede generar en la calidad de nuestros resultados (Miller & Miller, 2002; Ramis Ramos & García-Álvarez-Coque, 2001).

Ésta es una inquietud necesaria si pensamos que la finalidad de cualquier proceso analítico es la generación de información confiable, es decir, con calidad. Es por ello que los Químicos analíticos debemos asegurarnos que los resultados de cualquier ensayo respondan a ésta necesidad para que se puedan tomar las mejores decisiones, con un buen nivel de confianza.

De lo anterior se desprende las siguientes hipótesis de trabajo

HIPÓTESIS

- a)** Los datos de la curva de calibración tienen un comportamiento heterocedástico.
- b)** Tratar los datos de la curva de calibración considerando un comportamiento homocedástico no es significativamente diferente a tratarlos considerando un comportamiento heterocedástico.
- c)** No existe un impacto en la calidad de los resultados al considerar los datos como homocedásticos.

OBJETIVO

Evaluar el impacto en la calidad de los resultados al considerar que la curva de calibración del método de sustancias activas al azul de metileno tiene un comportamiento homocedástico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Evaluar estadísticamente la homocedasticidad de la curva de calibración del método de sustancias activas al azul de metileno.
- b)** Evaluar estadísticamente la heterocedasticidad de la curva de calibración del método de sustancias activas al azul de metileno.
- c)** Evaluar el impacto en la calidad de los resultados al aplicar los modelos a muestras.

1 INTRODUCCIÓN

La actividad de limpieza es común en todos los seres vivos, históricamente el hombre ha buscado mejorar la actividad limpiadora del agua, la forma en que consiguió hacerlo fue mediante el uso de aditivos que le llevaron a desarrollar los primeros jabones, entendidos como sales alcalinas de un ácido graso, desde los años 3000 a.c. (Figura 1) (Nimer-Leite, 2007).

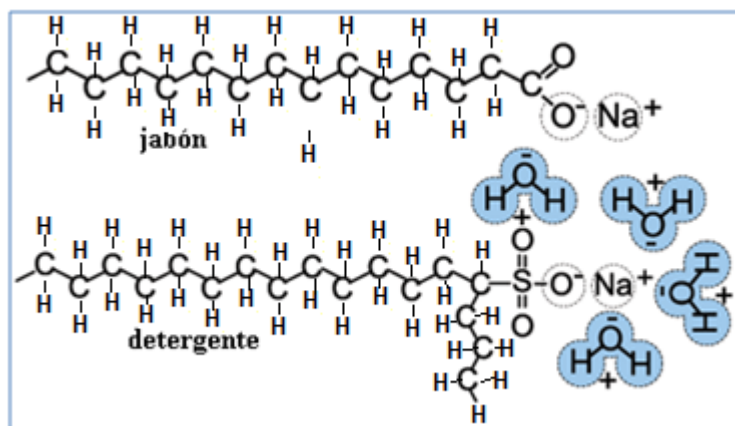


Figura 1 Estructura química de un jabón (Fuente <http://jabonjabonlula.com/tag/toxicos/>)

Fue gracias al desarrollo de un método de síntesis de sosa en 1791 por Nicolás Leblanc, un médico cirujano francés, y a la aclaración de la composición química de las grasas naturales (entre 1813 y 1823 por el Químico Francés Michael Eugéne Cheureul), que se dio origen a la producción masiva del jabón. Los siglos XVIII y XIX fueron claves en la industria del jabón. En 1878 surgió la primera formulación comercial, en Alemania, al adicionarse silicato de sodio a un jabón para reducir la dureza del agua. En Alemania, ante la escasez de grasas naturales, se dieron a la tarea de desarrollar jabones sintéticos y descubrieron que las cadenas alquílicas cortas no proporcionaban suficiente carácter surfactante. Alrededor de 1932, Estados Unidos empezó a comercializar su primer detergente sintético de uso doméstico (Ramírez Corrales, 2006; Nimer-Leite, 2007). A partir de entonces se desató una carrera en el desarrollo y consumo de detergentes sintéticos que fueron desplazando al jabón tradicional. Se comenzaron a emplear derivados del petróleo como materia prima para la obtención de surfactantes. En los años 50's se encontró que las sales de alquilbencensulfonato ramificado tenían excelentes propiedades detergentes, y para los años 60's, este tipo de materiales cubría ya el 60 % de la demanda del mercado mundial para la formulación de detergentes.

Fue precisamente ese gran éxito lo que trajo sus desventajas ambientales al no ser biodegradable. Como respuesta a esta crisis ambiental, se desarrolló la sal del alquilbencensulfonato lineal, el cual conservaba las excelentes propiedades tensoactivas del ramificado pero puede ser biodegradado. (Lechuga Villena, 2005; Ramírez Corrales, 2006; Nimer-Leite, 2007).

Los detergentes y jabones son moléculas con un grupo hidrofílico y otro hidrofóbico (cadenas largas de carbonos). Ambos grupos exhiben sus propiedades de solubilidad individuales. La parte hidrofílica se disuelve en agua y la lipofílica en un disolvente no polar, si no hay alguno presente, se agrupan formando micelas.; ésta característica es lo que les confiere su poder limpiador (Morrison & Boyd, 1987). Aunque comparten características, jabones y detergentes tienen un comportamiento ambiental completamente diferente, los jabones son biodegradables (como consecuencia de su origen natural), pero presentan el inconveniente de ser poco activos en aguas duras, mientras que muchos detergentes sintéticos no son biodegradables, o lo son solo en cierto grado (Ramírez-Corrales, 2006). Adicionalmente los detergentes generalmente son formulaciones que tienen el objetivo de obtener mayor limpieza y optimizar el proceso de lavado. Sus componentes más comunes son los siguientes:

- a) Surfactante (generalmente forma el 40 % de la formulación).
- b) Adyuvantes para disminuir dureza del agua (Silicatos).
- c) Aditivos: colorantes, perfumes, agentes de blanqueo, agentes bactericidas, agentes oxidantes.
- d) Enzimas.
- e) Agentes deteritivos (sosa y tripolifosfatos) mejoran su detergencia pero retardan la biodegradabilidad.

Mientras que en 1970 se hablaba de una producción mundial de 18 millones de toneladas, incluyendo jabones y otros surfactantes, en 1980 aumentó a 25 millones, lo que significó un incremento del 40 % de la producción en tan solo 10 años (Salager, 2002). En el Cuadro I se resume los datos de la producción mundial que ha publicado el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2012).

Cuadro I Producción mundial de detergentes.

Volumen de la producción mundial de detergentes y polvos limpiadores por países seleccionados
Serie anual de 2002 a 2007
(Miles de toneladas)

Pais	2002	2003	2004	2005	2006	2007 ^P
Total	20 232	22 922	16 170	15 566	14 214	13 849
China, República Popular	3483.2	3867.9	4 652	5 170	5 277	5 830
Alemania	2934.4	2969.6	ND	3	ND	3
España	2307.5	2398.7	2 289	2 225	2 228	2 180
México	1132.1	1126.8	1 235	1 324	1 357	1 362
Reino Unido	2079	2188	ND	ND	ND	ND
Turquía	603.5	747.8	786	1 013	ND	ND
India	661.1	748.8	ND	ND	ND	ND
Bélgica ^a	670.5	631.4	ND	ND	ND	ND
Polonia	502	553.5	658	671	688	655
Federación Rusa	522	551	639	714	839	807
Corea, República de	450.3	451.8	466	559	576	581
República Checa	406	441	499	550	569	175
Países Bajos	370.7	441.3	405	422	ND	ND
Portugal	258	270	270	269	278	ND
Francia	246	262.7	ND	ND	ND	ND
Dinamarca ^b	253	256	247	233	244	237
Hungría	236	230	208	265	237	152
Grecia	ND	214.5	ND	ND	ND	ND
Sudáfrica ^c	193.7	209.5	ND	ND	ND	ND
Argentina	263.5	308.4	390	455	508	605
Irán, República Islámica del ^d	305.6	ND	ND	ND	ND	ND
Otros países	2353.4	4053.6	3 426	1 695	1 414	1 262

Nota: Agentes orgánicos superficialmente activos, preparaciones superficialmente activas y preparaciones para lavar, que contengan o no jabón.

^a Cobertura incompleta.

^b Ventas.

^c Únicamente detergentes sintéticos en polvo.

^d Incluye producción de establecimientos con 10 o más personas.

Fuente: ONU. United Nations Statistics Division, <http://unstats.un.org/unsd/industry> (febrero de 2011).

En Cuadro I se observa que en México de 2002 a 2007 solo ha tenido un aumento en la producción del 20.3 %.

Por otra parte los alquilbencensulfonatos siguen siendo la materia prima más económica, aunque actualmente se esta favoreciendo el desarrollo de nuevos productos, como los surfactantes catiónicos, pero debido a su alto costo, tienen un uso muy limitado. A su vez se estima que el 22 % de la producción mundial de jabones y detergentes lo ocupan aquellos del tipo sulfonato y de éste porcentaje el 50 % es para uso doméstico. Los surfactantes aniónicos representaron el 55 % de la producción total (Salager, 2002).

Los sulfonatos de alquilbenceno lineales (SAL), se destinan para:

- a) -Detergentes para lavado de ropa 70 %
- b) -Detergentes para lavado manual de vajillas 15 %

- c) -Detergentes industriales 12 %
- d) -Productos de limpieza doméstica 3 %

Todas las actividades que involucran el uso de detergentes están relacionadas con algún proceso de limpieza por lo que, al finalizar dicho proceso, se desecharán, en su mayoría, directamente al drenaje y, por tanto, se convertirán en contaminantes ambientales de los sistemas acuáticos (Nimer-Leite, 2007).

1.1 SURFACTANTES

De acuerdo con la Real Academia de la Lengua Española un surfactante es una sustancia que reduce la tensión superficial de un líquido, y que sirve como agente humectante o detergente (Real Academia Española). La palabra proviene de la contracción del término “agente de actividad superficial” (del inglés Surface Active Agent o Surfactant). Es una sustancia orgánica con ciertas características por su estructura que son capaces de modificar las propiedades físicas de una superficie o interfase, reduciendo su tensión superficial. Y aunque el término tensoactivo es muy común para referirnos a aquellos agentes químicos capaces de modificar la tensión superficial del agua provocando que aumente su poder limpiador, esta palabra solo hace referencia a una de las propiedades de los surfactantes (Salanger, 2002; Nimer-Leite, 2007).

Los surfactantes típicos son moléculas grandes anfifílicas, es decir, cuentan con una parte hidrófila y una parte hidrófoba que al contacto con el agua forman micelas. Las micelas son conglomerados de estructura definida formados por la agrupación de “las colas” lipofílicas entre sí y las “cabezas” hidrofílicas entre sí. Este acomodo de partículas ayuda a disolver las grasas y otras moléculas no solubles en agua, pues quedan atrapadas en su interior (Lechuga Villena, 2005; Nimer-Leite, 2007).

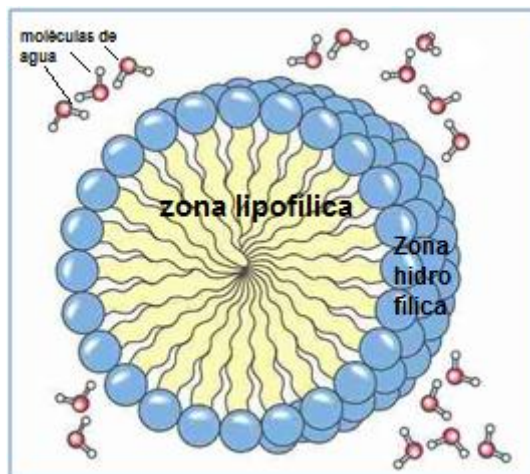


Figura 2 Micelas (fuente <http://jabonjabonlula.com/tag/toxicos/>)

1.1.1 PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN DE SURFACTANTES

La actividad de los surfactantes se relaciona con cambios de la tensión superficial de los líquidos. Los gradientes de tensión superficial, debido a la presencia de moléculas de un surfactante en las interfases aire-agua o aceite-agua, se determinan mediante tensómetros (Jiménez-Islas et al. 2010). La concentración de surfactantes en la que se alcanza la mínima tensión superficial es denominada concentración micelar crítica (CMC); es también la concentración de surfactantes por debajo de la cual las micelas se forman espontáneamente. La CMC es un parámetro característico para cada surfactante. Para valores inferiores a esta concentración, todo el surfactante presente en disolución se encuentra en forma de monómeros ubicados en la interfase agua-aire, mientras que a valores más altos, algunas moléculas de surfactante se encuentran en forma micelar (Figura 3) (Zamudio-Pérez, 2010).

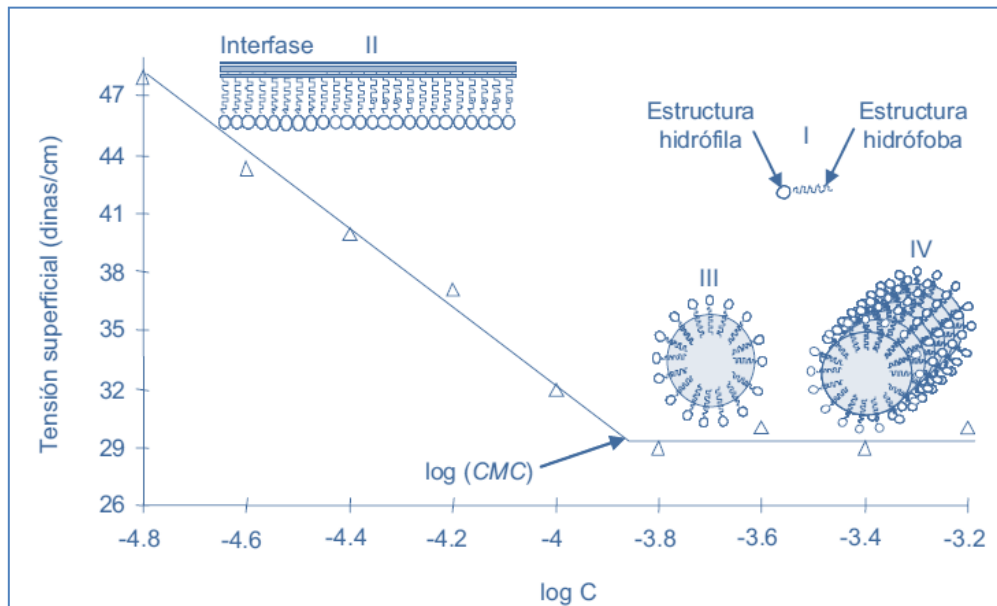


Figura 3 Representaciones esquemáticas del arreglo de las moléculas del surfactante alrededor de la concentración micelar crítica (CMC). I) Molécula de surfactante II) Inferior a la CMC; III) Superior a la CMC y IV) A concentraciones mucho mayores a la CMC (Adaptada de Jiménez-Islas et al. 2010)

Propiedades de los surfactantes:

- a) El número de agregación (n_a). Indica el promedio de moléculas de surfactante que se encuentran formando las micelas. Los agregados micelares están conformados generalmente de 20-100 monómeros, con un radio aproximado de 1.5-30 Å. El modelo físico más aceptado para la micela es el desarrollado por Hartley en 1936 y consiste en una configuración esférica con tres fases. En el Cuadro II se muestran algunos valores de CMC (Jiménez-Islas et al. 2010).

Cuadro II Valores de la concentración micelar crítica (CMC) para diversos tipos de surfactantes (Jiménez-Islas et al. 2010)

Grupo surfactante	CMC (mM)
Alquil sulfato de sodio	
i) C12SO4 Na (dodecil sulfato de sodio)	3.92
ii) C10SO4 Na (decil sulfato de sodio)	30.3
iii) C14SO4 Na (tetradecil sulfato de sodio)	0.87
Alquil etoxilato éteres de	
i) C12E4 (Brij-30)	0.02-0.04
ii) C12-15E4 (Neodol 25-9)	0.09
iii) C12E23 (Brij-35)	0.06-0.08
Alquilfenol etoxilato éteres de	
i) C8PE9.5 (Triton X-100)	0.24
ii) C8PE12 (Igepal CA-720)	0.6
iii) C9PE10.5 (Tergitol NP-10)	0.054-0.08
Donde: Em=-(OC2H4)mOH: grupo etoxilato Cn=CnH2n+1-: n-alkil P= -C6H4-: fenil	

- b) El balance hidrofílico-lipofílico (HLB) es un valor que representa la capacidad de un surfactante para formar emulsiones estables en sistemas agua-aceite o aceite-agua. Surfactantes con HLB cercanos a 1 forman emulsiones estables en sistemas agua-aceite (ejemplo: ácido oléico), mientras que los surfactantes con HLB cercanos a 20 forman emulsiones estables en sistemas aceite-agua (ejemplo: oleato de sodio). En el Cuadro III se da una clasificación general en la aplicación de los surfactantes de acuerdo a los intervalos del HLB (Jiménez-Islas et al. 2010).

Cuadro III Aplicaciones generales de los surfactantes con base en su HLB (Jiménez-Islas et al. 2010).

HLB	Aplicación
4-6	Emulsificantes para sistemas agua-aceite
7-9	Agentes humectantes
8-18	Emulsificantes para sistemas aceite-agua
13-15	Detergentes
10-18	Solubilizadores

- c) La temperatura también es un factor clave que incide directamente en la solubilidad de los surfactantes en disoluciones acuosas, y cuyo efecto se ha observado principalmente en disoluciones micelares de surfactantes no iónicos, a este efecto se le ha denominado punto de nube (PN) y se define como la temperatura a la que el surfactante

(generalmente no iónico) pierde su solubilidad en una disolución acuosa, la cual a nivel macroscópico presenta una apariencia turbia, es decir, en forma de nube (Kim & Shah, 2002). Al incrementarse la temperatura, la solubilidad de los surfactantes decrece gradualmente y las moléculas no solubles rompen el equilibrio existente entre las del surfactante y las del agua, formando superagregados de surfactante, lo cual provoca un cambio de fase y genera la turbidez (Timar-Balazsy & Eastop, 1998; Kim et al. 2006). La determinación del PN se realiza utilizando una disolución acuosa de surfactante al 1 % en un intervalo de 0 a 100 °C, en ella se mide la intensidad de luz transmitida a través de dicha disolución. En el Cuadro IV, se muestran los PN de diferentes tipos de surfactantes no iónicos (Jiménez-Islas, et al., 2010).

Cuadro IV Puntos de nube de diferentes surfactantes no-iónicos (Jiménez-Islas, et al., 2010).

Surfactante no iónico (Fórmula condensada)	<i>n</i> Número de carbonos de la porción hidrofóbica lineal o ramificada	<i>m</i> Número de grupos etoxilatos de la porción hidrofílica	Punto de nube (°C)
<i>CnEm</i>	6	4	63.8
		5	75.0
		6	83.0
	10	6	60.3
		8	84.5
		10	95.0
	12	9	87.8
		10	95.5
		11	100.3
		16	8
<i>ICnEm</i>	6	9	75.0
		12	92.0
		6	78.0
<i>TCnEm</i>	10	6	27.0
	13	9	34.0
<i>TCnPEm</i>	16	12	48.0
	8	9	64.3
<i>XCnEm</i>	12	9	75.0
	16	11	80.0
	<i>NCnPEm</i>	9	8
9		10	75.0
12		9	33.0
12		15	90.0

Donde:

$E_m = -(OC_2H_4)_mOH$: grupo etoxilato
 $C_n = C_nH_{2n-1}$: *n*-alquil

$IC_n = \left(C_{\frac{n-2}{2}} H_{\frac{n-1}{2}} \right)_2$ CHCH₂ -: *iso*-alquil

$TC_n = \left(C_{\frac{n-1}{3}} H_{\frac{2n-1}{3}} \right)_3$ CH -: *ter*-alquil

$TC_nP = t-C_nH_{2n+1}C_6H_4$ -: *ter*-alquil-fenil

$XC_n = c-(C_nH_{2n})$ -: *ciclo*-alquil

$NC_nP = n-C_nH_{2n-1}C_6H_4$ -: *n*-alquil-fenil

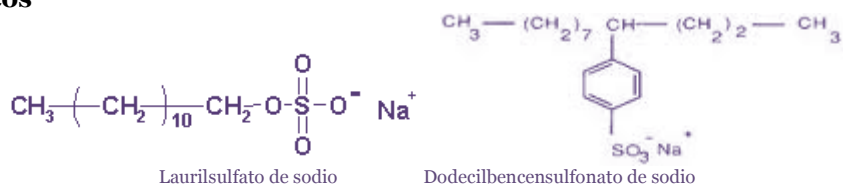
Existen varias formas de clasificarlos, pero la más común es en función de su disociación en agua, o lo que es lo mismo, de acuerdo a la naturaleza de su grupo hidrofílico (Salager, 2002; Nimer-Leite, 2007), Figura 4.

- a) **Surfactantes aniónicos.** En agua se disocian en un anión anfifílico y un catión, el cual es generalmente un metal alcalino. A este tipo pertenecen los detergentes sintéticos como los alquilbencensulfonatos, los jabones (sales de sodio de ácidos grasos), los agentes espumantes como el lauril sulfato, los humectantes del tipo sulfosuccinato, los dispersantes del tipo lignosulfonatos, etc. La producción de los surfactantes aniónicos representa alrededor del 55 % de los surfactantes producidos anualmente en el mundo (Salager, 2002).
- b) **Surfactantes catiónicos.** Se disocian en disolución acuosa en un catión orgánico anfifílico y un anión generalmente como un halogenuro. La gran mayoría de estos surfactantes son compuestos nitrogenados del tipo sal de amina grasa o de amonio cuaternario. La fabricación de estos surfactantes es mucho más cara que la de los anteriores, y es por esta razón que no se les usa de forma común, solo en casos específicos, como cuando se hace uso de sus propiedades bactericidas o de su facilidad de adsorción sobre sustratos biológicos o inertes que poseen una carga negativa. Esta última propiedad hace que sean excelentes agentes antiestáticos, hidrófobos, así como inhibidores de corrosión, y puedan ser utilizados tanto en productos industriales como para uso doméstico. Su producción representa alrededor del 5 % de la producción total de surfactantes (Salager, 2002).
- c) **Surfactantes no-iónicos.** Los surfactantes no-iónicos están en el segundo lugar del orden de importancia, un poco menos del 40 % de la producción total. En disolución acuosa no se ionizan, ya que poseen grupos hidrófilos de tipo alcohol, fenol, éter o amida. Una alta proporción de estos surfactantes pueden tornarse relativamente hidrofílicos por la

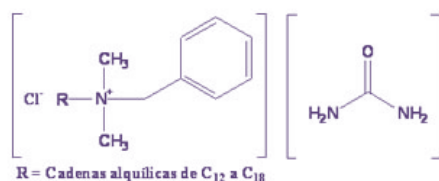
presencia de una cadena poliéter del tipo polióxido de etileno. El grupo hidrófobo es generalmente un radical alquilo o alquilbenceno y a veces una estructura de origen natural como un ácido graso, sobre todo cuando se requiere una baja toxicidad (Salager, 2002).

- d) **Surfactantes anfóteros.** Poseen grupos funcionales que pueden ionizarse con carga positiva o negativa, dependiendo de las condiciones del medio, por lo que pueden actuar como surfactantes aniónicos o catiónicos (como los aminoácidos de betaínas). Los anfóteros son en general tan caros como los catiónicos y por esta razón su uso se reduce a aplicaciones particulares por lo que su nivel de producción esta por debajo del 1 % de la producción total de surfactantes (Salager, 2002).
- e) **Surfactantes poliméricos.** Surgieron hace unos veinte años; se sintetizan por la polimerización de estructuras de tipo hidrofílico o lipofílico, en forma de bloques o de injertos. Ciertos de estos surfactantes son indispensables en procesos donde están involucrados macromoléculas naturales como en la deshidratación de petróleo. Representan alrededor del 2 % de la producción anual de surfactantes (Salager, 2002).

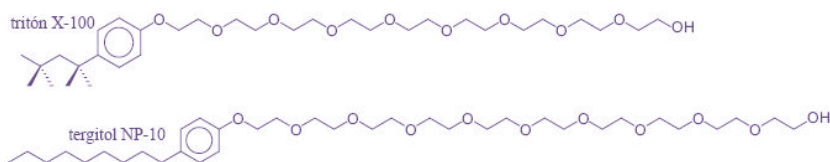
a. Aniónicos



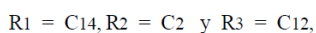
b. Catiónicos



c. No iónicos



d. Anfóteros



e. Poliméricos

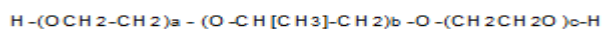


Figura 4 Ejemplos de surfactantes de acuerdo a su grupo hidrofílico

Dentro de los grupos de surfactantes, los aniónicos son los más utilizados. Algunas de las familias más representativas de surfactantes aniónicos son: los jabones (Sales de sodio o potasio de ácidos grasos lineales), los alquilbencensulfonatos lineales (LAS), los parafinsulfonatos, los α -olefin sulfonatos, los dialquilsulfosuccinatos, los alquilsulfatos, los alquilpolietersulfatos y los alquilsulfatos. De éstos, los alquilbencensulfonatos son los más utilizados en el mundo, debido a su fácil preparación y sus características deterativas, específicamente el dodecilbencensulfonato de sodio (DBS). Pero lo que ha hecho que los sulfonatos de alquilbenceno lineales sustituyan el uso de los ramificados, es poseer una excelente biodegradación, tanto de la molécula como tal, como la de sus metabolitos. Son precisamente esas insuperables ventajas las que los ha convertido en los agentes surfactantes de primera elección provocando una escalada en su consumo a nivel mundial (Nimer-Leite, 2007).

1.1.2 SURFACTANTES Y AMBIENTE

La principal aplicación de los surfactantes, basada en las cantidades que se consumen, es la formulación de una gran variedad de detergentes desarrollados para diferentes usos y aplicaciones tanto industriales como domésticas. Una vez utilizados, los detergentes se desechan directamente en los drenajes públicos convirtiéndose en un problema de contaminación de agua, suelo y alimentos principalmente, lo que ha provocado reacciones a nivel mundial en busca de una solución (Cantarero-Malagón, 2010).

Aunque se han logrado muchos avances con el desarrollo de surfactantes biodegradables para sustituir a los que no lo son, todavía no se logra resolver los problemas que se derivan de las grandes cantidades que se vierten en los cuerpos de agua (Lewis, 1992; Rosen et al. 1999).

Algunas consecuencias del impacto ambiental provocadas por los detergentes son (SEMARNAT, 2012; Uc-Peraza, 2012; Cantarero-Malagón, 2010):

- a) Eutrofización ocasionada principalmente por los altos niveles de fósforo procedente del tripolifosfato.
- b) Aumento de los niveles de cloro y compuestos organoclorados que después requerirá de una gran cantidad de oxígeno para degradarse.
- c) Formación de espuma en aguas superficiales, lo que provoca interferencia en el mezclado de aire atmosférico con el agua y por ende disminución del oxígeno disuelto.
- d) Disminución de los procesos de floculación y tensión superficial.
- e) Impiden que los surfactantes LAS se biodegraden pues se necesitan ambientes aerobios lograrlo.
- f) Toxicidad en especies marinas.
- g) Efectos de enzimas activas.
- h) Aumento del pH de las aguas residuales (valores superiores a 12).
- i) Efectos tóxicos para microorganismos, plantas.
- j) Contaminación de aguas subterráneas.
- k) Tendencia a adsorberse y precipitarse, acumulándose en grandes cantidades (g/kg) en los lodos tratados para su posible uso como suelos agrícolas.

En general los surfactantes aniónicos producen abundante espuma y aunque los catiónicos y los no iónicos casi no la producen muchas veces se provoca su formación agregando aditivos espumantes a la formulación (SEMARNAT, 2012; Uc-Peraza, 2012).

La legislación sobre el uso de surfactantes surge como consecuencia de su consumo y de sus efectos ambientales como la aparición de espumas persistentes y de metabolitos de elevada toxicidad (Cantarero-Malagón, 2010). Existen organismos que han tomado alguna iniciativa en lo referente a la relación de los detergentes con el ambiente (Ramírez Corrales, 2006):

- a) AISE (International Association for Soaps, Detergents and Maintenance Products) Agrupa a unos 1200 fabricantes de detergentes convencionales que cubren el 90% del mercado español.
- b) En 1997 se diseñó el programa Wash Right (lavar bien) para reducir el impacto ambiental de los detergentes. Las empresas que demuestren comprometerse con este programa pueden usar el logotipo Wash Right

en los paquetes del detergente. Los objetivos son: reducir el consumo de detergentes que contienen tripolifosfato, impulsar el uso de detergentes biodegradables, reducir en un 10% el peso de los envases y el uso de ingredientes poco biodegradables para finales del 2012, reducir en un 5 % el consumo de energía en cada lavado con respecto a 1996, etc. Como algunos de los objetivos no dependen de los fabricantes, el programa incluye una serie de acciones para educar a los ciudadanos.

- c) En 1998 la Comisión Europea adoptó el programa Wash Right como recomendación para todos los fabricantes. En 1999 redactó el pliego de condiciones que deben cumplir los detergentes para poder otorgarles el Ecolabel, la etiqueta ecológica europea.

En México, la Secretaría de Salud es la encargada de emitir las normas que regulan y controlan la calidad del agua potable. En la NOM-127-SSA1-1994 “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización” y la NOM-201-SSA1-2002 “Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias” existe un límite máximo de sustancias activas al azul de metileno (SAAM), parámetro relacionado con la cantidad de surfactantes aniónicos (provenientes del uso de detergentes principalmente) que puede contener el agua para considerarla potable. El límite máximo permitido es de 0.5 mgL^{-1} de sustancias activas al azul de metileno (Secretaría de Salud, 1994).

1.1.3 DETERMINACIÓN DE SURFACTANTES

Los componentes básicos de los detergentes consisten en compuestos orgánicos con propiedades tensoactivas en disolución acuosa. Los compuestos surfactantes de más amplio uso en la fabricación de detergentes son alquilbencensulfonatos de sodio (ABS), los sulfonatos de alquil tolueno (ATS) y sus mezclas, cuyas estructuras químicas ramificadas son muy estables y no se degradan, o lo hacen lentamente. Sin embargo como ya se ha mencionado en los apartados anteriores, los efectos causados por un alto contenido de detergentes en agua son muchos, por lo que es muy importante su cuantificación.

Los procedimientos estándar más usados actualmente se basan en valoraciones y otros análisis volumétricos. Estas técnicas son confiables, requieren pocos

insumos y son de bajo costo, así mismo son fáciles de usar para el desarrollo de productos o para aplicaciones en el control de calidad. Sin embargo resultan inadecuadas para el seguimiento de las mediciones de surfactante o para diferenciar los homólogos del surfactante u oligómeros, por lo que es común el uso de técnicas más específicas, como las cromatográficas (de gases, de líquidos, de capa fina) que son cada vez más comunes en la industria de surfactante. Técnicas como la resonancia magnética nuclear y las espectrometrías de resonancia electromagnética y de masas están ganando rápidamente terreno como herramientas imprescindibles para la caracterización de la rutina de mezclas de surfactantes. También hay técnicas electroquímicas como la tensiometría y potenciometría con electrodos selectivos para efectuar el análisis (Llenado & Neubecker, 1983).

1.1.4 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA EL ANÁLISIS DE SUSTANCIAS ACTIVAS AL AZUL DE METILENO

El método analítico, indicado en las Normas Mexicanas, para el control de la cantidad máxima permitida de surfactantes en agua, es la determinación de sustancias activas al azul de metileno (SAAM), NOM-201-SSA1-2002 y NOM-127-SSA1-1994 este método se basa en la formación de un par iónico utilizando un colorante catiónico (azul de metileno) y moléculas orgánicas aniónicas, presentes en la muestra, para su posterior extracción con cloroformo. El par iónico formado además de insoluble en agua (debido a las largas cadenas hidrófobas aniónicas) es de color azul lo que hace posible su análisis por espectrofotometría molecular de ultravioleta (UV). Para eliminar la interferencia de compuestos aniónicos menos hidrófobos se realizan lavados con una disolución acuosa ácida.

Por ello se infiere que no es un método específico y que por lo tanto todos los materiales determinados se “engloban” en el término de sustancias activas al azul de metileno. Por esta razón no es posible diferenciar entre los posibles isómeros del DBS. Como se dijo anteriormente el DBS es el surfactante aniónico más importante por lo cual se utiliza para estandarizar el método de SAAM. El DBS puede contener hasta 26 isómeros en los que la cadena alifática tiene entre 10 y 14 átomos de carbono principalmente.

1.2 PRINCIPIO DE LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

Todos los átomos y moléculas absorben energía en diferentes cantidades dependiendo de su estructura y su concentración. En la espectrofotometría molecular la energía es proporcionada en forma de radiación ultravioleta y visible. Este principio es aprovechado para realizar muchas aplicaciones analíticas basadas a la Ley de Beer.

Cuando una molécula absorbe luz, la potencia radiante P del haz de luz disminuye. En un espectrofotómetro la luz se hace pasar por un sistema de prismas, red de difracción o incluso un filtro, para obtener luz con una sola longitud de onda o monocromática. La luz monocromática con una potencia radiante P_0 incide sobre una muestra de longitud b . La potencia radiante que resulta de este paso es P . Si las moléculas de la muestra absorben luz, P será menor que P_0 , si no absorben, P será igual a P_0 (Figura 5).

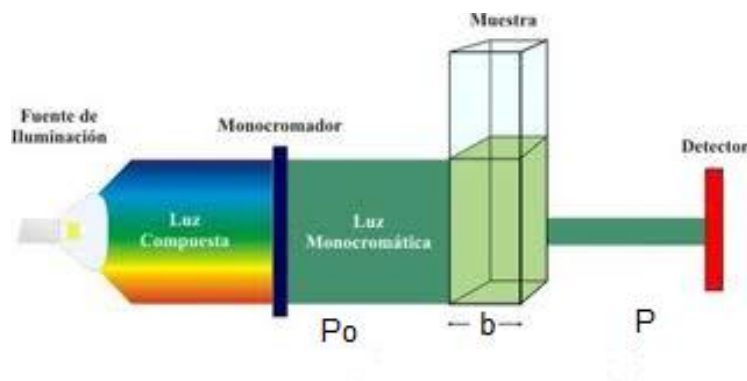


Figura 5 Atenuación de un haz de radiación monocromático por su paso a través de una solución absorbente

La transmitancia T es el cociente de P entre P_0 , por lo que su valor se encontrará entre 0 y 1, o si se expresa en porcentaje $\%T$ de 0 a 100%.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \%T = \frac{P}{P_0} * 100$$

La absorbancia es el logaritmo base 10 negativo de la transmitancia, o dicho de otra forma, es el logaritmo base 10 del inverso de la transmitancia.

$$A = -\log_{10}T = -\log_{10}\left(\frac{P}{P_0}\right) = \log_{10}\left(\frac{P_0}{P}\right)$$

Cuando no se absorbe luz, $P = P_0$, $A = 0$. Si se absorbe un 90 % $A = 1$. Si se absorbe un 1% $A=2$.

La ley de Beer dice que la absorbancia A es directamente proporcional a la concentración C de la especie que absorbe la luz.

$$\text{Ley de Beer (Lambert-Beer)} \quad A = \epsilon bc$$

Donde: A = absorbancia

b = longitud de la celda

ϵ = absortividad molar o coeficiente de extinción ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

La Ley de Beer es válida si la luz es monocromática y para disoluciones diluidas ($\leq 0.01\text{M}$) (Harris, 2001).

1.3 REGRESIÓN LINEAL SIMPLE

Una forma de modelar la relación entre variables es mediante los estudios de regresión en los que se busca encontrar la ecuación que mejor explique el comportamiento de los datos. La regresión lineal simple es un caso particular dentro del tema de regresión, en donde es posible modelar la relación entre la variable dependiente (y) y la variable independiente (x) con la ecuación de una línea recta. Sin embargo, cuando se estudia la dependencia entre dos variables (x y y) puede darse algunas de las siguientes relaciones (Mongay-Fernández, 2005):

- a. Funcional: ambas variables están relacionadas por alguna función matemática, solo podemos controlar una de las variables.
- b. Regresión: Se tiene control en ambas variables. Una de las variables es independiente y la otra es la variable respuesta (o dependiente).
- c. Correlación canónica: existe una interdependencia entre las dos variables. Se sabe que existe una relación pero no se puede definir cuál es.

1.4 CALIBRACIÓN INDIRECTA O ANALÍTICA

Para que las medidas instrumentales puedan traducirse en resultados para un análisis químico es indispensable disponer de patrones que permitan establecer una relación entre la señal obtenida y la respuesta del analito. En una curva de calibración se representa la respuesta de un método analítico a concentraciones

conocidas del analito de interés mediante el uso de sustancia de referencia o estándares y basándose en ellas es posible interpretar la respuesta de una muestra desconocida. Generalmente y , variable dependiente que simboliza la señal instrumental o factor analítico que se mide, se grafica en las ordenadas frente a x , variable independiente que simboliza la concentración del analito de interés a determinar, que se registra en las abscisas (Gueiteras et al. 2003; Harris, 2001; Mongay-Fernández, 2005).

Las disoluciones que contienen concentraciones conocidas de analito se llaman disoluciones patrón o estándar y deben prepararse en concentraciones que abarquen todo el intervalo de concentración de interés ya que no es confiable realizar extrapolaciones de la curva.

Un procedimiento general para construir una curva de calibración es el siguiente (Harris, 2001):

- a. Preparación de disoluciones estándar del analito de interés dentro de un intervalo adecuado de concentraciones.
- b. Trazar un gráfico de la absorbancia frente a la concentración del analito
- c. Evaluar el modelo de regresión.
- d. Hallar la pendiente y ordenada al origen.
- e. Analizar una disolución desconocida.

1.5 ANÁLISIS DE REGRESIÓN

En química analítica las curvas de calibración más frecuentes son rectilíneas: los puntos aparecen en el entorno de una recta que se traza siguiendo el método de mínimos cuadrados, cuya determinación se establece mediante el análisis de regresión. La finalidad del estudio de regresión es determinar la función que define el modelo y estimar la función de distribución que sigue la variable de error. Una vez conocidos los parámetros se podrán predecir la respuesta y de un caso de variables conocidas y estimar su intervalo de predicción. Para ajustar un modelo de regresión lineal simple y una vez comprobado visualmente que la vinculación entre ambas variables es lineal (o a través de los coeficientes de correlación lineal de Pearson), el siguiente paso es estimar los parámetros “la estimación del modelo” y determinar si los pronósticos se ajustan a los datos experimentales

“ajuste del modelo”, ofreciendo así un criterio de validación (Mongay-Fernández, 2005).

1.6 HOMOCEDASTICIDAD Y HETEROCEDASTICIDAD: LA DISTRIBUCIÓN DE LOS RESIDUALES

En el comportamiento de las varianzas ($s_{y/x}^2$) de los residuales pueden presentarse cualquiera de las siguientes situaciones: las varianzas no dependen de la variable x y entonces se dice que son homocedásticas, en cuyo caso responden al modelo $y = mx + b + \varepsilon$, o bien, las varianzas aumentan con x y entonces se dice que son heterocedásticas y que en cuyo caso responden al modelo $y = mx + b + \varepsilon(x)$ por lo que deben incorporar factores de ponderación¹ al estudio de regresión. En la Figura 6 se representan ambas situaciones y en el Cuadro V se recogen las características de las rectas con datos homocedásticos y heterocedásticos.

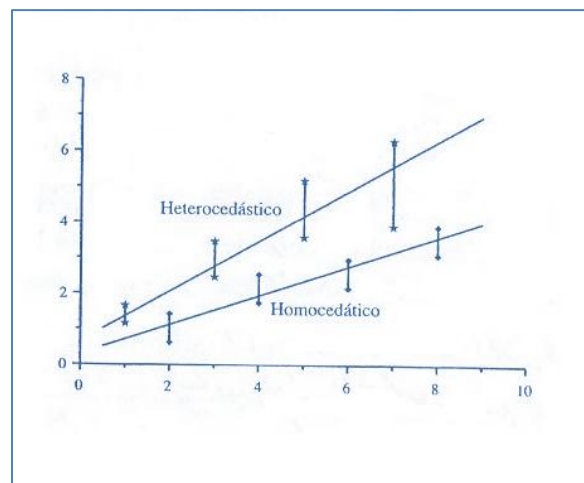


Figura 6 Tipo de varianzas de los residuales (Mongay- Fernández, 2005)

¹ Ponderar significa darle prioridad a los niveles de la recta con menor varianza para que la recta calculada pase por dichos niveles.

Cuadro V Características de los modelos lineales de regresión

Característica	Rectas homocedásticas	Rectas heterocedásticas
Definición	Rectas en las que las varianzas en la dirección de y son iguales en todos los niveles de concentración y no se requiere ponderación.	Rectas en la que los errores en la dirección y son proporcionales a la concentración (errores relativos constantes) o aumentan al incrementar la concentración, pero no en la misma proporción, requieren de ponderar sus puntos
Centro de gravedad	El centro de gravedad es \bar{x}, \bar{y}	El centro de gravedad es diferente de \bar{x}, \bar{y}
Modelo	$y = mx + b + \varepsilon$	$y = mx + b + \varepsilon(x)$

Verificar que la distribución de los residuales es normal exige múltiples medidas de y para cada valor de x , es por ello que frecuentemente se admite una distribución homocedástica de los mismos sin comprobarla, asumiendo que la media de los residuales es cero y que los errores son independientes, sin embargo los modelos de regresión cambian si los residuales son homocedásticos o heterocedásticos. Razón por la cual antes de ajustar la recta lo mejor sería determinar el tipo de modelo para averiguar si se trata de una recta ponderada o no ponderada (Mongay-Fernández, 2005).

1.7 RECTAS DE MÍNIMOS CUADRADOS

Los métodos analíticos que se basan en una curva de calibración donde existe una relación lineal entre la señal analítica " y " y la concentración de una sustancia de referencia " x " implican la necesidad de disponer de un método estadístico que proporcione la mejor línea recta que pase a través de todos los puntos experimentales (Harris, 2001; Miller & Miller, 2002).

El método de los mínimos cuadrados plantea que la línea buscada pase por el "centro de gravedad" (\bar{x}, \bar{y}) , este método busca minimizar las desviaciones en la dirección de " y " entre los puntos experimentales y los calculados por la línea, lo que se conoce como residuos. Para eliminar los valores negativos se calcula el cuadrado de dichos residuos

La ecuación general de una línea recta es la siguiente:

$$y = a + bx$$

Ecuación 1

Donde

a=ordenada al origen

b=pendiente

Para calcular la pendiente

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

Ecuación 2

Para calcular la ordenada al origen (a) se despeja de la Ecuación 1 :

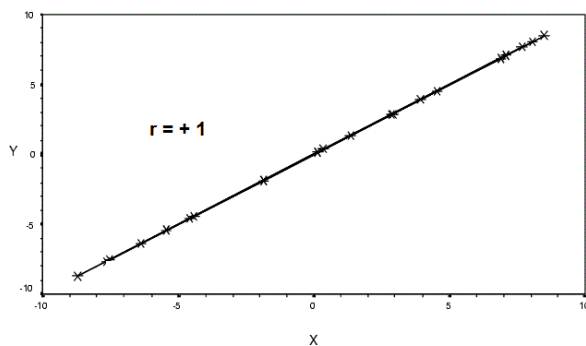
$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Ecuación 3

1.7.1 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN LINEAL r

El coeficiente de correlación lineal (r) es una forma de estimar que tanto se ajustan los puntos experimentales al modelo de una línea recta. r puede tomar valores en el intervalo $-1 \leq r \leq 1$, Figura 7.

a)



b)

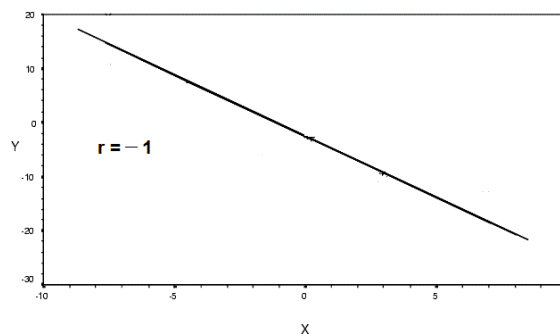


Figura 7 Ejemplo de valores de r: a) Correlación positiva y b) Correlación negativa

Es importante graficar los datos (\bar{x}_i, \bar{y}_i) para hacer una inspección visual en la que se verifique que presentan un comportamiento lineal, a la par de hacer el cálculo del coeficiente de correlación lineal r . Entre más se acerque el valor de r a 1 (ó -1) la relación tiende más a la linealidad.

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

Ecuación 4

Adicional a eso se puede corroborar que el coeficiente de correlación (r) es significativo mediante una prueba de hipótesis (Miller & Miller, 2002):

H_0 = correlación es cero

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Ecuación 5

1.7.2 CÁLCULO DE ERRORES

Como en toda medición, la ordenada al origen y la pendiente tienen errores aleatorios al derivarse del tratamiento de datos experimentales. Los errores se estiman como desviaciones estándar utilizando las siguientes fórmulas (Miller & Miller, 2002):

Se deben considerar los errores y_i

Errores aleatorios en la dirección de y ($s_{y/x}$)

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

Ecuación 6

Desviación estándar de la pendiente (s_b)

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 7

Desviación estándar de la ordenada al origen (s_a)

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 8

Si la pendiente y la ordenada al origen tienen errores aleatorios, evidentemente que la muestra también los tendrá, por lo cual, una vez que se obtenga la recta de regresión de y sobre x e interpolemos en ella la señal analítica de nuestra muestra y_0 , para saber su concentración x_0 , el resultado tendrá un error asociado s_{x_0} . El cálculo del error suele calcularse con la siguiente ecuación

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 9

Donde n es el número de niveles de la curva de calibración.

Si para la determinación de la concentración de la muestra de ensayo se hacen varias mediciones de y_0 , entonces s_{x_0} se calcula:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ecuación 10

Al aplicar el método de los mínimos cuadrados se deben de considerar los supuestos indicados en el Cuadro VI Condiciones de validez del modelo de regresión por mínimos cuadrados (Ramis Ramos & García-Álvarez-Coque, 2001; Miller & Miller, 2002; Mongay-Fernández, 2005).

Cuadro VI Condiciones de validez del modelo de regresión por mínimos cuadrados

Los errores aleatorios son despreciables en x y predominantes en y La relación x vs. y es lineal en el intervalo considerado Los residuos son homocedásticos, es decir, su varianza es independiente de x La distribución de los residuos es normal y su media es cero

1.7.3 HETEROCEDASTICIDAD: FACTORES DE PONDERACIÓN

Cuando las varianzas dependen del valor de x se dice que se tienen datos heterocedásticos. En estos casos una forma de tratar los datos es proporcionando una “ponderación” adicional a aquellos puntos donde las barras del error son más cortas, es decir, es más importante que la recta pase más cerca por los niveles de concentración con errores más pequeños que aquellos que representan concentraciones más altas y errores más grandes. Esto se logra dando a cada punto una ponderación inversamente proporcional a la varianza correspondiente, Figura 8 (Miller & Miller, 2002; Mongay-Fernández, 2005). De acuerdo con las ecuaciones siguientes (Miller & Miller, 2002):

Ponderación	$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\frac{\sum s_i^{-2}}{n}}$	Ecuación 11
-------------	--	--------------------

Centro de gravedad	$\bar{x}_w = \frac{\sum w_i x_i}{n} \quad y \quad \bar{y}_w = \sum \frac{w_i y_i}{n}$	Ecuación 12
--------------------	---	--------------------

Pendiente ponderada	$b_w = \frac{\sum w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2}$	Ecuación 13
---------------------	---	--------------------

Ordenada al origen ponderada	$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w$	Ecuación 14
------------------------------	-----------------------------------	--------------------

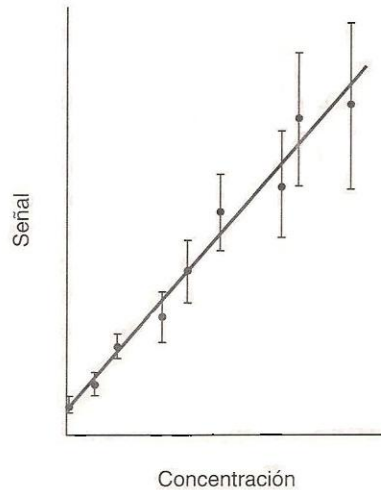


Figura 8 Ponderación de errores en el cálculo de regresión.

1.8 PRUEBAS DE HIPÓTESIS

En una prueba de hipótesis lo que se busca es comparar un dato muestral con un valor de referencia, o bien, comparar dos datos muestrales. La hipótesis nula (H_0) establece que no existe diferencia entre el valor observado y el de referencia ya que cualquier variación que existe será atribuible únicamente al azar. Para rechazar o aceptar la H_0 es necesario establecer previamente un nivel de significancia crítico, es decir, un nivel de probabilidad o riesgo de que aún siendo cierta H_0 se rechace. El rechazo de la H_0 conducirá, lógicamente, a la aceptación de una hipótesis alternativa H_1 .

Cuando se rechaza la H_0 siendo cierta se comete un error α o de tipo I. La probabilidad de incurrir en un error α es igual al nivel de significancia elegido, por ejemplo, si se elige un nivel de confianza del 95 % existe un 5 % de probabilidad de cometerlo. A este tipo de error también se le conoce como "falso positivo". Por el contrario, cuando se acepta H_0 siendo falsa se comete un error β o de tipo II (Figura 9 Errores α y β)

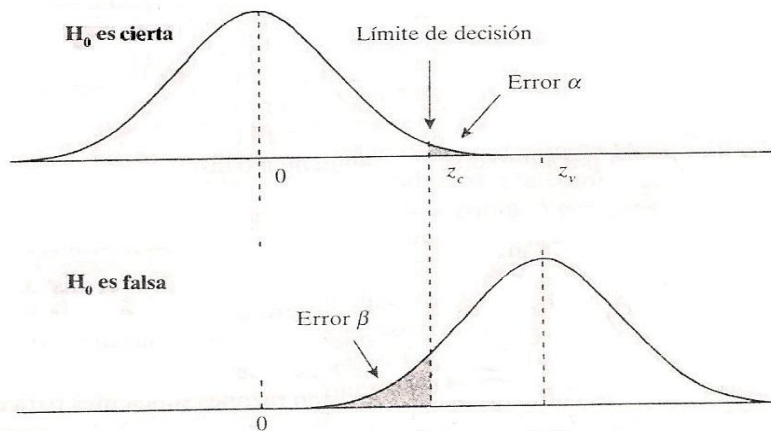


Figura 9 Errores α y β

1.9 CONTRASTES DE LA NORMALIDAD DE UNA DISTRIBUCIÓN

Las técnicas estadística basadas en el modelo de Gauss suponen que los datos se ajustan a la distribución normal (t de student, prueba F, límites de confianza, prueba de Bartlett, etc). Existen métodos gráficos (Curvas de frecuencia acumulada, diagramas de posiciones Q-Q y gráficas de probabilidad normal) y pruebas estadísticas que confirman si efectivamente los datos cumplen con este supuesto, tal como el método de Kolmogorov-Smirnov (Miller & Miller, 2002; Ramis Ramos & García-Álvares-Coque, 2001).

El método de kolmogorov-Smirnov se basa en contrastar la curva de frecuencia acumulada de los datos que se desea probar con una curva de frecuencia acumulada de la distribución normal teórica. El estadístico de contraste se obtiene calculando las diferencias verticales entre la curva experimental y la hipotética. Ninguna de estas diferencias debe ser mayor que el estadístico tabulado.

Para construir la curva de frecuencia acumulada experimental es necesario convertir los datos en una variable normal estándar, z , con la siguiente ecuación (Miller & Miller, 2002):

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Ecuación 15

1.10 ENSAYOS DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

Existen técnicas estadísticas que se basan en la suposición de que la varianzas de una serie de datos son homogéneas, es decir, homocedásticas, tal es el caso del método de los mínimos cuadrados. Así mismo, se han desarrollado métodos gráficos y matemáticos que comprueban si las varianzas se ajustan a ese comportamiento, como por ejemplo la prueba de Bartlett (Ramis Ramos & García-Álvares-Coque, 2001).

La prueba de Bartlett se basa en la prueba χ^2 y se utiliza para comparar más de dos varianzas, siempre y cuando los datos tengan una distribución normal. Primero debe obtenerse una varianza promedio con la siguiente fórmula (Ramis Ramos & García-Álvares-Coque, 2001; Mongay-Fernández, 2005):

$$s_{dentro}^2 = \frac{\sum_k (n_k - 1) s_k^2}{N - K}$$

Ecuación 16

A continuación se calculan los siguiente estadísticos:

$$x_{exp}^2 = \frac{2.303}{C} \left[(N - K) \log s_{dentro}^2 - \sum_k (n_k - 1) \log s_k^2 \right]$$

Ecuación 17

$$C = 1 + \frac{\left[\sum_k \frac{1}{n_k - 1} \right] - \frac{1}{N - K}}{3 * (K - 1)}$$

Ecuación 18

Donde:

N=número total de datos

K=número de series

n=número de datos de cada serie

s_{dentro}^2 = varianza combinada

C= función de grados de libertad

Se acepta que las varianzas son iguales si $x_{exp}^2 < x_c^2$, donde x_c^2 es un valor crítico obtenido de tablas.

2 METODOLOGÍA

2.1 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ESTÁNDAR

(Secretaria de Salud, 2002) Disolución estándar de dodecibencensulfonato de sodio (DBSNa): Se empleó el DBSNa (Aldrich) como estándar de referencia para evaluar el método analítico, para ello se pesó el equivalente a 0.1 g, se aforó con agua a 100 mL, se mezcló suavemente para evitar la formación de espuma (concentración de 1 mgL^{-1} DBSNa). Se transfirieron 1.0 mL de ésta solución a un matraz aforado de 100 mL y se llevó al aforo con agua ($10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ DBSNa).

2.2 PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se colocaron los siguientes volúmenes de disolución patrón de DBSNa en embudos de separación, aforando en 100 mL, de agua como indica el Cuadro VII.

Cuadro VII Preparación de curva patrón del DBSNa

Embudo	Volúmenes mL	masa, μg
1	0	0
2	1	10
3	3	30
4	5	50
5	7	70
6	9	90
7	11	110
8	13	130
9	15	150
10	17	170
11	20	200

2.3 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible PerkinElmer Lambda 25 y una balanza analítica Mettler AE100, con sensibilidad de 0,1 mg.

2.4 PROCEDIMIENTO

Para evaluar la homocedasticidad del método se realizaron 10 curvas de calibración siguiendo el método señalado en el punto 9.12 de la norma oficial

NOM-201-SSA1-2002 modificando el volumen final del aforo de los extractos clorofórmicos de 100 a 50 mL.

En las Figura 10 y 11 se ilustra el diagrama de trabajo del método utilizado.

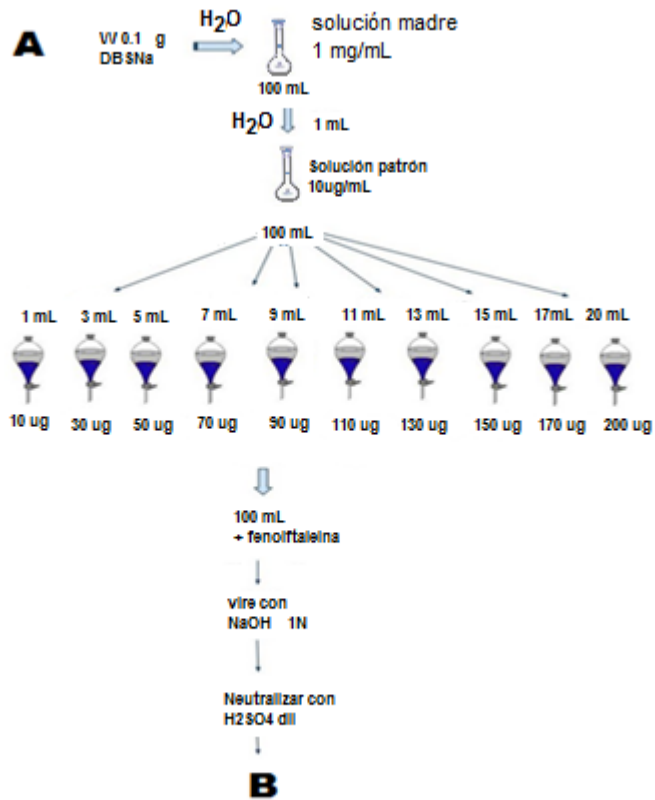


Figura 10 Método de sustancias activas al azul de metileno paso A

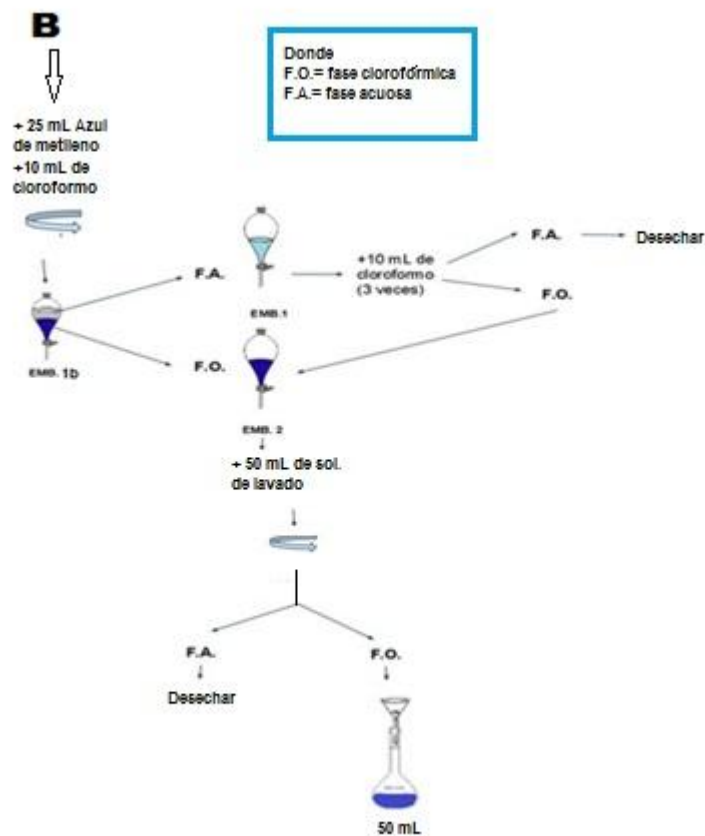


Figura 11 Método de sustancias activas al azul de metileno paso B.

2.4.1 EXTRACCIÓN Y DESARROLLO DE COLOR

Para cada disolución patrón y muestras, se ajustó el pH al vire de la fenolftaleína utilizando hidróxido de sodio o ácido sulfúrico 1N. A cada embudo se le adicionó 25 mL de disolución reactivo azul de metileno y se agitó vigorosamente 10 segundos, enseguida se adicionó 10 mL de cloroformo para extraer el par iónico formado.

Una vez separadas las fases, la fase clorofórmica se transfirió a un segundo embudo de separación. Se repitió la extracción 3 veces más, cada una con 10 mL de cloroformo.

Se combinaron todas las bases clorofórmicas en el segundo embudo y se lavaron con 50 mL de disolución de lavado preparada con una mezcla de 500 mL de agua, 6.8 mL de H_2SO_4 concentrado y 50 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ aforados a 1L. Se agitaron vigorosamente durante 30 segundos, se deja reposar para que se separen las fases y se hicieron pasar la fase clorofórmica a través de un embudo con fibra de vidrio para ser recibida en un matraz aforado de 50 mL. La fase acuosa se lavó con 10 mL de cloroformo que también se reciben en el matraz y se llevaron al aforo con el mismo disolvente.

2.4.2 ACONDICIONAMIENTO DEL MÉTODO

Se fijó la longitud de onda del equipo a 652 nm y se procedió a ajustar el instrumento a cero de absorbancia con el blanco de las disoluciones patrón. Se leyeron las soluciones patrón empezando por las de menor concentración y al final las muestras.

Se elaboró la curva de calibración graficando el promedio de absorbancia para cada disolución patrón en función de la masa del estándar (μg de DBSNa).

2.4.3 CÁLCULOS

De la ecuación de la recta obtenida:

$$y=mx+b$$

Donde:

y= absorbancia en la muestra analizada

m= pendiente (coeficiente de absortividad)

X = μg de DBSNa en la muestra

b= Ordenada al origen

Despejar x para obtener directamente los μg de DBSNa en la muestra.

$$x = \frac{\left(\frac{y-b}{m}\right) - b}{V}$$

Para obtener la concentración de DBSNa en mg L^{-1} aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{dodecilbencen sulfonato de sodio} = \frac{(A-b)}{V} * F.D.$$

En donde:

A= μ g de DBSNa de sodio en la muestra

B= g de DBSNa de sodio en el blanco de muestras

V= Volumen de muestra

F.D. = factor de dilución

2.5 APLICACIONES A DISOLUCIONES Y MUESTRAS

Para evaluar el impacto en la calidad de las mediciones se analizaron tres muestras de agua sin efecto matriz con una concentración conocida de DBSNa (M1, M2 y M3) y tres muestras con cantidades desconocidas de sustancias activa al azul de metileno (M4, M5 y M6) como se ilustra en el Cuadro VIII siguiendo el mismo procedimiento que para la curva de calibración tomando en todos los casos 400 mL de muestra (Secretaria de Salud, 2002).

Cuadro VIII Muestras de ensayo

Mtra de agua	Cantidad de DBSNa (μg)
1	0.025
2	0.227
3	0.493
4	Desconocido
5	Desconocido
6	Desconocido

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización de este trabajo se corrieron 10 curvas de calibración experimentales con el método indicado en la NOM-201-SSA1-2002 y se evaluaron estadísticamente los resultados de la siguiente forma:

Sección 3.1 Resultados sin tratamiento. En esta sección se presentan los resultados de las diez curvas experimentales

Sección 3.2 Resultados considerando los datos homocedásticos (sin ponderar). Se calculan los parámetros estadísticos de regresión por el método de mínimos cuadrados y los límites de confianza. Después se efectuaron las siguientes pruebas estadísticas para demostrar la adecuación de los datos experimentales al modelo:

- a) Análisis de residuales: método gráfico residuos vs x y residuos vs valores ajustados de y , prueba F para evaluar homocedasticidad de los residuos
- b) Análisis de normalidad: análisis gráfico y prueba de contraste de bondad de ajuste de Kolmogorov
- c) Criterio de Bartlett para evaluar la homocedasticidad de las varianzas experimentales en y .

Sección 3.3 Tratamiento heterocedástico o ponderado.

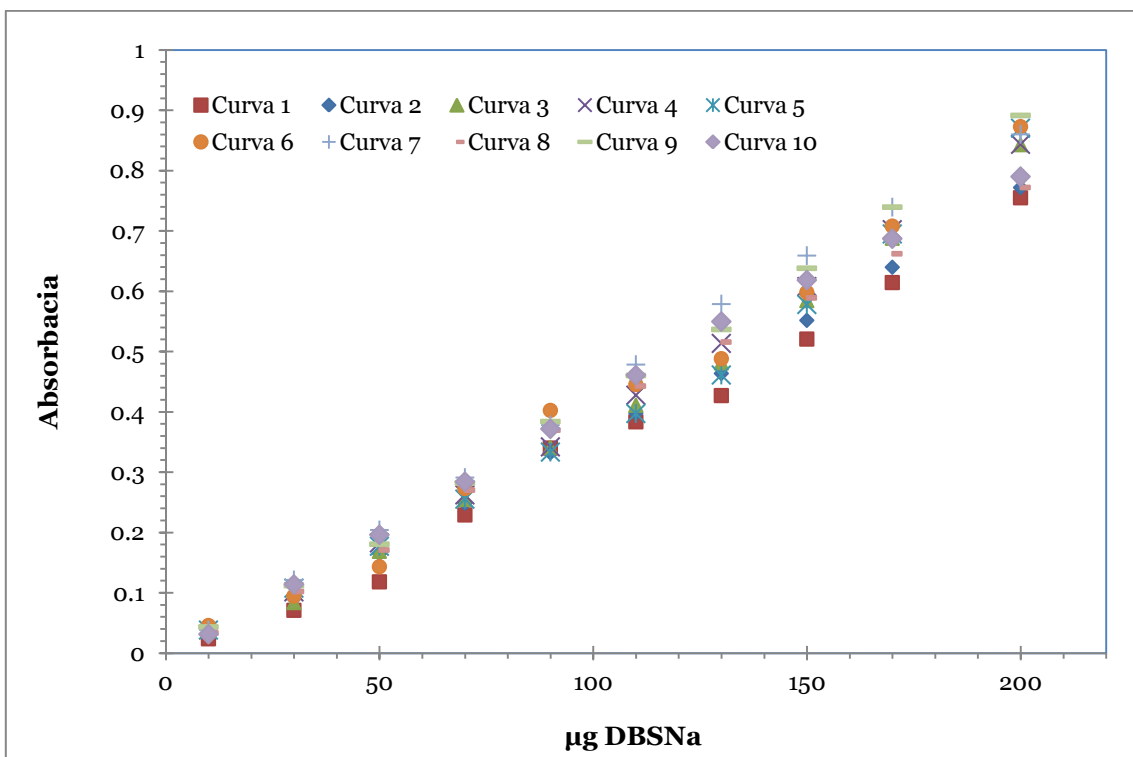
Sección 3.4 Comparación de resultados homocedásticos con los heterocedásticos (no ponderado y ponderado).

Sección 3.5 Resultados de muestras utilizando ambos métodos y comparación de resultados.

3.1 RESULTADOS SIN TRATAMIENTOS

En la Gráfica 1 se observan las diez curvas de calibración realizadas. La cantidad de DBSNa está expresada en microgramos.

De forma cualitativa podemos ver que la dispersión en el eje y va aumentando a mayor cantidad de DBSNa.



Gráfica 1 Curvas experimentales del DBSNa.

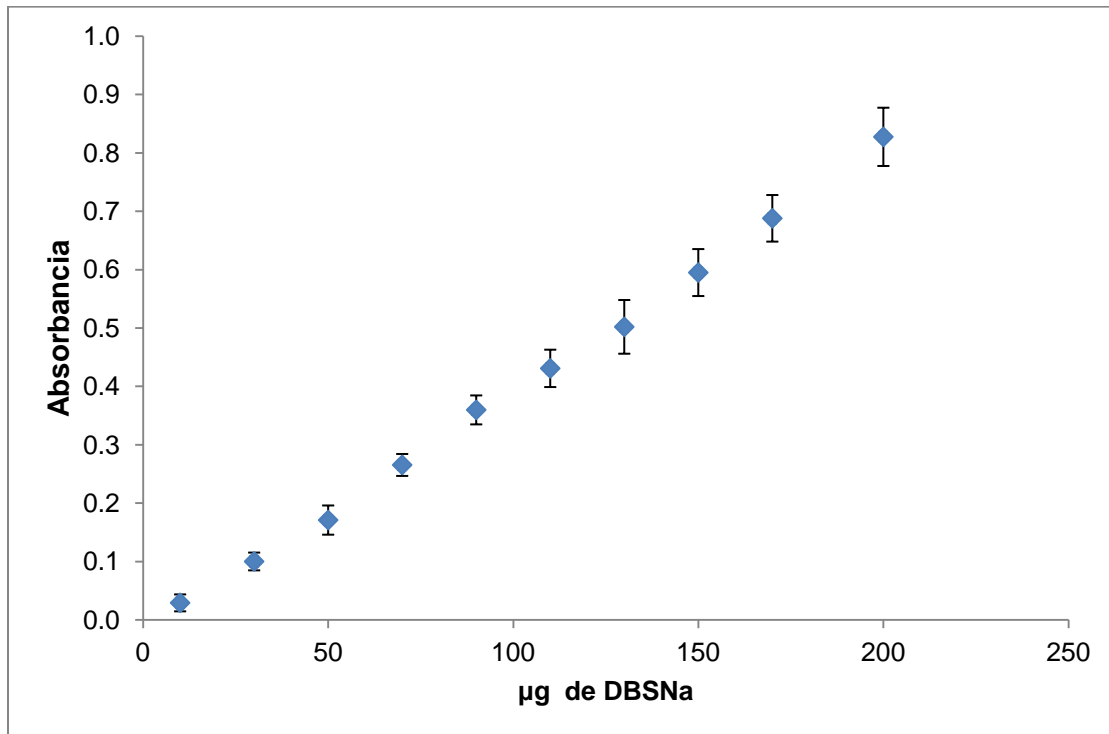
En el Cuadro IX se presentan los promedios de las absorbancias de las diez curvas realizadas experimentalmente y su desviación estándar. Como se puede observar, de forma general, las desviaciones estándar van aumentando al aumentar los µg de DBSNa. También hay que señalar que dentro de los niveles de concentración no está incluido el cero, es decir, el blanco de reactivos, esto debido a que la metodología indica que el equipo debe ponerse en ceros con el blanco de la curva y no con el disolvente, en este caso cloroformo (Secretaría de Salud, 2002).

Cuadro IX Resultados promedio de las absorbancias de las diez curvas realizadas

µg de DBS Na	Absorbancia	S_y (µg de DBS Na)
10	0.0291	0.0145
30	0.1000	0.0152
50	0.1709	0.0250
70	0.2653	0.0188
90	0.3596	0.0248
110	0.4307	0.0320
130	0.5018	0.0460
150	0.5948	0.0402
170	0.6877	0.0399
200	0.8272	0.0499

Resulta importante recordar el cambio del aforo final de 100 a 50 mL en las disoluciones finales de la curva de calibración. Esta modificación aumentó la sensibilidad de la determinación y disminuyó la cantidad de cloroformo utilizada. Se observa que la absorbancia promedio del nivel de concentración mayor de la curva (200 µg de DBSNa) fue 0.8272 la cual no compromete el cumplimiento de la ley de Beer.

En la Gráfica 2 podemos observar la tendencia lineal de la recta promedio.



Gráfica 2 Curva promedio de DBSNa y Sy

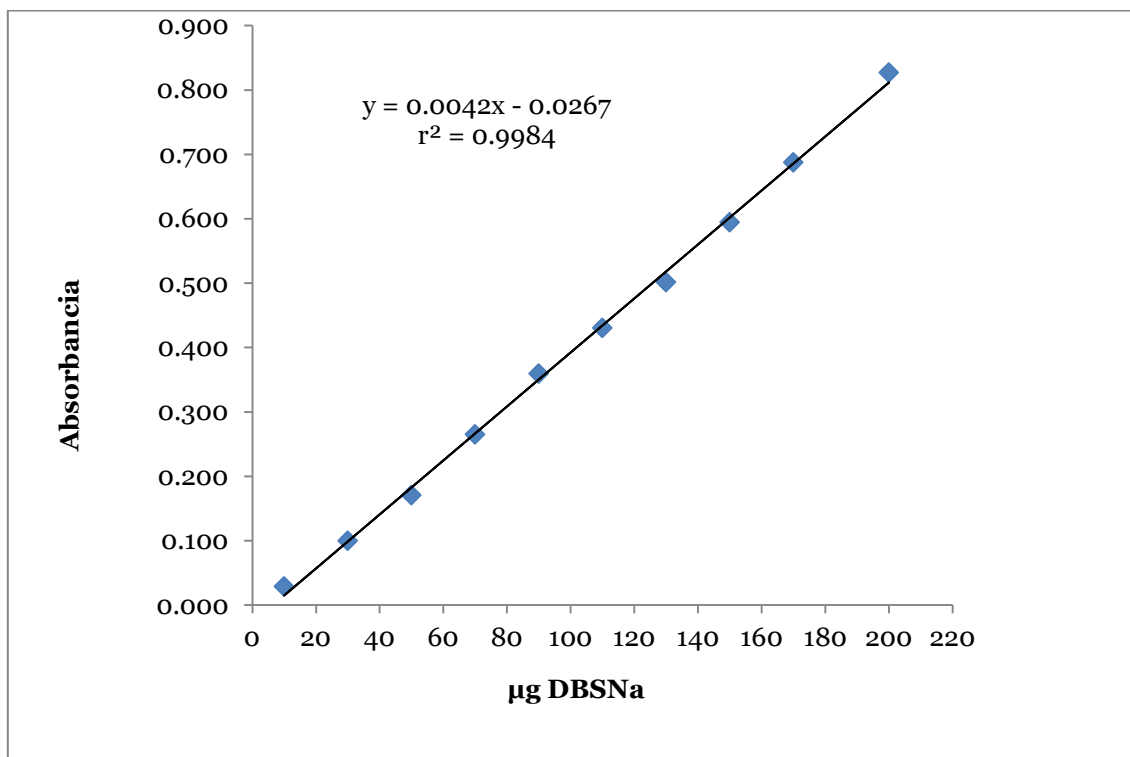
3.2 RESULTADOS CONSIDERANDO LOS DATOS HOMOCEDÁSTICOS, (SIN PONDERAR).

3.2.1 RESULTADOS DE LA REGRESIÓN

Se realizó el análisis de regresión considerando los datos como homocedásticos, es decir, sin ponderar, para obtener los parámetros estadísticos de regresión por el *Método de Mínimos Cuadrados* y los límites de confianza. El Cuadro X muestra los resultados del método de mínimos cuadrados a la curva de calibración promedio (Miller & Miller, 2002). En la gráfica 3 se presenta la curva de calibración y la curva de regresión ajustada.

Cuadro X Resultados de los coeficientes de regresión

Centro de gravedad	\bar{X} ($\mu\text{g de DBSNa}$)	101
	\bar{Y} (absorbancia)	0 .3967
Coeficiente de correlación r (coeficiente momento producto)		0 .9991
Coeficiente de determinación r^2		0 .9982
Pendiente (b)		0 .00419 \pm 0.00014
Ordenada (a)		-0 .0262 \pm 0.01619
Errores aleatorios en la dirección y ($s_{y/x}$)		0 .0112
Determinación de la desviación estándar de la pendiente (s_b)		0 .000006
Desviación estándar de la ordenada al origen (s_a)		0 .00702



Gráfica 3 Recta de regresión homocedástica de la curva de calibración promedio

Los valores de \bar{X} e \bar{Y} nos indican el centro de gravedad de la recta con menor desviación estándar (Miller & Miller, 2002).

El parámetro r^2 expresa la fracción de variación total de la variable dependiente (y) explicada por el modelo, por lo que puede asumir valores de 0 a 1. Se considera que los valores superiores a 0.98, en general, son indicativos de un buen ajuste. Observando el resultado experimental obtenido de 0.9982 puede concluirse que hay indicio de un buen ajuste (Mongay-Fernández, 2005; Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

De manera similar el resultado experimental de 0.9991 para el coeficiente de correlación r , junto con la tendencia lineal observada en la gráfica 3, nos confirma que existe un ajuste adecuado de nuestros datos (Miller & Miller, 2002; Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Para confirmar que el valor de r es realmente significativo se recomienda emplea el contraste estadístico t : (Miller & Miller, 2002)

H_0 : La correlación no es significativa (correlación de cero)

$$t_{cal} = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$t_{cal}=66.61$$

$$t_{(10-2)}^{\alpha=0.05} = 2.31$$

Como $t_{cal} > t_{(10-2)}^{\alpha=0.05}$ se rechaza H_0 y por lo tanto existe una correlación significativa.

El siguiente parámetro indicado en el Cuadro X es el error aleatorio en la dirección de y ($s_{y/x}$), su cálculo es necesario para obtener los errores aleatorios de la pendiente (s_b), la ordenada al origen (s_a) y el asociado a la concentración calculada de la muestra de ensayo. Elevado al cuadrado representa la varianza de los residuos. (Ramis Ramos & García-Álvarez-Coque, 2001; Miller & Miller, 2002)

S_a y s_b son necesarios para ejecutar pruebas estadísticas sobre la pendiente o la ordenada como sus límites de confianza, además s_b se emplea en el cálculo de los límites de detección y de cuantificación. (Miller & Miller, 2002).

Prueba de hipótesis en la ordenada al origen (a):

Si el límite de confianza incluye el cero, entonces, a no es significativamente diferente de cero.

$$H_0: a = 0$$

$$\text{Límites de confianza: } a \pm t_{8,0.05} s_a = -0.0262 \pm 0.01619$$

Límite de confianza= $[-0.0424, -0.0100]$, no incluye el cero por lo que se rechaza H_0 , es necesario incluir la ordenada al origen en la ecuación de la recta.

Prueba de hipótesis a la pendiente (b):

Si el límite de confianza incluye el cero, entonces, no existe una respuesta significativa de y con respecto a x .

$$H_0: b = 0$$

$$\text{Límites de confianza: } b \pm t_{8,0.05} s_b = 0.00419 \pm 2.306 * 0.00006$$

Límite de confianza= $[0.00405, 0.00433]$, no incluye el cero por lo que se rechaza H_0 , Sí existe una relación significativa entre las variables.

3.2.2 RESULTADOS DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR NO PONDERADA PARA LAS PREDICCIONES EN LOS DIEZ NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN (S_{x0})

Al calcular la concentración de una muestra de ensayo a partir de la recta de regresión obtenida es necesario estimar el error que está asociado a ésta.

Considerando que los parámetros de la recta de regresión, la ordenada al origen y la pendiente, están sujetos a error, junto con los errores en dirección de y , es lógico suponer que la estimación de los errores de la concentración de ensayo resulta algo complejo. Para estimar este error “global” se ha propuesto la siguiente ecuación (Miller & Miller, 2002):

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

La ecuación anterior sugiere que habrá mayor precisión en la concentración del DBSNa cuando la interpolación de la absorbancia se encuentre alrededor del centro de gravedad de la curva de calibración.

En el Cuadro XI se resume los resultados de tomar la absorbancia de cada nivel de la curva promedio como una muestra de ensayo para hacer la predicción del valor de x_0 y su error asociado.

Cuadro XI Predicciones y su desviación estándar.

y_0 (absorbancia)	x_0 (μg de DBSNa)	s_{x_0} (μg de DBSNa)
0.0152	10	3.1
0.0991	30	3.0
0.1829	50	2.9
0.2668	70	2.8
0.3506	90	2.8
0.4344	110	2.8
0.5183	130	2.8
0.6021	150	2.8
0.6860	170	3.0
0.8118	200	3.1

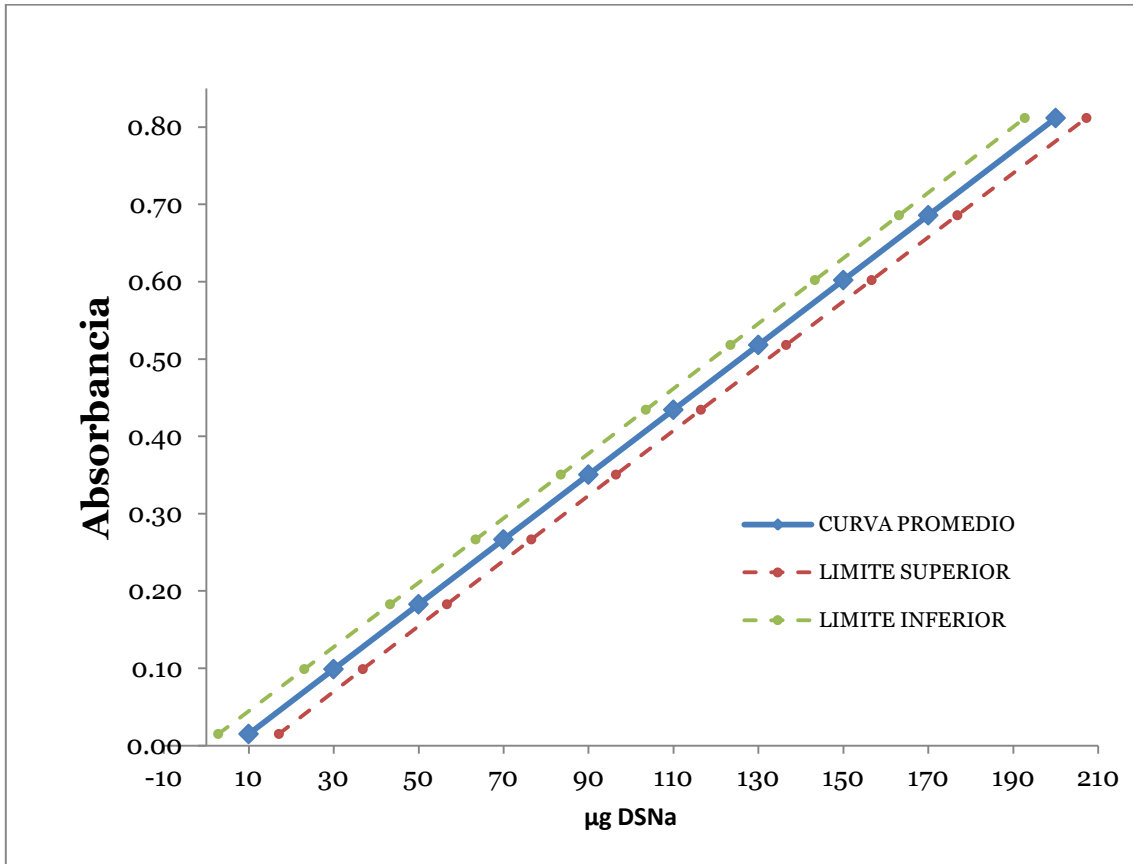
3.2.3 RESULTADOS DE LÍMITES DE CONFIANZA

Teniendo el error de la muestra de ensayo (s_{x_0}) es posible calcular el intervalo de confianza.

En el Cuadro XII se resumen los resultados para el cálculo de los intervalos de confianza de la curva de regresión con un nivel de confianza del 95%. En la gráfica 4 observa la tendencia y el comportamiento de los límites.

Cuadro XII Intervalos de confianza de la recta no ponderada

Cuadro XI	y_0 (absorbancia)	s_{x_0} (μg de DBSNa)	% C.V.	$x_0 - t_8^{\alpha 0.05} s_{x_0}$ (μg)	$x_0 + t_8^{\alpha 0.05} s_{x_0}$ (μg)
10	0.0152	3.1	31.0	2.9	17.1
30	0.0991	3.0	10.0	23.1	36.9
50	0.1829	2.9	5.8	43.3	56.7
70	0.2668	2.8	4.0	63.4	76.6
90	0.3506	2.8	3.1	83.5	96.5
110	0.4344	2.8	2.5	103.5	116.5
130	0.5183	2.8	2.2	123.4	136.6
150	0.6021	2.8	1.9	143.3	156.7
170	0.6860	3.0	1.8	163.1	176.9
200	0.8118	3.1	1.6	192.7	207.3



Gráfica 4 Límites de confianza de la recta no ponderada

En el modelo de mínimos cuadrados los errores son mayores en ambos extremos de la recta y van disminuyendo gradualmente al centro de gravedad, en este caso se observan valores solo ligeramente mayores en los extremos.

El error de las predicciones al ser prácticamente igual en todos los niveles de concentración causa mayor influencia en los niveles más bajos reflejado en coeficientes de variación mayores (% C.V.).

Para evaluar este punto se dispone de la información publicada en el standad methods for the examination of water and wastewater (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2005) donde se cita lo siguiente:

Precisión y sesgo

Una muestra sintética 270 µg de DBSNa /L en agua destilada fue analizada en 110 laboratorios con una desviación estándar relativa de 14.8 % y un error relativo de 10.6 %

Una muestra de agua potable a la cual se le adicionó 480 µg de DBSNa/L fue analizada en 110 laboratorios con una desviación estándar relativa de 9.9 % y un error relativo de 1.3 %

Una muestra de agua de río adicionada con 2.94 mg DBSNa/L fue analizada en 110 laboratorios con una desviación estándar relativa de 9.1 % y un error relativo de 1.4 %

De ésta información se infiere que el método fue validado a través de pruebas interlaboratorio. El número de ensayos (110) da confianza a los resultados, los cuales indican que en la muestra con la concentración más baja de DBSNa, como es de esperarse, se obtuvo la desviación estándar relativa más alta (14.8 %). En la muestra con concentración más alta de DBSNa el error relativo fue menor (9.1 %).

Para hacer una comparación de lo reportado en el standard methods for the examination of water and wastewater con los resultados obtenidos en este trabajo, se utilizaron 4 niveles de la curva con sus respectivas desviaciones estándar relativa (Cuadro XIII).

Cuadro XIII Desviaciones estándar relativas de predicciones en la curva no ponderada.

	Cantidad de DBSNa x_0 (μg)	Desviación estándar absoluta s_{x_0} (μg)	Desviación estándar relativa %
Punto bajo de la curva	10	3.1	31.0
Punto medio de la curva	50	2.9	5.8
Punto medio de la curva	90	2.8	3.1
Punto alto de la curva	200	3.1	1.6

Salvo el nivel más bajo de la curva (el de 10 μg), todos los demás muestran una desviación estándar relativa menor a la reportada en la referencia citada.

3.2.4 LÍMITE DE DETECCIÓN

Para comprobar si el primer nivel de la curva es mayor o por lo menos igual a los límites de detección y de cuantificación se calculó lo siguiente (Miller & Miller, 2002; EURACHEM, 1998):

Límite de detección: Se consideró el valor de la ordenada al origen (a) como la señal del blanco y la desviación estándar de y en x ($s_{y/x}$) como estimador de la desviación estándar del blanco.

Límite de detección

$$X_B = \frac{(a + 3s_{y/x}) - a}{b}$$

$$X_B = \frac{(-0.0262 + 3 * 0.0112) - (-0.0262)}{0.00419} = 8.02 \mu\text{g}$$

Sustituyendo tenemos que límite de detección = 8.02 μg DBSNa

El primer punto de la curva cumple con el límite de detección.

3.2.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Existen varios criterios para estimarlo. En la guía de validación de métodos emitida por el CENAM lo definen como la señal del blanco de muestra más 5, 6 ó 10 desviaciones estándar. Tomando el criterio de 10 desviaciones estándar, tenemos lo siguiente (EURACHEM, 1998; Miller & Miller, 2002):

Límite de cuantificación

$$X_B = \frac{(a + 10s_{y/x}) - a}{b}$$
$$X_B = \frac{(-0.0262 + 10 * 0.0112) - (-0.0262)}{0.00419} = 26.7\mu g$$

Sustituyendo tenemos que Límite de cuantificación =26.7 µg de DBSNa (EURACHEM, 1998).

El primer nivel (10 µg de DBSNa) de la curva es menor al límite de cuantificación por lo que al utilizar un tratamiento de datos homocedástico no debe incluirse.

Este resultado sugiere cambiar el procedimiento de la NOM-2001-SSA1-2002 para que se incluya el blanco de la curva como un nivel más en la calibración. Con ésta modificación será posible evaluar la dispersión real de éste nivel obteniendo límites de detección y de cuantificación más confiables. El cero del equipo deberá ajustarse con el disolvente (en éste caso cloroformo), tal como lo indica el standard methods for the examination of water and wastewater (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2005).

3.3 PRUEBAS DE ADECUACIÓN DEL MODELO DE MÍNIMOS CUADRADOS

Así mismo, para demostrar la adecuación de los datos experimentales al modelo de mínimos cuadrados se efectuaron las siguientes pruebas estadísticas:

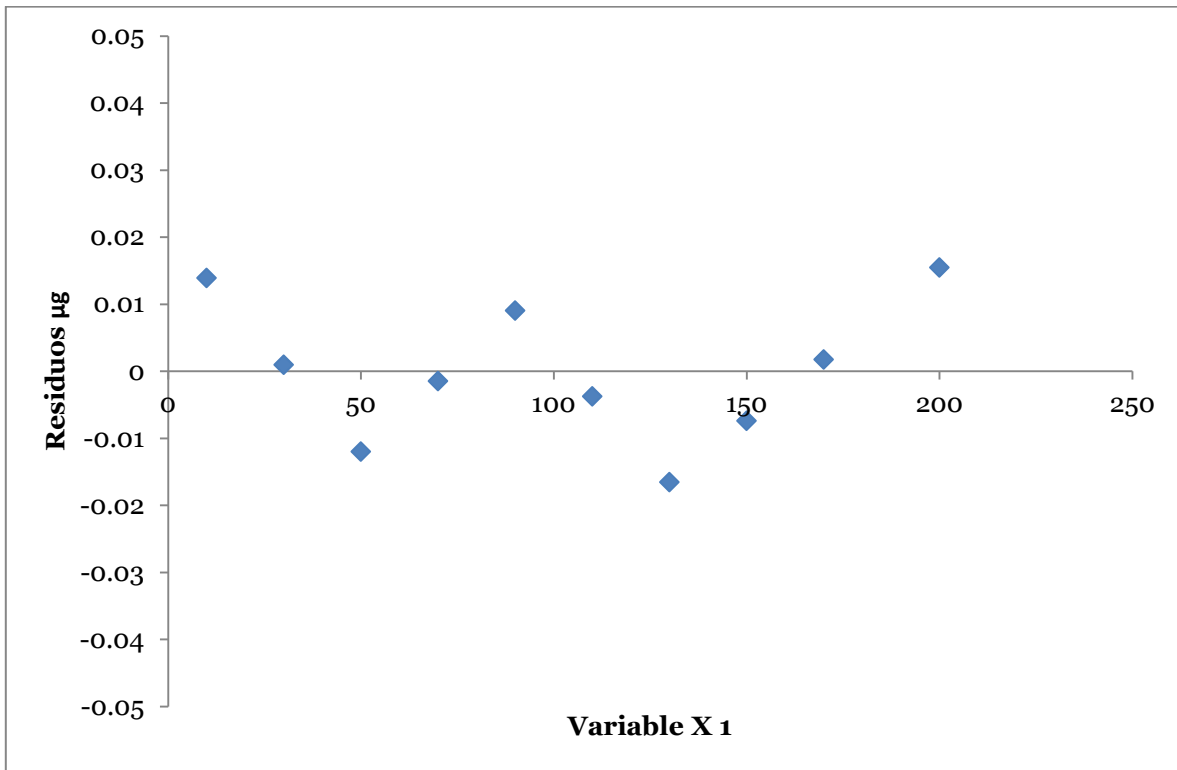
- Análisis de residuales: Método gráfico residuos vs " x " y residuos vs *valores ajustados de "y"* , y la prueba F para evaluar homocedasticidad de los residuos.
- Análisis de normalidad: Análisis gráfico y prueba de contraste de bondad de ajuste de Kolmogorov
- Criterio de Bartlett para evaluar la homocedasticidad de las varianzas experimentales en y .

3.3.1 ANÁLISIS DE RESIDUOS

a) Método gráfico (residuos vs x)

El dato de coeficiente de correlación lineal por sí solo no es la forma más eficiente de concluir sobre el comportamiento lineal de un método por lo que resulta muy útil realizar un análisis gráfico de residuos (Ramis Ramos & García-Álvares-Coque, 2001).

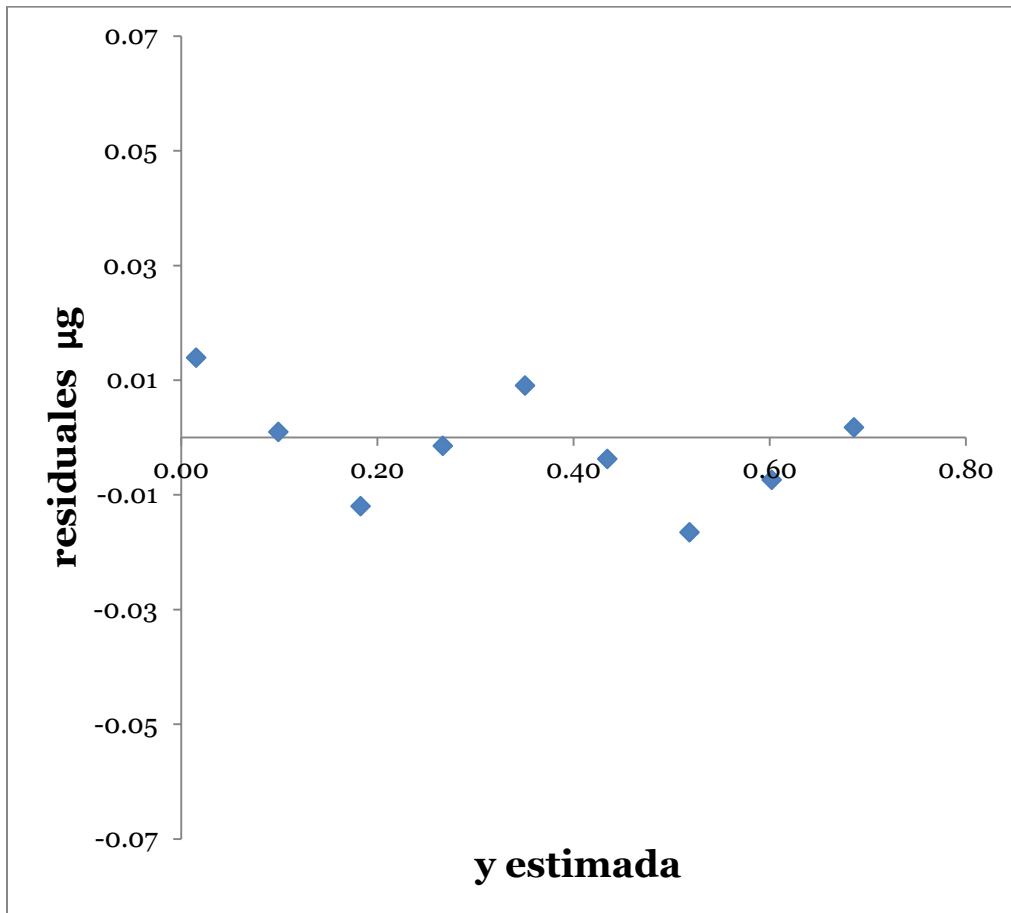
La gráfica 5 muestra la distribución de x_i contra el valor de su residual e_i . Observando es evidente que son pocos los niveles experimentales que disponemos para sacar una conclusión absoluta (es recomendable tener 20), pero la tendencia podría caer en el caso de linealidad y heterocedasticidad ya que aunque los residuos muestran una tendencia aleatoria, la dispersión va aumentando al aumentar el nivel (Ramis Ramos & García-Álvares-Coque, 2001).



Gráfica 5 Residuales en función de los µg de DBS de Na

b) Método gráfico (residuos vs valores ajustados de y)

Otra forma de comprobar la adecuación del modelo de regresión lineal es una gráfica de los residuales en función de los valores ajustados "y" correspondientes. En la Gráfica 6 se observa que los residuales siguen un patrón satisfactorio de adecuación (banda horizontal). (Douglas, 2005)



Gráfica 6 Residuales en función de los valores ajustados de "y"

a) Ensayo de homocedasticidad de los residuos

Un criterio para evaluar la homocedasticidad de los residuos se tiene con la siguiente prueba F en la que se comparan las varianzas de y en dos valores extremos de x (Ramis Ramos & García-Álvarez-Coque, 2001):

Para que los residuos se consideren homocedásticos debe cumplirse la H_0 siguiente

$$H_0: s_{ymin}^2 = s_{ymax}^2$$

	$X_{\min}(\mu\text{g})=10$	$X_{\max}(\mu\text{g})=200$
s_{ymin}^2 (absorbancia)	0.000209	_____
s_{ymax}^2 (absorbancia)	_____	0.00249

$$F_{cal} = \frac{0.00249}{0.000209} = 11.904$$

$$F_{\alpha=0.05}^{\tau_1=\tau_2=9} = 3.179$$

Como F calculada es mayor a F de tablas, se rechaza H_0 al nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, por tanto los residuos son heterocedásticos.

b) Análisis de normalidad

Algunos contrastes estadísticos suponen que los datos utilizados proceden de una población normal (la distribución de los residuos en el modelo de los mínimos cuadrados, estadísticos t, F y los intervalos de confianza) por lo que es importante verificar que el modelo cumple con este punto. Una forma de comprobar la suposición de normalidad es por medio de una gráfica de probabilidad normal o, de forma más robusta, por una prueba de contraste de bondad de ajuste como la de Kolmogorov (Douglas, 2005; Miller & Miller, 2002).

Análisis gráfico

En las gráficas de probabilidad normal, donde se enfrentan los datos que se han observado frente a los teóricos que se obtendrían de una distribución normal, se espera obtener una tendencia lineal (como lo muestra la Figura 12) para

considerar una distribución ideal, aunque se debe tomar en cuenta que es común que los niveles extremos se separen más de la tendencia (Douglas, 2005).

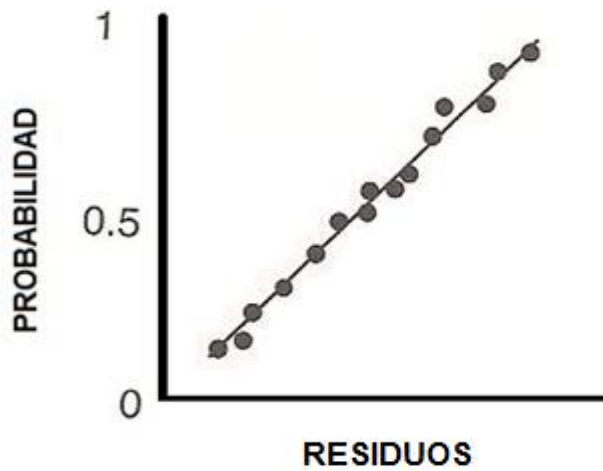
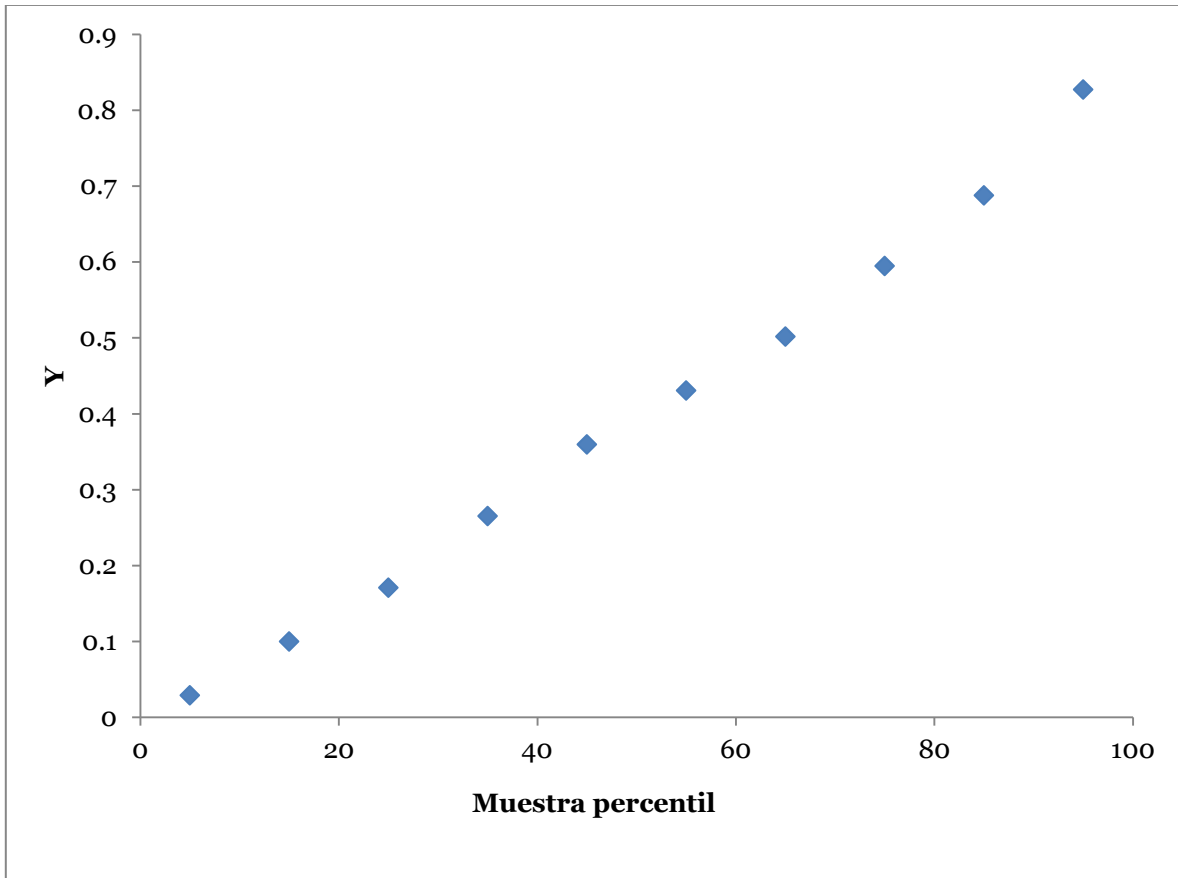


Figura 12 Tendencia de probabilidad normal ideal (Douglas, 2005)

El análisis estadístico de probabilidad normal de los datos experimentales dio como resultado la Gráfica 7, en la que es posible observar una tendencia lineal con la que suponemos que los datos presentan una distribución normal.



Gráfica 7 Probabilidad normal²

Prueba de contraste de bondad de ajuste de Kolmogorov (Douglas, 2005; Miller & Miller, 2002; Wayne, 1999)

En la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov para comprobar si los datos experimentales se ajustan a una distribución normal se debe efectuar una comparación entre la función teórica de distribución acumulativa normal estándar, $F_t(x)$, y la función muestral de distribución acumulativa, $F_M(x)$. Si existe un ajuste estrecho entre la distribución acumulativa teórica y muestral, entonces se apoya la

² Gráfica obtenida directamente utilizando excel

hipótesis de que la muestra se extrajo de una población cuya función acumulativa específica es $F_t(x)$.

Se considerará que la muestra presenta una distribución acumulativa normal si se cumple la siguiente H_0 :

H_0 : $F_M(x) = F_t(x)$ para toda x

De el Cuadro XIV y la Gráfica 8 se puede observar que la mayor diferencia entre $F_t(x)$ y $F_M(x)$ es de 0.0915 unidades, valor muy lejano al crítico de 0.261, **por lo que se acepta H_0** y se concluye, con un nivel de significación de $P=0.05$, que los datos proceden de una población con distribución normal.

Cuadro XIV Contraste de bondad del ajuste de Kolmogorov

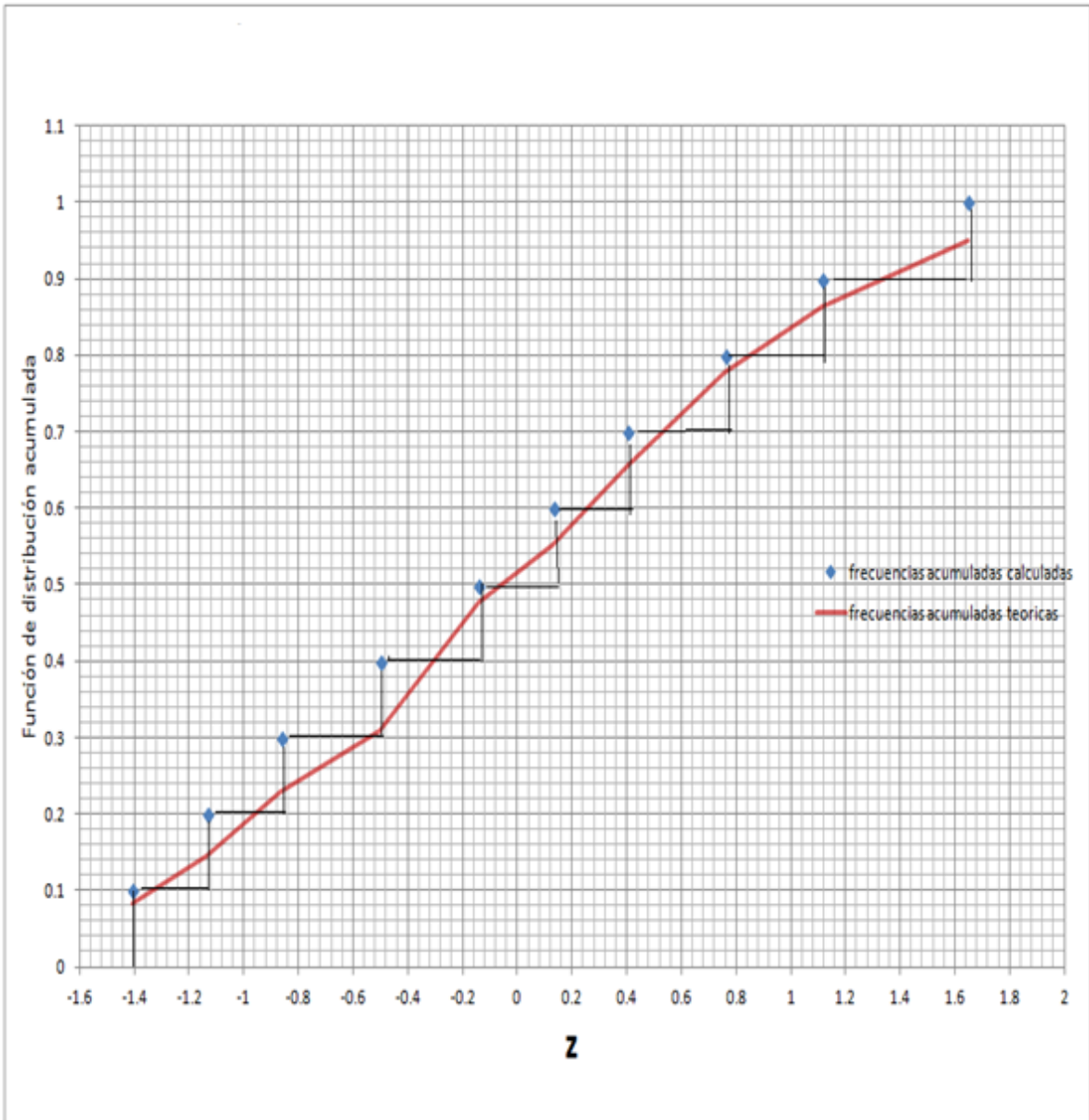
Nivel de concentración	Absorbancia	Variable normal estándar z	Función de distribución acumulada de 0.1 (1/10) $F_M(x)$	Función de distribución acumulada normal estándar para $P=0.05 F_i(x)$	Diferencia entre valores de $F_i(x)$ y $F_M(x)$.
1	0.0291	-1.41	0.1	0.0808	0.019
2	0.1000	-1.14	0.2	0.1446	0.055
3	0.1709	-0.86	0.3	0.2296	0.070
4	0.2653	-0.50	0.4	0.3085	0.092
5	0.3597	-0.14	0.5	0.4761	0.024
6	0.4307	0.13	0.6	0.5517	0.048
7	0.5018	0.40	0.7	0.6554	0.045
8	0.5947	0.76	0.8	0.7764	0.024
9	0.6878	1.11	0.9	0.8643	0.036
10	0.8273	1.65	1	0.9505	0.050

Promedio 0.3967

S 0.2612

N 10

Valor crítico (Kolmogorov) 0.262



Gráfica 8 Método Kolmogorov

c) Criterio de Bartlett para evaluar la homocedasticidad de las varianzas en y

Esta prueba se basa en la distribución χ^2 . Se debe calcular la función χ^2_{exp} y si su valor es inferior al valor tabulado para un nivel de significancias α y K-1 grados de libertad, se admite Ho (Mongay-Fernández, 2005).

Ho: No existe diferencia significativa de las varianzas

$$\chi^2_{exp} = \frac{2.303}{C} [(N - K) \log s_{dentro}^2 - \sum_k (n_k - 1) \log s_k^2]$$

$$s_{dentro}^2 = \frac{\sum_k (n_k - 1) s_k^2}{N - K}$$

$$C = 1 + \frac{\left[\sum_k \frac{1}{n_k - 1} \right] - \frac{1}{N - K}}{3 * (K - 1)}$$

$$\chi^2_{exp} = 26.00$$

$$\chi^2_{(95\%, 9)} = 16.92$$

Donde:

N=número total de datos

K=número de series

n=número de datos de cada serie

s_{dentro}^2 = varianza combinada

C= función de grados de libertad

De acuerdo a los resultados $\chi_{exp}^2 \geq \chi_{(95\%,9)}^2$, por lo tanto se rechaza H_0 , y se concluye que existe una diferencia significativa entre las varianzas de y .

El resultado de esta prueba nos confirma que en realidad los datos experimentales tienen un comportamiento heterocedástico por lo que deben tratarse con un modelo de regresión ponderado.

3.4 RESULTADOS CONSIDERANDO DATOS HETEROCEDÁSTICOS (RECTAS PONDERADAS)

3.4.1 RESULTADOS DE LA REGRESIÓN PONDERADA

A continuación se resume los resultados de los parámetros de regresión calculados a partir del modelo de regresión ponderado, es decir, considerando que los datos son heterocedásticos.

Centro de gravedad ponderado	\bar{x}_w (μg de DBSNa)	56.4640
	\bar{y}_w (absorbancia)	0.2131
Pendiente ponderada		0.0041
Ordenada ponderada (absorbancia)		-0.0197
Errores aleatorios en la dirección de y ($s_{y/x})_w$		0.0091
Determinación de la desviación estándar de la pendiente ($s_b)_w$		0.00006
Desviación estándar de la ordenada al origen $s_a)_w$		0.01467

La primera observación es que al ponderar las desviaciones de cada punto el centro de gravedad de la recta ya no coincide con el centro de la gráfica situándose prácticamente en los niveles más bajos.

La ordenada al origen y la pendiente tienen valores muy cercanos a los obtenidos en la recta no ponderada.

Al igual que en la regresión no ponderada, se calculan los errores aleatorios en la dirección de y ($s_{y/x}$)_w para calcular los de la pendiente (s_b)_w y la ordenada al origen (s_a)_w pero considerando el efecto de la ponderación. (Miller & Miller, 2002)

Prueba de hipótesis en la ordenada al origen ponderada (a_w) (Ramis Ramos & García-Álvares-Coque, 2001):

Si el límite de confianza incluye el cero, entonces, no es necesario incluir a_w en la ecuación de la recta ya que no es significativamente diferente de cero.

$$H_0: a_w = 0$$

$$\text{Límites de confianza: } a_w \pm t_{8,0.05} s_{a_w} = -0.0197 \pm 2.306 * 0.01467$$

Límite de confianza=[-0.0535, 0.0141], incluye el cero por lo que se acepta H_0 . La ordenada al origen no es significativamente diferente de cero y por lo tanto puede excluirse del modelo.

Prueba de hipótesis a la pendiente ponderada (b_w) (Ramis Ramos & García-Álvares-Coque, 2001):

Si el límite de confianza incluye el cero, entonces, no existe una respuesta significativa de y con respecto a x .

$$H_0: b_w = 0$$

$$\text{Límites de confianza: } b_w \pm t_{8,0.05} s_{b_w} = 0.0041 \pm 2.306 * 0.00006$$

Límite de confianza=[0.0040, 0.0042], no incluye el cero por lo que se rechaza H_0 , sí existe una relación significativa entre las variables.

3.4.2 RESULTADOS DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE UNA PREDICCIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN (s_{x_0w})

El parámetro que nos definirá el impacto en la calidad de la determinación de una muestra de ensayo utilizando la recta de regresión ponderada, en comparación

con la que se obtiene con una recta sin ponderar, es la desviación estándar de la predicción s_{x_0w} .

Para estimar éste error “global” se utilizó la siguiente ecuación (Miller & Miller, 2002):

$$s_{x_0w} = \frac{s_{(\frac{y}{x})w}}{b} \sqrt{\frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b^2 \sum_i (w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)}}$$

En el Cuadro XV se resumen los resultados de las predicciones sobre la concentración en todos los niveles de la curva.

Cuadro XV Predicción en recta ponderada y su desviación estándar (sxo)

y_0 (absorbancia)	x_i (μg)	S_{x_0w} (μg)
0.0215	10	1.6
0.1040	30	1.6
0.1864	50	2.5
0.2689	70	2.0
0.3513	90	2.5
0.4338	110	3.2
0.5163	130	4.6
0.5987	150	4.1
0.6812	170	4.2
0.8048	200	5.3

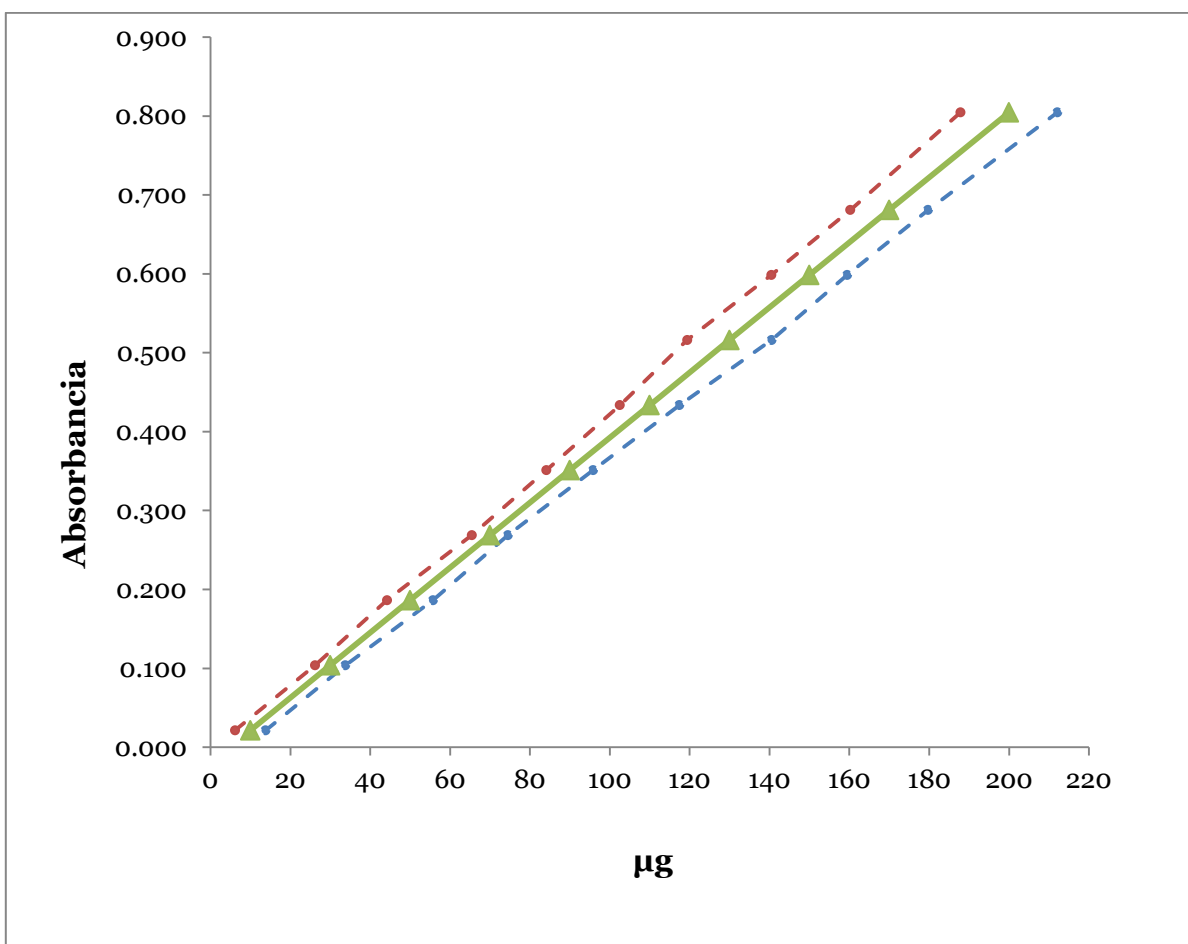
En este cuadro se observa que la desviación estándar de las predicciones aumenta con la concentración, a diferencia del tratamiento no ponderado donde el error de las predicciones es prácticamente constante en toda la curva.

3.4.3 LÍMITES DE CONFIANZA PONDERADO

En el Cuadro XVI se resumen los resultados para los límites de confianza ponderados representados en la gráfica 9.

Cuadro XVI Intervalos de confianza de la recta ponderada

y_0 (absorbancia)	x_0 (μg)	$x_0 + t_{(n-2)*s_{x0W}}$ (μg)	$x_0 - t_{(n-2)*s_{x0W}}$ (μg)
0.0291	11.84	15.62	8.05
0.1000	29.03	32.83	25.24
0.1709	46.23	51.98	40.48
0.2653	69.13	73.64	64.62
0.3596	92.00	97.87	86.14
0.4307	109.25	116.70	101.80
0.5018	126.49	137.02	115.96
0.5948	149.05	158.53	139.57
0.6877	171.59	181.34	161.83
0.8272	205.42	217.62	193.23



Gráfica 9 Límites de confianza ponderados del DBSNa

En la Gráfica 9 se observa como los límites van ampliándose en las concentraciones más altas. La parte más estrecha esta en las concentraciones más bajas, lo que confirma la heterocedasticidad de los datos.

Retomando la discusión sobre el tratamiento heterocedástico en el que las predicciones de los niveles más bajos de la curva tienen una desviación estándar menor a la que presentan los más altos. Esto resulta en que la amplitud del intervalo de confianza del primer nivel de la curva sea prácticamente la mitad del obtenido en el tratamiento homocedástico.

Al hacer la misma comparación de las desviaciones estándar relativas de las predicciones de algunos niveles de la de curva con el tratamiento heterocedástico y las reportadas en el standard methods for the examination of water and wastewater, tal como se hizo con los datos homocedásticos, se obtuvieron los resultados del Cuadro XVII:

Cuadro XVII Desviación estándar relativa en predicciones hechas sobre la recta ponderada

Nivel	Cantidad de DBSNa (µg)	Desviación estándar absoluta (µg)	Desviación estándar relativa %
bajo de la curva	10	1.6399	16.4
medio de la curva	50	2.4906	5.0
medio de la curva	90	2.5386	2.8
alto de la curva	200	5.2803	2.6

A pesar del 16.4% en la desviación estándar relativa para la predicción del primer nivel de la curva, podemos afirmar que el tratamiento heterocedástico de los datos da como resultado desviaciones estándar relativas menores a las reportadas en el standard methods for the examination of water and wastewater. Ninguna de las muestras analizadas por los 110 laboratorios tiene una cantidad de DBSNa cercana a los 10 µg (lo que equivaldría a una muestra con una concentración

aproximada de 25 µg/L). Se observa que la menor concentración que evaluaron fue de 217 µg/L con una desviación estándar relativa de 14. 8% (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2005).

Las desviaciones estándar relativas de las predicciones obtenidas con el tratamiento de datos considerando su heterocedasticidad difieren de las obtenidas asumiendo un comportamiento homocedástico, con lo cual se tiene evidencia de la importancia de evaluar el comportamiento de los datos para obtener resultados más realistas.

En los casos de muestras con concentraciones bajas de DBSNa el tratamiento homocedástico proporciona desviaciones estándar mayores y en las concentraciones más altas las desviaciones estándar menores, por lo que es necesario determinar el modelo que más se ajusta al comportamiento real de nuestros datos para aumentar la certidumbre de nuestros resultados, lo cual se traducirá en mayor confiabilidad.

3.4.4 LÍMITE DE DETECCIÓN

Al igual que en el tratamiento no ponderado, para comprobar si el primer nivel de la curva es mayor, o por lo menos, igual a los límites de detección y de cuantificación se hizo el siguiente cálculo:

De acuerdo al modelo de mínimos cuadrados es posible considerar el valor de $s_{y/xw}$ como s_B y el valor de la ordenada al origen puede utilizarse como una estimación de y_B (Miller & Miller, 2002; EURACHEM, 1998)

Límite de detección

$$X_{Bw} = \frac{(a_{Bw} + 3s_{y/xw}) - a_w}{b_w}$$

$$X_{Bw} = \frac{(-0.0197 + 3 * 0.0091) - (-0.0197)}{0.0041} = 6.7 \mu g$$

Sustituyendo tenemos que Límite de detección = 6.7 µg DBSNa

El primer punto de la curva cumple con el límite de detección.

3.4.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Tomando el criterio de 10 desviaciones estándar tenemos lo siguiente (EURACHEM, 1998; Miller & Miller, 2002) :

Límite de cuantificación

$$X_{Bw} = \frac{(a_{Bw} + 10s_{y/xw}) - a_w}{b_w}$$
$$X_{Bw} = \frac{(-0.0197 + 10 * 0.0091) - (-0.0197)}{0.0041} = 22.2\mu g$$

Sustituyendo tenemos que Límite de cuantificación = 22.2 µg de DBSNa

El primer nivel de la curva es menor a este límite por lo que al utilizar un tratamiento de datos heterocedástico se recomienda no incluirlo.

3.5 COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE EL TRATAMIENTO DE DATOS NO PONDERADO Y PONDERADO

En el Cuadro XVIII y XIX se pueden observar las concordancias y diferencias entre el tratamiento de datos homocedástico y heterocedástico.

En el Cuadro XVIII se observa que la ubicación del centro de gravedad de las rectas en cada modelo es diferente. Como se comentó anteriormente, en la recta ponderada, el centro coincide con la zona de bajas concentraciones, lo que es lógico de esperar al haberse obtenido las varianzas más pequeñas en esa zona. Por otra parte, se plantearon pruebas de hipótesis para determinar si existe diferencia significativa en los valores de la pendiente y la ordenada al origen. En

cuanto a los errores, en el Cuadro XX se muestran los resultados de aplicar la prueba F para concluir si existe diferencia significativa entre ambos tratamientos, de los resultados se concluye que solo existe diferencia significativa en los valores de la desviación estándar de la ordenada al origen (s_a y s_{aw})

Cuadro XVIII Comparación de parámetros de regresión obtenidos entre el tratamiento de datos homocedástico y el heterocedástico

Parámetro	No ponderado (homocedástico)	Ponderado (heterocedástico)
\bar{x} (μg)	101	56
\bar{y} (absorbancia)	0.397	0.213
Pendiente	0.0042 \pm 0.00014	0.0041 \pm 0.00014
Ordenada (absorbancia)	-0.0262 \pm 0.01619	-0.0197 \pm 0.0338
Errores aleatorios en la dirección de y (s y/x)	0.011	0.0091
Determinación de la desviación estándar de la pendiente (s_b)	0.00006	0.00006
Desviación estándar de la ordenada al origen (s_a)	0.0070	0.016

En el Cuadro XVIII se muestran las desviaciones estándar de las predicciones (s_{x_0} y $s_{x_{ow}}$) resultantes de la aplicación de cada modelo. Mientras que en el tratamiento no ponderado el error prácticamente no cambia a lo largo de todos los niveles de concentración, en el método ponderado, de forma general, incrementa al aumentar el valor de x . Después de aplicar la prueba F en cada caso, para establecer si existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por cada método con 95% de confiabilidad, se concluye que no existe diferencia significativa entre las desviaciones estándar de las predicciones obtenidas con cada método a ningún nivel de concentración. Los resultados de esta prueba se muestran en el Cuadro XXI.

Cuadro XIX Comparación de la desviación estándar de la predicción entre el tratamiento de datos homocedástico y heterocedástico

Predicción	Error global de las predicciones	
	Método no ponderado (homocedástico) (s_{x_0})	Método ponderado (heterocedástico) ($s_{x_{ow}}$)
10	3.0946	1.6399
30	2.9852	1.6417
50	2.9001	2.4906
70	2.8415	1.9520
90	2.8110	2.5386
110	2.8095	3.2242
130	2.8372	4.5587
150	2.8930	4.1045
170	2.9756	4.2217
200	3.1446	5.2803

COMPARACIÓN DE PENDIENTES

Para determinar si existe diferencia significativa en las pendientes no ponderada (b_{np}) y ponderada (b_p) se planteó la siguiente hipótesis (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002):

$$H_0: b_{np} - b_p = 0$$

$$IC(\beta_{np} - \beta_p) = (b_{np} - b_p) \pm [t_{n_1+n_2-4}^{\alpha=0.05} S_{b_{np}-b_p}]$$

Donde:

$$S_{b_{np}-b_p} = \sqrt{\frac{\left(\frac{s_y}{\bar{x}}\right)^2}{s_{xx}} + \frac{\left(\frac{s_y}{\bar{x}_w}\right)^2}{s_{xxw}}}$$

$$s_{xx} = \frac{1}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n_1}}$$

Resultado:

$$IC = [-0.0000560, 0.000198]$$

El intervalo incluye el cero por lo que no se rechaza H_0 . Las pendientes no son significativamente diferentes.

COMPARACION DE ORDENADAS AL ORIGEN

Para determinar si existe diferencia significativa en las ordenadas no ponderada (a_{np}) y ponderada (a_p) se planteó la siguiente hipótesis (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002):

$$H_0: a_{np} - a_p = 0$$

$$IC(\alpha_{np} - \alpha_p) = (a_{np} - a_p) \pm t_{n_1+n_2-4}^{\alpha=0.05} S_{a_{np}-a_p}$$

$$s_{anp-ap} = \sqrt{\frac{\left(\frac{s_y}{x}\right)^2}{n1} + \frac{\left(\frac{s_y}{x_w}\right)^2}{n2} + \frac{(\bar{x}_1)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{n1}} + \frac{(\bar{x}_2)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x_2)^2}{n2}}}$$

$$IC = [-1.628, 1.614]$$

El intervalo incluye el cero por lo que no se rechaza H_0 . Las ordenadas al origen no son significativamente diferentes.

Cuadro XX Pruebas estadísticas para evaluar si existen diferencias significativas en los parámetros de regresión entre los tratamientos homocedástico y heterocedástico

	PARÁMETRO		Hipótesis nula Ho	Estadístico de prueba	Estadístico calculado	Estadístico tablas	Conclusión
	No ponderado (homocedástico)	Ponderado (heterocedástico)					
Errores aleatorios en la dirección de y (s y/x)	0.0112	0.00912	Ho: $s_{x/y} = s_{x/yw}$	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	1.5082	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, No hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en dirección de y
Determinación de la desviación estándar de la pendiente (sb)	0.00006	0.00006	Ho: $s_b = s_{bw}$	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	1	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, No hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio de la pendiente
Desviación estándar de la ordenada al origen (sa)	0.00702	0.01467	Ho: $s_a = s_{aw}$	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	4.367	4.026	$F_{cal} > F_{tab} \therefore$ Se rechaza Ho, existe diferencia significativa en el valor del error aleatorio entre las ordenadas al origen

Cuadro XXI Pruebas estadísticas para evaluar si existen diferencias significativas en las desviaciones estándar de las predicciones (sxo) entre los tratamiento de datos homocedástico y heterocedástico

Predicción (µg de DBSNa)	PARÁMETRO: error global de la muestra de ensayo (sxo)		Hipótesis nula Ho	Estadístico de prueba	Estadístico calculado F _{cal}	Estadístico tablas F _{tab}	Conclusión
	No ponderado (homocedástico) s _{x0} (µg)	Ponderado (heterocedástico) s _{xow} (µg)					
10	3.0945	1.6399	Ho: S _{x0} =S _{xow}	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	3.561	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, No hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo
30	2.9852	1.6417	Ho: S _{x0} =S _{xow}	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	3.306	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo
50	2.9001	2.4906	Ho: S _{x0} =S _{xow}	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	1.356	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo
70	2.8415	1.9520	Ho: S _{x0} =S _{xow}	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	2.119	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo
90	2.8110	2.5386	Ho: S _{x0} =S _{xow}	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	1.226	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo
110	2.8095	3.2242	Ho: S _{x0} =S _{xow}	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	1.317	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo

Cuadro XXI Pruebas estadísticas para evaluar si existen diferencias significativas en las desviaciones estándar de las predicciones (sxo) entre los tratamiento de datos homocedástico y heterocedástico

Xi (µg de DBSNa)	PARÁMETRO: error global de la muestra de ensayo (sxo)		Hipótesis nula Ho	Estadístico de prueba	Estadístico calculado	Estadístico tablas	Conclusión
	No ponderado (homocedástico) s_{x0}	Ponderado (heterocedástico) s_{xow}					
130	2.8372	4.5587	Ho: $S_{x0}=S_{xow}$	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	2.582	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo
150	2.8930	4.1045	Ho: $S_{x0}=S_{xow}$	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	2.018	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo
170	2.9756	4.2217	Ho: $S_{x0}=S_{xow}$	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	2.013	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo
200	3.1446	5.2803	Ho: $S_{x0}=S_{xow}$	$F_{(9,9)}^{\alpha=0.05}$	2.820	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, no hay diferencia significativa en el valor de el error aleatorio en la muestra de ensayo

De los resultados obtenidos, tanto en el cuadro XVIII y XIX se concluye que el impacto en la calidad de las determinaciones al utilizar el método de SAAM asumiendo un comportamiento de datos homocedástico, tal como indica la NOM-201-SSA1-2002, se reflejará básicamente en los resultados de las desviaciones estándar de las predicciones y por lo tanto en la incertidumbre del ensayo. En muestras con concentraciones bajas de DBSNa las incertidumbres estimadas serán necesariamente mayores a las que se obtendrían considerando la heterogeneidad de los datos y en la zona de concentraciones altas serán menores. Sin embargo, de acuerdo a las pruebas estadísticas aplicadas con un nivel de confianza del 95%, las diferencias resultaron no ser significativas.

COMPARACIÓN DE LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Cuadro XXII Límites de detección y cuantificación

Tratamiento	Límite de detección $X_{Bw} = \frac{(y_{Bw} + 3s_{y/xw}) - b_w}{m_w}$	Límite de cuantificación $X_{Bw} = \frac{(y_{Bw} + 3s_{y/xw}) - b_w}{m_w}$
No ponderado	8.02 μg	26.7 μg
Ponderado	6.7 μg	22.2 μg

Para el caso del método de sustancias activas al azul de metileno, se observa que en el tratamiento ponderado ambos límites son menores lo que ofrece la ventaja de aumentar el intervalo de trabajo.

3.6 CONCENTRACIÓN DEL DBSNa EN MUESTRAS REALES

Para evaluar el impacto del comportamiento lineal en la calidad de las determinaciones tomamos el ejemplo de 6 muestras (tres sin efecto matriz y tres de concentración desconocida). En el Cuadro XXIII se enlistan las muestras de análisis y en el cuadro XXIV se resumen los resultados utilizando el modelo ponderado y sin ponderar con el fin de analizar si existen diferencias significativas en los resultados de la concentración y su respectiva desviación estándar.

Cuadro XXIII Muestras de agua analizadas

Mtra de agua		Cantidad de DBSNa (μg)	Concentración (mg/L)
1	SIN EFECTO MATRIZ	10.03	0.025
2		90.86	0.227
3		197.12	0.493
4	CON EFECTO MATRIZ	DESCONOCIDO	-----
5		DESCONOCIDO	-----
6		DESCONOCIDO	-----

Cuadro XXIV Resultados de la cantidad de DBSNa en las muestras de agua con su desviación estándar e intervalos de confianza con $\alpha=0.05$.

Mtra de agua	Abs	Resultado en recta no ponderada					Resultado en recta ponderada				
		(μg)	(mg/L)	s_{x_0} (mg/L)	Lim. Inf ³	Lim. Sup ³	(μg)	(mg/mL)	$s_{x_{ow}}$ (mg/mL)	Lim. Inf ³	Lim. Sup ³
1	0.0437	16.68	0.0417	0.0076	0.0211	0.0623	15.37	0.0384	0.0040	0.0276	0.0492
2	0.3757	95.92	0.2398	0.0070	0.2208	0.2588	95.90	0.2398	0.0062	0.2230	0.2566
3	0.7611	187.90	0.4698	0.0077	0.4489	0.4907	189.37	0.4734	0.0121	0.4406	0.5062
4	0.0843	26.37	0.0659	0.0075	0.0456	0.0862	25.22	0.0630	0.0041	0.0519	0.0741
5	0.4683	118.02	0.2950	0.0070	0.2760	0.3140	118.36	0.2959	0.0093	0.2707	0.3211
6	0.8098	199.52	0.4988	0.0079	0.4774	0.5202	201.19	0.5030	0.0133	0.4670	0.5390

En los resultados de las predicciones de las muestras utilizando la recta no ponderada se puede comprobar que sus desviaciones estándar (s_{x_0}) son muy parecidas entre ellas, independientemente del nivel de concentración, al igual que los intervalos de confianza. Por el contrario, las desviaciones estándar obtenidas con la recta ponderada ($s_{x_{ow}}$) son diferentes en cada muestra y dependen del nivel de concentración en que se encuentren.

³ Límites calculados con un 95% de confianza

Cuadro XXV Comparación de las concentraciones de las muestras de ensayo entre los tratamientos ponderado y no ponderado

Mtra de agua	Abs	Conc. no ponderada (C _P)		Conc. ponderada (C _{NP})		Ho:	s	t _{cal}	t ^{α0.05} ₍₁₈₎	Conclusión
		(mg/L)	S _{xo} (mg/L)	(mg/mL)	S _{xow} (mg/mL)					
1	0.0437	0.0417	0.0076	0.0384	0.0040	C _P =C _{NP}	0.00607	1.22	2.10	En todos los casos t _{cal} < t _{tab} , entonces no se rechaza Ho, las concentraciones en la muestra de ensayo son iguales con ambos métodos de cálculo
2	0.3757	0.2398	0.0070	0.2398	0.0062		0.00661	0.00		
3	0.7611	0.4698	0.0077	0.4734	0.0121		0.0101	0.79		
4	0.0843	0.0659	0.0075	0.0630	0.0041		0.00604	1.07		
5	0.4683	0.2950	0.0070	0.2959	0.0093		0.00823	0.24		
6	0.8098	0.4988	0.0079	0.5030	0.0133		0.0109	0.86		

Estadístico de prueba (Miller & Miller, 2002):

$$t_{cal} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(s^2 * \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) \right)}}$$

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

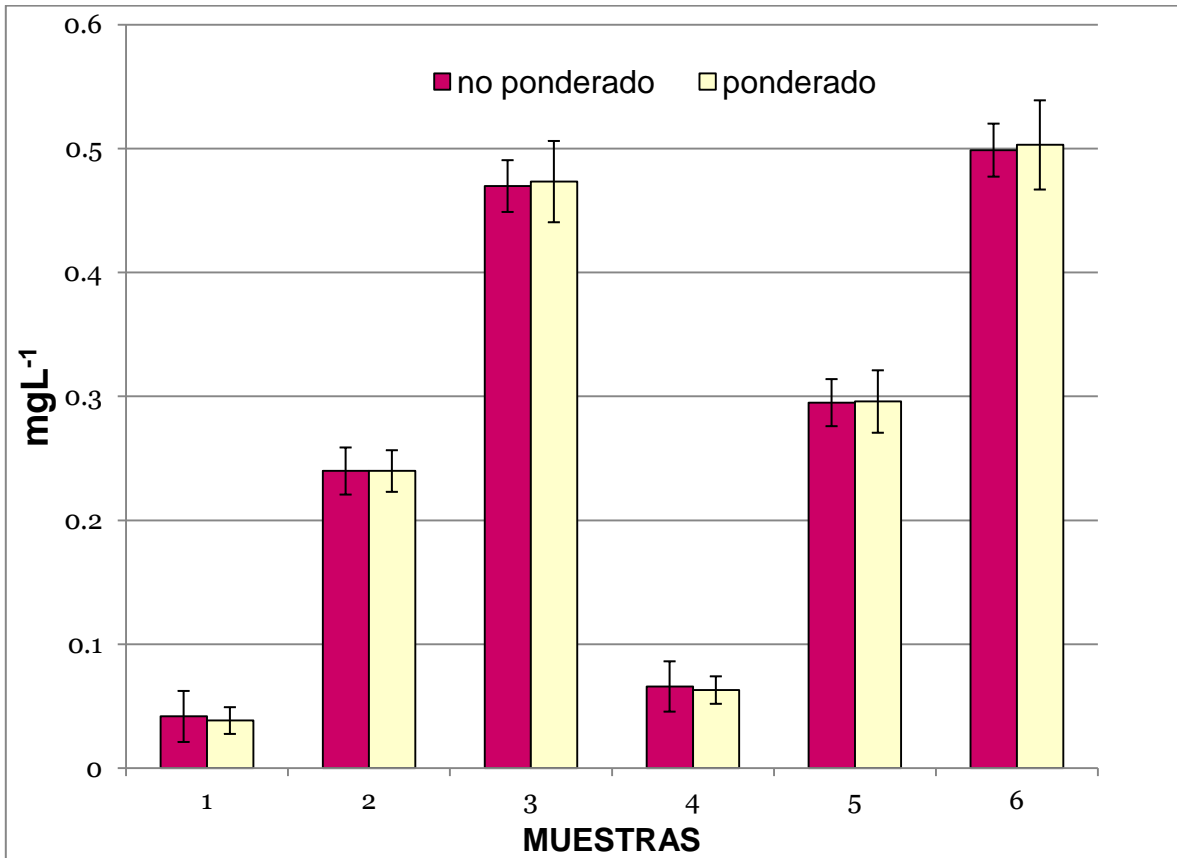
Cuadro XXVI comparación de la desviación estándar de las muestras de ensayo obtenidas con los tratamientos ponderado y no ponderado

Mtra de agua	Abs	Conc. no ponderada (C _P)		Conc. ponderada (C _{NP})		Ho:	F _{cal}	$F_{(9,9)}^{\alpha=0,05}$	Conclusión
		(mg/L)	s _{xo} (mg/L)	(mg/mL)	s _{xow} (mg/mL)				
1	0.0437	0.0417	0.0076	0.0384	0.0040	$s_{x_o} = s_{x_{ow}}$	3.610	4.026	$F_{cal} < F_{tab} \therefore$ No se rechaza Ho, No hay diferencia significativa en el valor de la desviación estándar en la muestra de ensayo con ambos métodos de cálculo
2	0.3757	0.2398	0.0070	0.2398	0.0062		1.275		
3	0.7611	0.4698	0.0077	0.4734	0.0121		2.469		
4	0.0843	0.0659	0.0075	0.0630	0.0041		3.346		
5	0.4683	0.2950	0.0070	0.2959	0.0093		1.765		
6	0.8098	0.4988	0.0079	0.5030	0.0133		2.834		

En el Cuadro XXV se resumieron los resultados de la comparación de las concentraciones de las muestras de ensayo obtenidas en la recta no ponderada y la ponderada. En todos los casos las medias de las concentraciones fueron estadísticamente iguales, es decir, no presentaron diferencias significativas. Esto concuerda con la conclusión de las pruebas de hipótesis para la comparación de la pendiente y ordenada al origen entre ambos tratamientos, donde resultó que no eran significativamente diferentes, y por lo tanto, las ecuaciones de las rectas se pueden considerar iguales.

En el Cuadro XXVI se muestra la comparación entre las desviaciones estándar de las concentraciones de las muestras de ensayo con el tratamiento ponderado y sin ponderar para comprobar si existen diferencias significativas o si pueden considerarse iguales, con un 95 % de confianza. Pese a que entre los datos de desviaciones estándar se observan diferencias entre ellos de más del 50 %, los resultados de la prueba F indican que la diferencia no es significativa.

En la gráfica 10 se puede apreciar visualmente las diferencias entre la concentración y el intervalo de confianza de cada una de las muestras analizadas, aplicando con cada método. El color vino representa los resultados obtenidos con el método no ponderado (homocedástico) y el color beige con el ponderados (heterocedásticos). En general, la altura de las barras es casi la misma en todas las muestras e incluso no es posible observar diferencia en la M2, lo cual indica que las medias de las concentraciones son prácticamente iguales en ambos tratamientos. Sin embargo, las barras de los límites de confianza muestran tamaños diferente. En las muestras M1 y M4 (cuya concentración se ubica en los niveles bajos de la curva) el tratamiento no ponderado (homocedástico) da intervalos mayores y en las M3 y M6 (cuya concentración se ubica en los niveles altos de la curva) menores. En las muestras M2 y M5 (cuya concentración se ubica en los niveles medios de la curva) las barras de los límites muestran diferencias menores entre ambos métodos, lo cual sugiere que en esa zona es donde se presentarían menores riesgos de cometer errores al no considerar el comportamiento heterocedástico del método SAAM.



Gráfica 10 Comparación de intervalos de confianza para muestras con tratamiento de datos homocedástico (color negro) con los obtenidos considerando datos heterocedásticos (color rosa)

En la NOM-127-SSA-1994 y la NOM-201-SSA-2002, se señala un límite máximo permitido de sustancias activas al azul de metileno de 0.5 mg/L (Secretaría de Salud, 1994; Secretaría de Salud, 1994). Siguiendo con la gráfica 10, en la muestra 6 se ve que en el tratamiento de datos homocedástico no se supera el límite especificado de 5 mg/L pero con el tratamiento heterocedástico si. En este sentido cabe la reflexión de que más allá de la conveniencia o no de cualquier resultado, lo más importante es contar con el dato que de la mayor confiabilidad posible a nuestras determinaciones.

4 CONCLUSIONES

Los datos del método de sustancias activas al azul de metileno, para las condiciones descritas y en el intervalo de concentraciones señalado, no se adecuan al modelo de regresión por mínimos cuadrados. Cumplen con la condición de pertenecer a una distribución normal, hecho que se comprobó de forma visual mediante la elaboración de la gráfica de normalidad y, de forma más robusta, aplicando la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov, pero no cumplen con el criterio de homocedasticidad. La homogeneidad de las varianzas es un supuesto básico para la aplicación del modelo, sin embargo, al someter las varianzas de los diferentes niveles de concentración a la prueba de Bartlett se concluyó que eran diferentes.

Pero a pesar de que las varianzas mostraron un comportamiento heterocedástico, también se demostró que, para este caso, el modelo de regresión ponderado proporciona resultados equivalentes a los obtenidos por el método no ponderado de mínimos cuadrados. Al someter los datos de seis muestras de ensayo a ambos modelos de regresión y comparar las concentraciones y varianzas obtenidas en cada caso, utilizando prueba de t y F, se encontró que no existen diferencias significativas entre ellas y, por lo tanto, no hay un impacto en la calidad de los resultados al utilizar cualquiera de los dos modelos.

Para los resultados de las concentraciones de las muestras de ensayo era de esperarse que por ambos métodos se obtuvieran datos equivalentes ya que al comparar las pendientes y ordenadas al origen se confirmó que no había diferencia significativa, lo que significa que las ecuaciones lineales, en ambos casos, son equivalentes y, por tanto, las interpolaciones darán resultados estadísticamente iguales sin importar el modelo que se utilice.

El caso de las varianzas es diferente ya que debe considerarse que existe una tendencia en la falta de homogeneidad de las mismas. Como se observa en la gráfica 10, al aplicar el método de regresión ponderado siempre se obtendrán varianzas menores en los niveles de concentración bajos y, por el contrario, en los niveles de concentración altos, mayores. Aunque la diferencia no sea significativa, tal como quedó demostrado con las pruebas de F, los efectos se verán reflejados en las estimaciones de incertidumbre de las muestras analizadas. En el centro de la curva de calibración es donde existe menor diferencia entre las

varianzas que se obtienen por cada método, lo cual sugiere la conveniencia de trabajar en esa zona para evitar diferencias ocasionadas por trabajar con un modelo u otro. Lo cierto es que tratándose de un método aplicado al análisis de agua, en donde se requiere grandes cantidades de muestra, es difícil lograr que la señal del equipo (absorbancia) quede exactamente en el centro de la curva de calibración pues pocas veces se sabe con certeza la magnitud de la concentración del analito de interés.

Demostrado que el tratamiento no ponderado y el ponderado dan resultados equivalentes y que el tratamiento ponderado tiene el inconveniente de ser más complicado en su ejecución pero que refleja más fielmente el comportamiento de las varianzas, queda a criterio del Químico decidirse por la opción que le permita cumplir con su misión de proporcionar resultados confiables que se conviertan en la mejor materia prima para la toma de decisiones.

Por lo tanto se cumplen las hipótesis planteadas:

- a) Los datos de la curva de calibración del método de sustancias activas al azul de metileno tiene un comportamiento heterocedástico.
- b) No existe diferencia significativa al tratar los datos considerando un comportamiento homocedástico que considerándolo heterocedástico.
- c) No existe un impacto en la calidad de los resultados al considerar los datos como homocedásticos.

RECOMENDACIONES

La reducción del aforo final (de 100 a 50 mL) ofrece la ventaja de aumentar al doble la sensibilidad del método, lo que significa que a pequeños incrementos de x la respuesta en y será más apreciable. Una pendiente mayor, además, contribuye a disminuir los límites de detección y cuantificación dando lugar a un aumento del área de trabajo en los niveles inferiores de concentración, posibilitando la detección de analitos a en menores cantidades con un aceptable nivel de confianza.

Se recomienda la modificación de ajustar el instrumento a cero de absorbancia utilizando cloroformo, tal como se indica en el Standard Method for examination of water and wastewater, y no con el blanco de las soluciones patrón, señalado en el procedimiento de la NOM-201-SSA1-2002 numeral 9.12.6.4.2. (Secretaría de Salud, 2002). Este cambio permitirá tratar al blanco como un punto más dentro de la recta de calibración sin tener que restar su absorbancia a los otros niveles, evitando así que su error se propague. Además hace posible obtener su desviación estándar.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (21 ed.). Washington: American Public Health Association (p.63-73).
- Cantarero-Malagón, A. S. (2010). *Comportamiento del jabón en una parcela agrícola. Tesis Doctoral no publicada*. Granada, España: Universidad de Granada (p.15-58).
- Comisión de Validación de Métodos Analíticos. (2002). *Guía de validación de Métodos Analíticos*. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México,A.C. (p.25-26, 32-38, 61, 101-103).
- Departamento de asuntos económicos y sociales de Naciones Unidas (ONU-DAES). (s.f.). *Naciones Unidas*. Recuperado el 10 de noviembre de 2012, de <http://www.un.org/spanish/waterforlifedecade/quality.shtml>
- Douglas, M. C. (2005). *Introducción al análisis de regresión lineal*. México: Compañía Editorial Continental S. A. (p. 1-41, 117-148).
- EURACHEM. (1998). *The fitness for purpose of Analytical Methods a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topic*.
- Gueiteras, J., Rubio, J., & Forondona, G. (2003). Curso experimental en Química Analítica. España: Síntesis (p. 20-47, 98-110).
- Harris, D. C. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo* (2a ed.). Barcelona, España: Reverté S.A. (p. 92-102, 499-5149).
- INEGI. (2012). La industria Química en México. *Serie estadísticas sectoriales*, 165. México, México.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2008). *INEGI*. Obtenido de Banco de información económica: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie>
- Jiménez-Islas, D., Medina-Moreno, S. A., & Gracida-Rodríguez, J. N. (2010). Revisión: Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65-84.
- Kim, E. J., & Shah, D. O. (2002). Cloud point phenomenon in amphiphilic drug solutions. *Langmuir* 18, 10105-10108.

- Kim, E. J., & Shah, D. O. (2003). A cloud point study on the micellar growth of an amphiphilic drug in the presence of alcohol and ionic surfactant. *J. Phys. Chem.B.107*, 8689-8693.
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Kim, B. H., Ahn, C. H., & Yoo, B. D. (2006). Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biot.*70, 391-396.
- Lechuga Villena, M. (2005). *Biodegradación y toxicidad de tensioactivos comerciales*. Tesis Doctoral no publicada. Granada: Universidad de Granada (p. 21-55).
- Lewis, M. A. (1992). The effects of mixtures and other environmental modifying factors on the toxicities of surfactants to freshwater and marine life. *Water Research*, 26(8), 1013-1023.
- Llenado, R. A., & Neubecker, T. A. (1983). Surfactants. *Analytical Chemistry*, 55, 93R-102R.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. España: Pearson Educación, S.A. (p.43-62, 67-71, 111-142, 183-185).
- Mongay Fernández, C. (2005). *Quimiometría*. Valencia: Universitat de Valencia (p. 56-64, 100-102, 130-133, 281-293).
- Morrison, R. T., & Boyd, R. N. (1987). *Química Orgánica*. México: Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. de C.V. (p. 33, 1041-1042).
- Nimer-Leite, M. (2007). *Estudio del comportamiento ambiental del sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) en una parcela agrícola de la Vega de Granada*. Tesis Doctoral no publicada. Granada: Universidad de Granada (p.9-29, 31-51).
- Organización Mundial de la Salud. (15 de mayo de 2013). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/index.html
- Ramírez Corrales, J. M. (junio de 2006). Detergentes orgánicos sintéticos y ambiente. *Hidrogénesis*, 22-27.
- Ramis Ramos, G., & García Álvares-Coque, M. C. (2001). *Quimiometría*. España: Síntesis, S.A. (p. 56-58, 61-65, 67-70, 70-72, 82-99, 121-130).
- Real Academia Española. (s.f.). *Real Academia Española*. Recuperado el 3 de enero de 2013, de <http://www.rae.es/rae.html>

- Rosen, M. J., Lin, F., Zhu, Y.-P., & Morrall, S. W. (1999). *Journal of Surfactants and Detergents*, 2(3), 343-347.
- Salager, J. L. (2002). Surfactantes en solución tipos y uso. *Cuaderno FIRP S300-A*. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes.
- Secretaría de Economía. (s.f.). *Secretaría de economía*. Recuperado el 10 de noviembre de 2012, de <http://www.economia.gob.mx>
- Secretaría de Salud. (1994). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo. *Diario Oficial de la Federación*.
- Secretaria de Salud. (18 de octubre de 2002). NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-201-SSA1-2002 "Productos y servicios, agua y hielo para consumo humano, envasado y a granel. Especificaciones Sanitarias". *Diario Oficial de la Federación*.
- SEMARNAT. (11 de noviembre de 2012). *SEMARNAT.gob.mx*. Recuperado el 11 de noviembre de 2012, de agua:
http://www.semarnat.gob.mx/informacionambiental/Documents/sniarn/pdf/yelmedioambiente/version_2008/4_agua_vo8.pdf
- Timar-Balazsy, A., & Eastop, D. (1998). *Chemical principles of textile conservation*. London: Butter worth-Heinemann.
- Uc-Peraza, R. G. (2012). Determinación de la concentración letal media (CL50) de cuatro detergentes domésticos biodegradables en *Leoneis culveri*. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 2(28), 137-144.
- Wayne, D. W. (1999). *Bioestadística Base para el análisis de las ciencias de la salud*. México: Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores (p. 453-498, 723-728).

Anexo A

CÁLCULOS CONSIDERANDO COMPORTAMIENTO HOMOCEDÁSTICOS

En el Cuadro Anexo A.1 se resumen los cálculos necesarios para calcular el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen de la curva de calibración promedio (Miller & Miller, 2002).

Cuadro Anexo A.1. Resumen de cálculos

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
	10	0.029	-91	8281	-0.368	0.1351	33.4518
	30	0.100	-71	5041	-0.297	0.0880	21.0659
	50	0.171	-51	2601	-0.226	0.0510	11.5159
	70	0.265	-31	961	-0.131	0.0173	4.0746
	90	0.360	-11	121	-0.037	0.0014	0.4078
	110	0.431	9	81	0.034	0.0012	0.3059
	130	0.502	29	841	0.105	0.0110	3.0462
	150	0.595	49	2401	0.198	0.0392	9.7038
	170	0.688	69	4761	0.291	0.0847	20.0812
	200	0.827	99	9801	0.431	0.1854	42.6220
Σ	1010	3.967	0	34890	0.000	0.6143	146.2749
\bar{x}	<u>101</u>						
\bar{y}		<u>0.397</u>					

Coeficiente de correlación (r)

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

$$r = 0.9991$$

Pendiente (b)

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

$$b = 0.00419$$

Ordenada al origen (a)

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

$$a = -0.02619$$

En la Cuadro Anexo A.2 se resumen los cálculos necesarios para determinación de los principales errores aleatorios en las curvas de calibración y en el Cuadro Anexo A.3 se presenta el resumen de cálculos de los límites de confianza para los valores de x .

Cuadro Anexo A.2. Resumen de cálculos: errores aleatorios

x_i	x_i^2	y_i	\hat{y}_i	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$	
10	100	0.029	0.0152	0.0139	0.000194	
30	900	0.100	0.0991	0.0010	0.000001	
50	2500	0.171	0.1829	-0.0120	0.000144	
70	4900	0.265	0.2668	-0.0015	0.000002	
90	8100	0.360	0.3506	0.0090	0.000082	
110	12100	0.431	0.4344	-0.0037	0.000014	
130	16900	0.502	0.5183	-0.0165	0.000274	
150	22500	0.595	0.6021	-0.0074	0.000055	
170	28900	0.688	0.6860	0.0018	0.000003	
200	40000	0.827	0.8118	0.0155	0.000239	
Σ	1010	136900	3.96717683	3.9672	0.0000	0.0010

Errores aleatorios en la dirección de y ($s_{y/x}$)

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad s_{y/x} = 0.0112$$

Determinación de la desviación estándar de la pendiente (s_b)

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad s_b = 0.00006$$

Desviación estándar de la ordenada al origen (s_a)

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad s_a = 0.000992$$

Cálculo del error global de la muestra de ensayo (s_{x_0})

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad s_{x_0} = \frac{0.01732}{0.00414} \sqrt{1 + \frac{1}{5} + \frac{(y_0 - 0.3716)^2}{0.00414^2 * 21520}}$$

Cuadro Anexo A.3. Resumen de cálculos: límites de confianza

x_0	y_0	$y_0 - \bar{y}$	$(y_0 - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})^2$	s_{x0}	$x_0 + t_{(n-2)*s_{x0}}$	$x_0 - t_{(n-2)*s_{x0}}$
10	0.0152	-0.3815	0.1456	8281	3.0946	17.1485	2.8515
30	0.0991	-0.2977	0.0886	5041	2.9852	36.8959	23.1041
50	0.1829	-0.2138	0.0457	2601	2.9001	56.6993	43.3007
70	0.2668	-0.1300	0.0169	961	2.8415	76.5639	63.4361
90	0.3506	-0.0461	0.0021	121	2.8110	96.4934	83.5066
110	0.4344	0.0377	0.0014	81	2.8095	116.4901	103.5099
130	0.5183	0.1216	0.0148	841	2.8372	136.5539	123.4461
150	0.6021	0.2054	0.0422	2401	2.8930	156.6829	143.3171
170	0.6860	0.2893	0.0837	4761	2.9756	176.8736	163.1264
200	0.8118	0.4151	0.1723	9801	3.1446	207.2640	192.7360
		Σ	0.6133	34890			

Para $n=10$, $t_{n-2}^{95} = 2.31$

Anexo B

CÁLCULOS CONSIDERANDO DATOS HETEROCEDÁSTICOS (RECTAS PONDERADAS)

En el Cuadro Anexo B.1 se resumen los cálculos necesarios para calcular el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen de la curva de calibración promedio (Miller & Miller, 2002) para la regresión ponderada.

Cuadro Anexo B.1. Resumen de cálculos: regresión ponderada

x_i	y_i	s_i	$\frac{1}{s_i^2}$	w_i	$w_i x_i$	$w_i y_i$	$w_i x_i y_i$	$w_i x_i^2$
10	0.0291	0.014	5102.04	2.74	27.41	0.08	0.80	274.07
30	0.1000	0.015	4444.44	2.39	71.62	0.24	7.16	2148.72
50	0.1709	0.025	1600.00	0.86	42.97	0.15	7.34	2148.72
70	0.2653	0.019	2770.08	1.49	104.16	0.39	27.63	7291.37
90	0.3596	0.025	1600.00	0.86	77.35	0.31	27.82	6961.86
110	0.4307	0.032	976.56	0.52	57.70	0.23	24.85	6347.54
130	0.5018	0.046	472.59	0.25	33.00	0.13	16.56	4290.33
150	0.5948	0.040	625.00	0.34	50.36	0.20	29.95	7554.10
170	0.6877	0.040	625.00	0.34	57.08	0.23	39.25	9702.82
200	0.8272	0.050	400.00	0.21	42.97	0.18	35.55	8594.89
Σ			18615.72	10.00	564.64	2.13	216.92	55314.42

Ponderación (w_i)

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\frac{\sum s_i^{-2}}{n}}$$

Pendiente ponderada (b_w)

$$b_w = \frac{\sum w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad 0.004123$$

Ordenada al origen ponderada (a_w)

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w \quad -0.01969$$

Centro de gravedad ponderado (\bar{x}_w)

$$\bar{x}_w = \frac{\sum w_i x_i}{n} \quad \bar{x}_w = 56.4640$$

$$\bar{y}_w = \frac{\sum w_i y_i}{n} \quad \bar{y}_w = 0.2131$$

En la Cuadro Anexo B.2 se resumen los cálculos necesarios para determinación de los principales errores aleatorios ponderados en las curvas de calibración y en el Cuadro Anexo B.3 se presenta el resumen de cálculos de la desviación estándar de una predicción sobre la concentración ($s_{x0_{0w}}$)

Cuadro Anexo B.2. Resumen de cálculos: errores aleatorios ponderados

x_i	y_i	\hat{y}_i	$(y_i - \hat{y}_i)$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$	w_i	$w_i(y_i - \hat{y}_i)^2$
10	0.029	0.022	0.008	0.0000572	2.74	0.000157
30	0.100	0.104	-0.004	0.0000159	2.39	0.000038
50	0.171	0.186	-0.016	0.0002415	0.86	0.000208
70	0.265	0.269	-0.004	0.0000129	1.49	0.000019
90	0.360	0.351	0.008	0.0000681	0.86	0.000059
110	0.431	0.434	-0.003	0.0000096	0.52	0.000005
130	0.502	0.516	-0.014	0.0002089	0.25	0.000053
150	0.595	0.599	-0.004	0.0000152	0.34	0.000005
170	0.688	0.681	0.007	0.0000428	0.34	0.000014
200	0.827	0.805	0.022	0.0005001	0.21	0.000107
Σ		3.967	0.000	0.001	10.000	0.001

Errores aleatorios en la dirección de y $s_{(y/x)w}$

$$s_{(y/x)w} = \sqrt{\frac{\sum w_i(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

$$s_{(y/x)w} = 0.009118$$

Determinación de la desviación estándar de la pendiente (s_{bw})

$$s_{bw} = \sqrt{\frac{s_{x/y}^2 w}{\sum w_i x_i^2 - \sum w_i \bar{x}_w^2}}$$

$$s_{bw} = 0.00005957$$

Desviación estándar de la ordenada al origen (s_{aw})

$$s_{aw} = \sqrt{\frac{s_{x/y}^2 w}{\sum w_i * (\sum w_i * x_i^2 - \sum w_i * \bar{x}_w^2)}}$$

$$s_{aw} = 0.014671337$$

Cuadro Anexo B.3. Resumen de cálculos: desviación estándar de una predicción sobre la concentración (s_{x_0w})

y_0	x_i	$(y_0 - \bar{y}_w)$	$(y_0 - \bar{y}_w)^2$	x_i^2	w_i	$w_i x_i^2$	S_{x_0w}
0.029	11.84	-0.1840	0.0339	140.07	2.74	383.8893769	1.64
0.100	29.03	-0.1131	0.0128	842.90	2.39	2012.40	1.64
0.171	46.23	-0.0422	0.0018	2137.26	0.86	1836.95	2.49
0.265	69.13	0.0522	0.0027	4778.73	1.49	7110.92	1.95
0.360	92.00	0.1465	0.0215	8464.37	0.86	7275.03	2.54
0.431	109.25	0.2176	0.0474	11935.18	0.52	6261.08	3.22
0.502	126.49	0.2887	0.0834	16000.84	0.25	4062.07	4.56
0.595	149.05	0.3817	0.1457	22216.73	0.34	7458.99	4.10
0.688	171.59	0.4746	0.2253	29442.04	0.34	9884.81	4.22
0.827	205.42	0.6141	0.3771	42199.16	0.21	9067.42	5.28
Σ		1.8362	0.9514	138157.29	10.00	55353.56	

En el Cuadro Anexo B.4 se presenta el resumen de cálculos de los límites de confianza ponderados.

Cuadro Anexo B.4. Resumen de cálculos: límites de confianza ponderados

y_0	x_0	S_{x_0}	$x_0 + t_{(n-2)*S_{x_0}}$	$x_0 - t_{(n-2)*S_{x_0}}$
0.029	11.84	1.64	15.62	8.05
0.100	29.03	1.64	32.83	25.24
0.171	46.23	2.49	51.98	40.48
0.265	69.13	1.95	73.64	64.62
0.360	92.00	2.54	97.87	86.14
0.431	109.25	3.22	116.70	101.80
0.502	126.49	4.56	137.02	115.96
0.595	149.05	4.10	158.53	139.57
0.688	171.59	4.22	181.34	161.83
0.827	205.42	5.28	217.62	193.23

Para $n=10$ y $t_{n-2}^{95} = 2.31$

ANEXO C

PORCIENTO DE RECOBRO

Para verificar la eficiencia del método se calculo el % de recuperación con muestras adicionadas en tres niveles de la curva (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

$$\text{Recuperación \%} = 100 * \frac{C2}{C1}$$

Donde:

C1= Cantidad adicionada

C2=Cantidad recuperada

Cuadro Anexo C.1. % Recuperado

nivel	Cantidad adicionada (µg de DBSNa)	Cantidad recuperada (µg de DBSNa)		% Recuperado	
		No ponderada	ponderada	No ponderada	ponderada
1	10.1	13.8	12.3	136.6	121.8
	9.93	11.1	9.6	111.8	96.7
	10.03	16.6	14.6	165.6	145.6
2	90.86	95.7	94.1	105.3	103.6
	89.35	87.1	85.6	97.5	95.8
	87.55	93.9	92.3	107.3	105.4
3	201.92	196.2	194.7	97.2	96.4
	198.56	205.7	204.1	103.6	102.8
	197.12	187.5	185.9	95.1	94.3

Cuadro Anexo C.2. % Recuperado (CV)

nivel	Cantidad adicionada (μg de DBSNa)	% Recuperado		CV	
		No ponderada	ponderada	No ponderada	ponderada
1	10.1	136.6	121.8	19.5	20.1
	9.93	111.8	96.7		
	10.03	165.6	145.6		
2	90.86	105.3	13.6	5.0	5.0
	89.35	97.5	95.8		
	87.55	107.3	105.4		
3	201.92	97.2	96.4	4.5	4.5
	198.56	103.6	102.8		
	197.12	95.1	94.3		
CV total =				9.7	9,9