

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
QUÍMICA INDUSTRIAL



**“OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO AZUL DE
FOSFOMOLIBDATO DE AMONIO PARA LA DETERMINACIÓN
DE (FÓSFORO) POR ESPECTROFOTOMETRÍA
ULTRAVIOLETA-VISIBLE”**

**TRABAJO DE APLICACIÓN DE EXAMEN DE GRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO ACADÉMICO DE LICENCIATURA EN
QUÍMICA INDUSTRIAL**

Postulante: Cristian Adalid Murillo Poma

La Paz - Bolivia

2016

ÍNDICE

DEDICATORÍA	1
AGRADECIMIENTOS	2
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	3
1. Introducción	4
1.1. Antecedentes	5
1.2. Planteamiento de problema	6
1.3. Justificación	6
1.4. Objetivos	
1.4.1. objetivo general	8
1.4.2. Objetivo específico	8
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO	9
2. Marco teórico	10
2.1. El fosforo en el agua	10
2.1.2. Principales usos del fosforo	10
2.1.3. Contaminación de aguas residuales a consecuencia del fosforo y Nitrógeno	11
2.1.4. Norma boliviana NB 512 agua potable requisitos	12
2.1.5. Reglamento en materia de contaminación hídrica ley boliviana del medio Ambiente Nº 1333	14
2.2. Métodos alternativos para la determinación de fósforo en aguas naturales y Naturales.	20
2.2.1. Determinación de fosfatos por colorimetría (método amarillo del ácido Vanadomolibdofósforico)	20
2.2.2. Método colorimétrico del fosforo total	20
2.3. Método Actual para la determinación de fósforo en aguas naturales y Residuales	21
2.3.1. Método colorimétrico con Cloruro Estañoso	21
2.3.2. Preparación y conservación de las muestras	22
2.4. Método propuesto para la determinación de fósforo en aguas Naturales y Residuales	23
2.4.1. Optimización del método analítico azul de Fosfomolibdato de Amonio para la determinación de (fósforo) por Espectrofotometría ultravioleta-visible”	23
2.4.2. Preparación de la solución reductora	24
2.4.3. Preparación del patrón KH_2PO_4	24
2.4.4. Preparación de la curva de calibración	25

2.4.5. Preparación de la muestra	27
2.4.5.1. Ubicación de muestreo	27
2.4.5.2. Tratamiento de la muestra	29
2.5. Fundamentos de espectrofotometría ultra violeta-visible	30
2.5.1. Espectrofotometría	30
2.5.2. La región UV	32
2.5.3. La región Visible	32
2.5.4. Transmitancia y absorbancia	33
2.5.5. La transmitancia (T)	33
2.5.6. La Absorbancia (A)	33
2.5.7. Ley de Lambert-Beer	34
2.5.8. Instrumentación para la medición de absorbancia de la luz visible y Ultravioleta: Espectrofotómetro UV-Visible	34
2.5.9. Obtención de un espectro de absorción	36
2.5.10. Curva de calibrado	37
2.6. Parámetros analíticos de calidad para la optimización del método (Fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico)	37
2.6.1. Exactitud	37
2.6.2. Linealidad	38
2.6.2.1. Procedimiento para determinar la linealidad	38
2.6.2.2. Evaluación de la linealidad	38
2.6.3. Sensibilidad	39
2.6.3.1. Límite de detección	39
2.6.3.2. Límite de cuantificación	40
CAPÍTULO 3 METODOLOGIA DE TRABAJO	41
3. metodología de trabajo	42
3.1. Parámetros analíticos de calidad para la optimización del método de fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico	42
3.1.1. Exactitud	42
3.1.2. Linealidad	43
3.1.3. Límite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LC)	45
CAPÍTULO 4 ANALISIS Y RESULTADOS	47
4. Análisis y resultados	48
4.1. Materiales y equipos	48
4.2. Datos obtenidos para el análisis de la muestra de agua residual por el Método Fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico	49
4.2.1. Curva de calibración	49
4.3. Determinación de la exactitud del método Fosfomolibdato de amonio con Ácido ascórbico	51

4.3.1. Datos obtenidos en el test para la obtención de la exactitud del método	51
4.4. Determinación de la linealidad del método fosfomolibdato de amonio con Ácido ascórbico	58
4.4.1. Datos para la curva de calibración de mg fósforo P/L	58
4.4.2. Linealidad del método	60
4.4.3. Análisis de la varianza: ANOVA	62
4.5. Límite de cuantificación del método fosfomolibdato de amonio con Ácido ascórbico	63
4.6. Límite de detección del método fosfomolibdato de amonio con Ácido ascórbico	66
4.7. Intervalo (rango)	68
CAPÍTULO 5 RESULTADOS	69
5. Resultados	70
5.1. Resultados obtenidos del método propuestos	70
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES	73
6. Conclusiones	74
CAPÍTULO 7 ANEXOS	75
Tablas utilizadas para el cálculo de los parámetros establecidos	85
Tabla t-student	85
Tabla de G de Cochran	86
Bibliografía	87

Dedicado a mi familia
Especialmente a mi mami que siempre me
Oriento y ayudo incondicionalmente
Por todo su apoyo brindado para ser un profesional.

Mis Agradecimientos para:

Mis padres y mis hermanos

Por su dedicación.

Lic. Edmundo Ovando, por su invaluable
Ayuda en la idea y elaboración de este trabajo.

Lic. Osvaldo Valenzuela, por sus sugerencias e
Ideas en la culminación de este trabajo de aplicación.

A mi prometida Zenia, por sus consejos y apoyo incondicional.

Finalmente a Dios por ser el espíritu que siempre me guía

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Por definición la optimización es una rama de las matemáticas que consistente en el uso de modelos estadísticos y algoritmos con objeto de realizar un proceso de toma de decisiones, esto con la finalidad de mejorar (u Optimizar) su funcionamiento. La optimización examina las características de desempeño de un método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse del método, así como identificar los factores que pueden influir en el cambio de dichos parámetros y limitaciones; permite demostrar que el método es adecuado para el propósito, esto es, para resolver un problema analítico particular¹. En análisis químico cuantitativo, muchas decisiones importantes se basan en los resultados obtenidos por un laboratorio; por lo que es necesario, disponer de un indicador sobre la calidad de tales resultados. Hoy más que nunca se pretende que los químicos analíticos estén en condiciones de demostrar la calidad de sus resultados, indicando el grado de confiabilidad en que cada uno de estos parámetros demuestra su idoneidad para la finalidad prevista. Esto supone, que se indique en qué medida se prevé que tal resultado concordará con otros, independientemente del método aplicado. La optimización analítica de los métodos de análisis es uno de los elementos básicos en sistemas de calidad. La validación trata de disminuir o controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato obtenido, a través de la realización de un trabajo analítico dentro de unos parámetros definidos generando una mayor fiabilidad y aceptación de los datos, al estar en proporción con la calidad del proceso de obtención de los mismos. Entre los parámetros analíticos más utilizados se encuentran: exactitud, sesgo, precisión, linealidad, repetitividad, límite de detección y de cuantificación, sensibilidad De tal manera que el objetivo del presente trabajo fue optimizar un método para la determinación espectrofotométrica de fosfatos y demostrar la aplicabilidad del método en aguas residuales. Para la determinación de fósforo mediante espectrofotometría UV-visible, se empleó el método del azul de molibdeno con ácido ascórbico, cuyo fundamento consiste en adicionar molibdato de amonio en presencia de fosfatos y este compuesto se reduce a un complejo azul soluble (fosfomolibdato de amonio)².

¹www.significados.com/optimizar/

²Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud www.biotecnia.uson.mx

1.1. ANTECEDENTES

Existen diversos tipos de análisis para la determinación de fosfatos en aguas de las cuales las más sobresalientes son:

- ✓ Método colorimétrico de cloruro estañoso
- ✓ Método ácido vanadomolibdofosfórico

De las cuales método vanadomolibdofosfórico es el más utilizado mientras que el método colorimétrico con cloruro estañoso presenta dificultades.

Actualmente en Bolivia cuenta con una norma la ISO 512, que nos da los parámetros adecuados y seguimientos que se le debe dar a un determinado análisis de aguas³, pero lastimosamente no se cuenta con una norma específica para la determinación de fosfatos en aguas, que nos guie en el procedimiento para el análisis, desde el tratamiento de las muestras y preparación de patrones; lo cual se optó por normas internacionales Venezolanas y Mexicanas.

Cuadro 3.1. Composición típica del agua residual doméstica

Componente	Unidad	Concentración		
		Fuerte	Media	Diluida
Sólidos totales	mg/l	1.200	720	350
Sólidos disueltos totales	mg/l	850	500	250
Sólidos disueltos fijos	mg/l	525	300	145
Sólidos disueltos volátiles	mg/l	325	200	105
Sólidos suspendidos	mg/l	350	220	100
Sólidos suspendidos fijos	mg/l	75	55	20
Sólidos suspendidos volátiles	mg/l	275	165	80
Sólidos sedimentables	mg/l	20	10	5
Demanda bioquímica de oxígeno DBO ₅	mg/l	400	220	110
Carbono orgánico total, COT	mg/l	290	160	80
Demanda química de oxígeno, DQO	mg/l	1000	500	250
Nitrógeno total	mg/l	85	40	20
Nitrógeno orgánico	mg/l	35	15	8
Nitrógeno amoniacal	mg/l	50	25	12
Nitritos	mg/l	0	0	0
Nitratos	mg/l	0	0	0
Fósforo total	mg/l	15	8	4
Fósforo orgánico	mg/l	5	3	1
Fósforo inorgánico	mg/l	10	5	3
Cloruros*	mg/l	100	50	30
Sulfatos*	mg/l	50	30	20
Alcalinidad en CaCO ₃	mg/l	200	100	50
Aceites y grasas	mg/l	150	100	50
Coliformes totales	NMP/100ml	10 ⁷ a 10 ⁹	10 ⁷ a 10 ⁸	10 ⁶ a 10 ⁷
Compuestos orgánicos volátiles	μ/l	>400	100 a 400	<100

*Los valores pueden aumentar por la cantidad presente de aguas de abastecimiento.
Fuente: Mtealf y Eddy (1991).

³/2015/07/NB-512-Reglamento-Control-de-Calidad-del-Agua

Tabla 1.1. Parámetros permisibles para agua residual domésticas.

En el año 2011 se realizó un estudio de caracterización de las aguas residuales afluentes, al sistema de tratamiento de Puchukollo lanzando los siguientes resultados de los cuales definieron valores permisibles de diferentes parámetros⁴ en la tabla 1.1.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se vio como problema en un método existente, el método colorimétrico de molibdato de amonio con cloruro estañoso; la dificultad que presenta este método es la “inestabilidad” con las soluciones preparadas, tanto con el patrón como con la muestra, lo que nos da un tiempo muy corto de (10 -15) minutos, para su respectiva lectura en el espectrofotómetro. El problema radica a consecuencia del tipo de reductor en este caso el cloruro estañoso, mismo que es inestable en su forma acuosa y su vida útil es muy corta⁵.

Por este problema el analista debe realizar las lecturas inmediatamente, sino obtendrá concentraciones de fósforo que son incoherentes, por tal motivo se buscó la manera de optimizar este método con la sustitución del reductor, misma que será el ácido ascórbico que resulta ser más estable a comparación del anterior y reduciendo las cantidades de reactivo para el análisis.

La eutrofización es un problema que se ve en un río, un lago o un embalse sufren a consecuencia de la presencia excesiva de fósforo, el problema está en que si hay un exceso de nutrientes (fósforo) crecen en abundancia las plantas acuáticas y otros organismos. Lo que más tarde estos mueren y se pudren y llenan el agua de malos olores dando un aspecto nauseabundo a estas aguas disminuyendo drásticamente su calidad.

El proceso de putrefacción consume una gran cantidad del oxígeno disuelto y las aguas dejan de ser aptas para la mayor parte de los seres vivos. El resultado final es un ecosistema casi destruido⁶.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La justificación del presente trabajo es principalmente, la de contribuir conocimientos y dar solución a un problema, siendo esta la optimización del método en la determinación de fósforo, utilizando el método de azul de

⁴Estudio publicada en 2011 por www.bivica.org/caracterizacion de los efluentes de puchokollo en la ciudad de La Paz.

⁵ Norma venezolana determinación de fósforo en aguas naturales y residuales.

⁶ www.azulambientalistas.org

fosfomolibdato de amonio en aguas residuales siendo este un aporte a la sociedad y contribuir con conocimientos para el beneficio ambiental.

ECONÓMICO

Reducir en gran manera el uso de reactivos, ya que para el método aplicado se utiliza H_2SO_4 , misma que es sustancia controlada y el molibdato de amonio, y que a la vez aplicando el método espectrofotométrico se reduce en gran manera las cantidades de reactivos, lo que nos deriva a un ahorro de reactivos para el laboratorio.

AMBIENTAL

Al reducir las cantidades de reactivo utilizado, también se está reduciendo la contaminación en las aguas, misma que es un problema como las emisiones del fósforo.

El controlar las emisiones de fósforo procedentes de aguas residuales urbanas e industriales, que es un factor clave para la prevención de la eutrofización de las aguas superficiales⁷.

La presencia de fósforo causa muchos problemas en la calidad del agua incluyendo aumentos en los costes de purificación, pérdida de las poblaciones. La eliminación del fósforo se consigue normalmente mediante precipitación química, que resulta ser cara y causa el aumento del volumen de lodo hasta un 40%. Una alternativa es la eliminación biológica del fósforo⁸.

SOCIAL

Se contribuirá con un método alternativo para la determinación de fósforo, en aguas residuales y contribuir un aporte de conocimiento, los cuales servirán como base para futuras investigaciones. También será un aporte para la sociedad lo cual, con los resultados obtenidos del contenido de fósforo en las aguas residuales, llegar a la conciencia de la población y no contaminar las aguas que se encuentran en nuestra ciudad, ya que las mismas aguas se podrían utilizar para diversos actividades como el riego de jardines, limpieza de mercados entre otros y no mal gastar este líquido vital, lo cual sería óptimo con la ayuda de autoridades de medio ambiente.

⁷<http://aguaymascosas.blogspot.com/>

⁸<http://www.ambientum.com>

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

- Optimizar el método de azul de fosfomolibdato de amonio por espectrofotometría UV-Visible para determinar la concentración de fósforo presente en muestras de agua residual (AR).

1.4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Reemplazar el tipo de reductor que se utiliza, en el método de cloruro estañoso, por el ácido ascórbico y lograr optimizar el método ya existente.
- Reducir las proporciones de reactivo que se requieren, comparando con otros métodos que se aplican para la determinación de fósforo en aguas naturales y residuales.
- Analizar muestras de agua proveniente de una vertiente de la zona Cotahuma altura a la segunda parada del teleférico amarillo, aplicando el método planteado.
- Determinar la exactitud del método.
- Determinar la linealidad del método.
- Determinar el límite de cuantificación y el límite de detección para evidenciar la optimización del método.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO



CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. EL FÓSFORO EN EL AGUA

El fósforo es un elemento esencial en el crecimiento de plantas y animales. Actualmente se considera como uno de los nutrientes que controlan el crecimiento de algas, el fósforo se encuentra en aguas naturales y residuales casi exclusivamente como fosfatos, los cuales se clasifican en:

- Ortofosfatos,
- Fosfatos condensados (piro-, meta-, y otros poli fosfatos)
- Fosfatos orgánicos.

El empleo de detergentes, los cuales contienen grandes cantidades de fósforo, ha aumentado el contenido de fosfato en las aguas residuales domésticas y ha contribuido al problema de incremento del mismo en las fuentes receptoras, se usan poli fosfatos como medio de control de corrosión.

El contenido de fósforo ácido hidrolizable de una muestra es definido operacionalmente como la diferencia entre el fósforo reactivo medido en una muestra no tratada y el fosfato que se encuentra después de una digestión suave. Generalmente, esta incluye fosfatos condensados tales como pyro-, tripoly-, y especies de muy alto peso molecular tales como hexametáfosfato. En resumen algunas aguas naturales contienen compuestos orgánicos de fosfato que son hidrolizados a ortofosfato bajo las condiciones del ensayo. Los polifosfatos generalmente no responden al ensayo de fósforo reactivo pero pueden ser hidrolizados a ortofosfato por digestión con ácido⁹.

2.1.2. PRINCIPALES USOS DEL FÓSFORO

El fósforo es un elemento químico importante que tiene sólo un isótopo estable. Si alguna vez te has preguntado para qué sirve el silicio, a continuación tienes una lista de sus posibles usos¹⁰:

- Los fosfatos se utilizan para hacer vidrio especial que se utiliza como en las lámparas de sodio.
- El fósforo es un nutriente esencial para las plantas, por lo que se añade a los fertilizantes.

⁹Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia

¹⁰ [www. Quiminet.com/articulos/el uso-del-fósforo-en –la-agricultura](http://www.Quiminet.com/articulos/el-uso-del-fosforo-en-la-agricultura)

- En el laboratorio, dos isótopos radiactivos de fósforo se puede utilizar como trazadores radiactivos.
- El fosfato de calcio se puede utilizar para hacer porcelana fina.
- Las cabezas de las cerillas están hechos de fósforo. Las bengalas y los fósforos de seguridad también están hechos de fósforo.
- El fósforo blanco se usa en bombas incendiarias, cortinas de humo (por ejemplo, bombas de humo) y en munición trazadora.
- El tributílfosfato, un compuesto de fósforo, se utiliza para extraer uranio. Esto se llama el proceso Purex.
- El fósforo es un componente importante de ADN y ARN.
- El fósforo se utiliza en la producción de acero.
- El tripolifosfato de sodio se utiliza en detergentes para ropa en algunas partes del mundo. Esto ayuda en la limpieza de la ropa. Sin embargo, algunos países han prohibido ya que conduce a la muerte de los peces cuando se filtró hacia las vías fluviales.
- Otros compuestos de fósforo se utilizan en la fabricación de pesticidas, aditivos alimentarios, dentífrico y fertilizantes¹¹.

2.1.3. CONTAMINACIÓN DE AGUAS RESIDUALES A CONSECUENCIA DEL FÓSFORO Y NITRÓGENO

El nitrógeno y el fósforo son elementos comunes que se hallan en la superficie terrestre y la atmosfera.

El primero, se forma de gas, es el principal constituyente del aire que respiramos en su forma salina y o combinado con otros elementos, el nitrógeno es un constituyente de los organismos vivos y por ello un nutriente fundamental.

El fósforo por su parte tiene un rol fundamental en la generación de energía en los organismos vivos y constituye otro pilar en la nutrición de los mismos.

En los cursos de agua permiten el crecimiento de algas y plantas acuáticas las cuales sirven de hábitat y alimento para peces y otros organismos que viven en el agua¹².

¹¹www.Quiminet.com/articulos/el-uso-del-fosforo-en-la-agricultura

¹²www.calidadnatural.com/contaminación-nitrógeno-fosforo

Sin embargo cuando produce un aumento de la concentración de fósforo y nitrógeno en el ambiente generalmente como consecuencia de las actividades humanas el aire y el agua resultan contaminados.

Cantidades altas de estos elementos en ríos, lagos, bahías, y demás cursos de aguas permiten un crecimiento elevado de algas y plantas acuáticas. Este crecimiento excesivo desestabiliza los ecosistemas haciendo muy difícil la autocuración de los mismos¹³.

2.1.4. NORMA BOLIVIANA NB 512 AGUA POTABLE REQUISITOS

La calidad del agua con destino al consumo humano tiene implicaciones importantes sobre los aspectos sociales y económicos que actúan indirectamente sobre el desarrollo de un país. Caracterizar la calidad del agua a través de la definición de los valores máximos aceptables de los parámetros organolépticos, físicos, químicos y microbiológicos es fundamental para proteger la salud pública¹⁴.

Tabla 2.1.4. Parámetros establecidos por la norma ISO 512 agua potable

6.2 Requisitos químicos

Tabla 2 - Requisitos químicos

Características	Valor máximo aceptable	Observaciones
Dureza total	500,0 mg/l CaCO ₃	
pH ⁽¹⁾	9,0	Límite inferior 6,5
Compuestos inorgánicos:		
Aluminio Al	0,1 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Arsénico As	0,01 mg/l(*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Amoniaco NH ₃	0,5 mg/l (**)	Valor mayor influye en la aceptabilidad, por el olor y el sabor
Antimonio Sb	0,005 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Bario Ba	0,7 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Boro B	0,3 mg/l (**)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Cadmio Cd	0,005 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Calcio Ca	200,0 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Cianuro CN ⁻	0,07 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Cloro residual	1,0 mg/l	Límite inferior 0,2 mg/l, en

¹³ www.saludgeoambiental.org/ambiental.

¹⁴ Norma Boliviana 512 agua potable requisitos.

Tabla 2.1.4. Parámetros establecidos por la norma ISO 512 agua potable¹⁵

			un punto terminal de la red
Cloruros	Cl ⁻	250,0 mg/l (*)	Valores mayores originan corrosión que se refleja en la aceptabilidad por el sabor
Cobre	Cu	1,0 mg/l (**)	Valor mayor influye en la aceptabilidad, por el olor y el sabor
Cromo total	Cr	0,05 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Fluoruro	F ⁻	1,5 mg/l (**)	Deberá tenerse en cuenta la adaptación climática del lugar
Hierro total	Fe	0,3 mg/l (**)	Valor mayor influye en la aceptabilidad, por el color
Magnesio	Mg	150,0 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Manganeso	Mn	0,1 mg/l (**)	Valor mayor influye en la aceptabilidad, por el sabor
Mercurio	Hg	0,001 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Níquel	Ni	0,05 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Nitritos ⁽²⁾	NO ₂ ⁻	0,1 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Nitratos ⁽²⁾	NO ₃ ⁻	45,0 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Plomo	Pb	0,01 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Selenio	Se	0,01 mg/l (*)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Sodio	Na	200,0 mg/l (**)	Valor mayor influye en la aceptabilidad, por el sabor
Sulfatos	SO ₄ ⁼	400,0 mg/l (**)	
Zinc	Zn	5,0 mg/l (**)	
Compuestos orgánicos:			
Acrilamida ⁽³⁾		0,5 µg/l	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Benceno		2,0 µg/l (***)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Benzo[a]pireno		0,2 µg/l (***)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Cloroformo		100 µg/l	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Cloruro de vinilo		2,0 µg/l	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Epiclorhidrina ⁽³⁾		0,4 µg/l	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Etilbenceno		300,0 µg/l (*) (**) (***)	Valor mayor tiene efecto sobre la salud
Fenol		2,0 µg/l	Valor mayor tiene efecto sobre la salud

¹⁵ Norma Boliviana 512 agua potable requisitos.

Se puede evidenciar que no existe en Bolivia una norma para la determinación de fósforo en aguas para lo cual se recurrió a diferentes bibliografías como la ley Boliviana N° 1333 del medio ambiente que nos da los límites permisibles de fósforo en aguas¹⁶. Pero no se pudo encontrar como fosfatos sino como fósforo total.

Como no hay límites permisibles de como fosfatos en aguas en Bolivia, se tuvo que recurrir a normas internacionales para llevar a cabo la determinación de fosfatos en aguas residuales por espectrofotometría, de las cuales las normas de referencia que se utilizó son la mexicana, venezolana y colombiana lo que nos ayudó en el procedimiento del análisis para este compuesto en aguas naturales y residuales, que también nos guio con los límites permisibles de fosfatos que son entre (10-15) ppm de fosfatos¹⁷.

2.1.5. REGLAMENTO EN MATERIA DE CONTAMINACIÓN HÍDRICA LEY BOLIVIANA DEL MEDIO AMBIENTE N° 1333¹⁸

TÍTULO I DISPOSICIONES GENERALES

CAPÍTULO I

DEL OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

ARTÍCULO 1º.

La presente disposición legal reglamenta la Ley del Medio Ambiente N° 1333 del 27 de abril de 1992 en lo referente a la prevención y control de la contaminación hídrica, en el marco del desarrollo sostenible.

ARTÍCULO 2º.

El presente reglamento se aplicará a toda persona natural o colectiva, pública o privada, cuyas actividades industriales, comerciales, agropecuarias, domésticas, recreativas y otras, puedan causar contaminación de cualquier recurso hídrico.

CAPÍTULO III

DE LA CLASIFICACIÓN DE CUERPOS DE AGUAS

ARTÍCULO 4º.

La clasificación de los cuerpos de agua, según las clases señaladas en el Cuadro N° 1 - Anexo A del presente reglamento, basada en su aptitud de uso y de acuerdo con las políticas ambientales del país en el marco del desarrollo sostenible, será determinada por el MDSMA. Para ello, las instancias ambientales

¹⁶ Norma Boliviana 512 agua potable requisitos.

¹⁷ Norma Venezolana determinación de fósforo en aguas naturales y residuales

¹⁸ Reglamento en materia de contaminación hídrica ley Boliviana del medio ambiente N° 1333

dependientes del prefecto deberán proponer una clasificación, adjuntando la documentación suficiente para comprobar la pertinencia de dicha clasificación. Esta documentación contendrá como mínimo: Análisis de aguas del curso receptor a ser clasificado, que incluya al menos los parámetros básicos, fotografías que documenten el uso actual del cuerpo receptor, investigación de las condiciones de contaminación natural y actual por aguas residuales crudas o tratadas, condiciones biológicas, estudio de las fuentes contaminantes actuales y la probable evolución en el futuro en cuanto a la cantidad y calidad de las descargas.

Esta clasificación general de cuerpos de agua; en relación con su aptitud de uso, obedece a los siguientes lineamientos:

CLASE “A” Aguas naturales de máxima calidad, que las habilita como agua potable para consumo humano sin ningún tratamiento previo, o con simple desinfección bacteriológica en los casos necesarios verificados por laboratorio.

CLASE “B” Aguas de utilidad general, que para consumo humano requieren tratamiento físico y desinfección bacteriológica.

CLASE “C” Aguas de utilidad general, que para ser habilitadas para consumo humano requieren tratamiento físico-químico completo y desinfección bacteriológica.

CLASE “D” Aguas de calidad mínima, que para consumo humano, en los casos extremos de necesidad pública, requieren un proceso inicial de presedimentación, pues pueden tener una elevada turbiedad por elevado contenido de sólidos en suspensión, y luego tratamiento físico-químico completo y desinfección bacteriológica especial contra huevos y parásitos intestinales.

En caso de que la clasificación de un cuerpo de agua afecte la viabilidad económica de un establecimiento, el Representante Legal de éste podrá apelar dicha clasificación ante la autoridad ambiental¹⁹

ARTÍCULO 6º.

Se considera como PARÁMETROS BÁSICOS, los siguientes: DBO5; DQO; Colifecales NMP; Oxígeno Disuelto; Arsénico Total; Cadmio; Cianuros; Cromo Hexavalente; Fosfato Total; Mercurio; Plomo; Aldrín; Clordano; Dieldrín; DDT; Endrín; Malatión; Paratión.

¹⁹Reglamento en materia de contaminación hídrica ley Boliviana del medio ambiente N° 1333

ARTÍCULO 7º.

En la clasificación de los cuerpos de agua se permitirá que hasta veinte de los parámetros especificados en el Cuadro N° A-1 superen los valores máximos admisibles indicados para la clase de agua que corresponda asignar al cuerpo, con las siguientes limitaciones:

1º Ninguno de los veinte parámetros puede pertenecer a los PARÁMETROS BÁSICOS del Art. 6º.

2º El exceso no debe superar el 50% del valor máximo admisible del parámetro.

TÍTULO IV

DEL MONITOREO, EVALUACIÓN, PREVENCIÓN, PROTECCIÓN

Y CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD HÍDRICA

CAPÍTULO II

DE LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN Y

CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD HÍDRICA

ARTÍCULO 39º.

En caso de que se compruebe que los valores de uno o más parámetros de un cuerpo de agua son superiores a los determinados en la clase D, por causas naturales, o debido a la contaminación acumulada, ocasionada por actividades realizadas antes de la promulgación del presente reglamento (stocks de contaminación), las descargas se determinarán en base a estos valores y no a los indicados en el Anexo A²⁰.

ARTÍCULO 47º.

Todas las descargas de aguas residuales crudas o tratadas a ríos arroyos, procedentes de usos domésticos, industriales, agrícolas, ganaderos o de cualquier otra actividad que contamine el agua, deberán ser tratadas previamente a su descarga, si corresponde, para controlar la posibilidad de contaminación de los acuíferos por infiltración, teniendo en cuenta la posibilidad de que esos ríos y arroyos sirvan para usos recreacionales eventuales y otros que se pudieran dar a estas aguas. Para el efecto se deberá cumplir con lo siguiente:

a) En caso de arroyos, dichas aguas residuales crudas o tratadas deberán satisfacer los límites permisibles establecidos en el presente reglamento para el cuerpo receptor respectivo.

²⁰Reglamento en materia de contaminación hídrica ley boliviana del medio ambiente N° 1333

b) Toda descarga de aguas residuales a ríos, cuyas características no satisfagan los límites de calidad definidos para su clase, deberá ser tratada de tal forma que, una vez diluida, satisfaga lo indicado en el Cuadro N° 1 del presente reglamento;

CAPÍTULO IV

DE LA CONSERVACIÓN DE LAS AGUAS SUBTERRANEAS

ARTÍCULO 63º.

La extracción y recarga de aguas subterráneas con calidad para el consumo humano - Clase A - por medio de pozos profundos, requerirá de la DIA o DAA en los siguientes casos:

a) La realización de proyectos u obras nuevas que signifiquen la descarga de residuos sólidos, líquidos o gaseosos que puedan contaminar por infiltración las aguas subterráneas, o que se descarguen directamente a los acuíferos;

b) Las inyecciones de efluentes tratados en el subsuelo, que pudieran sobrepasar la recarga natural del acuífero poniendo en peligro su calidad físico-química o su subsistencia;

c) La realización de proyectos de riego que signifiquen regulación y aporte de aguas cuya infiltración en el suelo pueda afectar el nivel piezométrico de la napa freática, produciendo empantanamiento o salinización de los suelos;

e) Cualquier otra actividad que el MDSMA identifique como peligrosa a los fines de la protección de la calidad de las aguas subterráneas para consumo humano.

CAPÍTULO V

DEL REÚSO DE AGUAS

ARTÍCULO 67º.

El reusó de aguas residuales crudas o tratadas por terceros, será autorizado por el Prefecto cuando el interesado demuestre que estas aguas satisfacen las condiciones de calidad establecidas en el cuadro N° 1 -Anexo A- del presente Reglamento²¹

²¹Reglamento en materia de contaminación hídrica ley Boliviana del medio ambiente N° 1333

Cuadro de tipos de aguas y los usos que se puede dar²²

CUADRO No 1

CLASIFICACION DE LOS CUERPOS DE AGUA SEGÚN SU APTITUD DE USO

ORDEN	USOS	CLASE "A"	CLASE "B"	CLASE "C"	CLASE "D"
1	Para abastecimiento doméstico de aguas potable después de:				
	a) Sólo una desinfección y ningún tratamiento	SI	NO	NO	NO
	b) Tratamiento solamente físico y desinfección	No necesario	SI	NO	NO
	c) Tratamiento físico-químico completo; coagulación, floculación, filtración y desinfección	No necesario	No necesario	SI	NO
2	d) Almacenamiento prolongado o pre-sedimentación; seguidos de tratamiento, al igual que c)	No necesario	No necesario	No necesario	SI
	Para recreación de contacto primario; natación, esquí, inmersión	SI	SI	SI	NO
	Para protección de los recursos hidrobiológicos	SI	SI	SI	NO
3	Para riego de hortalizas consumidas crudas y fruta de cáscara delgada, que sean	SI	SI	NO	NO
4	ingeridas crudas sin remoción de ella				
5	Para abastecimiento industrial	SI	SI	SI	SI
6	Para la cría natural y/o intensiva (acuicultura) de especies destinadas a la alimentación humana	SI	SI	SI	NO
7	Para abrevadero de animales	NO (*)	SI	SI	NO
8	Para la navegación (***)	NO (**)	SI	SI	SI

(SI) Es aplicable, puede tener todos los usos indicados en las clases correspondientes

(*) No en represas usadas para abastecimiento de agua potable

(**) No a navegación a motor

(***) No aplicable a acuíferos

²²Reglamento en materia de contaminación hídrica ley Boliviana del medio ambiente N° 1333

Anexo-A parámetros máximos aceptables en aguas residuales y naturales²³

CUADRO No A-1 VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES DE PARÁMETROS EN CUERPOS RECEPTORES

No	PARAMETRO	UNIDAD	CAN-CERI	CLASE "A"	CLASE "B"	CLASE "C"
1	2	3	4	5	6	7
1	pH		No	6.0 a 8.5	6.0 a 9.0	6.0 a 9.0
2	Temperatura	°C		± 3 °C de c. receptor	± 3 °C de c. receptor	± 3 °C de c. receptor
3	Sólidos disueltos totales	mg/l		1000	1000	1500
4	Aceites y Grasas	mg/l	No	Ausentes	Ausentes	0.3
5	DBO5	mg/l	No	< 2	<5	<20
6	DQO	mg/l	No	<5	<10	<40
7	NMP Colifecales	N/100ml	No	<50 y <5 en 80% de muestras	<1000 y <200 en 80% de muestras	<5000 y <1000 en 80% de muestras
8	Parásitos	N/l		<1	<1	<1
9	Color mg Pt/l	mg/l	No	<10	<50	<100
10	Oxígeno disuelto	mg/l	No	> 80% sat.	>70% sat.	>60% sat.
11	Turbidez	UNT	No	<10	<50	<100 - <2000***
12	Sólidos Sedimentables	mg/l - ml/l	No	<10 mg/l	30 mg/l - 0.1 ml/l	<50 mg/l - <1 ml/l
13	Aluminio	mg/l		0.2 c. Al	0.5 c. Al	1.0 c. Al
14	Amoniaco	mg/l	No	0.05 c. NH	1.0 c. NH	2 c. NH
15	Antimonio	mg/l	No	0.01 c. Sb	0.01 c. Sb	0.01 c. Sb
16	Arsénico total	mg/l	Si	0.05 As	0.05 c. As	0.05 c. As
17	Benceno	µg/l	Si	2.0 c. Be	6.0 c. Be	10.0 c. Be
18	Bario	mg/l	No	1.0 0.05 c. Ba	1.0 c. Ba	2.0 c. Ba
19	Berilio	mg/l	Si	0.001 c. Be	0.001 c. Be	0.001 c. Be
22	Cadmio	mg/l	No	0.005	0.005	0.005
23	Cianuros	mg/l	No	0.002	0.1	0.2
24	Cloruros	mg/l	No	250 c. Cl	300 c. Cl	400 c. Cl
25	Cobre	mg/l	No	0.05 c. Cu	1.0 c. Cu	1.0 c. Cu
26	Cobalto	mg/l		0.1 c. Co	0.2 c. Co	0.2 c. Co
27	Cromo Hexavalente	mg/l	Si	0.05 c. Cr total	0.05 c. Cr ⁺⁶	0.05 c. Cr ⁺⁶
28	Cromo Trivalente	mg/l	No		0.6c. Cr ⁺³	0.6c. Cr ⁺³
29	1,2 Dicloroetano	µg/l	Si	10.0	10.0	10.0
30	1,1 Dicloroetileno	µg/l	Si	0.3	0.3	0.3
31	Estaño	mg/l	No	2.0 c. Sn	2.0 c. Sn	2.0 c. Sn
32	Fenoles	µg/l	No	1 c. C ₆ H ₅ OH	1 c. C ₆ H ₅ OH	5 c. C ₆ H ₅ OH
33	Hierro soluble	mg/l	No	0.3 c. Fe	0.3 c. Fe	0.1 c. Fe
34	Fluoruros	mg/l	No	0.6 - 1.7 c. F	0.6 - 1.7 c. F	0.6 - 1.7 c. F
35	Fosfato total	mg/l	No	0.4 c. Orthofosf.	0.5 c. Orthofosf.	1.0 c. Orthofosf.
36	Magnesio	mg/l	No	100 c. Mg	100 c. Mg	150 c. Mg
37	Manganeso	mg/l	No	0.5 c. Mn	1.0 c. Mn	1.0 c. Mn
38	Mercurio	mg/l	No	0.001 Hg	0.001 Hg	0.001 Hg
39	Litio	mg/l		2.5 c. Li	2.5 c. Li	2.5 c. Li
40	Níquel	mg/l	Si	0.05 c. Ni	0.05 c. Ni	0.5 c. Ni
41	Nitrato	mg/l	No	20.0 c. NO ₃	50.0 c. NO ₃	50.0 c. NO ₃
42	Nitrito	mg/l	No	<1.0 c. N	<1.0 c. N	<1.0 c. N
43	Nitrógeno Total	mg/l	No	5 c. N	12 c. N	12 c. N
44	Plomo	mg/l	No	0.05 c. Pb	0.05 c. Pb	0.05 c. Pb

²³Reglamento en materia de contaminación hídrica ley Boliviana del medio ambiente N° 1333

2.2. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES

2.2.1. DETERMINACIÓN DE FOSFATOS POR COLORIMETRÍA (MÉTODO AMARILLO DEL ÁCIDO VANADOMOLIBDOFOSFÓRICO)

En una solución diluida de ortofosfato, el molibdato amónico reacciona en condiciones ácidas para formar un heteropoliácido, ácido molibdofosfórico. En presencia de vanadio forma ácido vanadomolibdofosfórico amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfatos²⁴.

El método se lo realiza por espectrofotometría UV-Visible para uso a 400-490 nm o bien un fotómetro de filtro provisto de un filtro azul o violeta con transmitancia máxima entre 400 y 470 nm.

En esta identificación interfieren concentraciones apreciables de Fe(III), silicato y arseniato, entre otras especies. Es decir estas especies absorben luz a la longitud de onda utilizada (420 nm, absorción del $P(VMo_{11}O_{40})^{-3}$). Para eliminar dicha interferencia se prepara un blanco (sin Fosfato) cuya absorbancia se restara de la del resto de las muestras.

Adicionalmente, es posible que la absorbancia del complejo se vea afectada por efectos de matriz. La matriz puede potenciar o atenuar la absorbancia de la luz por el complejo, lo cual puede conducir a resultados erróneos.

Para minimizar este efecto, aplicaremos el método de adición de estándar, que consiste en la adición de cantidades crecientes del analito de interés (fosfato en nuestro caso) a una cantidad fija de muestra. Este procedimiento resulta más efectivo que un calibrado externo (recta de calibrado con disoluciones patrón) cuando la matriz interfiere en la detección.

2.2.2. MÉTODO COLORIMÉTRICO DEL FÓSFORO TOTAL

EL FÓSFORO TOTAL (P)

Se determina en una muestra sin filtrar y en ella están presentes todas las formas de fósforo. Debido a que el fósforo puede estar presente en combinación con la materia orgánica, es necesario para determinar el fósforo total, preparar la muestra mediante un método de digestión capaz de oxidar la materia orgánica efectivamente, para liberar el fósforo como ortofosfato, para su posterior

²⁴Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia

determinación por el Método del Ácido Ascórbico. La concentración de fósforo total se registra como mg P total /L²⁵.

El método de digestión utilizado es el del ácido sulfúrico - ácido nítrico, recomendado, para la mayoría de las muestras y además presenta recuperaciones adecuadas.

En el Laboratorio del IDEAM se analizan con éste método muestras de agua superficial y residual en un rango de lectura de concentraciones entre 0.05 y 1.0 mg P-PO₄/L, pero el rango de concentración de las muestras esta entre 0.05 y la máxima concentración que pueda ser diluida con precisión.

El análisis de fósforo envuelve dos pasos generales:

- conversión de la forma de fósforo total a ortofosfato disuelto.
- determinación colorimétrica del ortofosfato disuelto. El molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio reaccionan en Medio ácido con el ortofosfato para formar un heteropoliácido ácido fosfomolibdico.

2.3. MÉTODO ACTUAL PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES

2.3.1. MÉTODO COLORIMÉTRICO CON CLORURO ESTAÑOSO

El cloruro estañoso reduce al ácido molibdofosfórico y forma un complejo azul de molibdeno intensamente coloreado cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de fosfatos²⁶.

REACTIVOS

- Solución concentrada de ácido

En un balón aforado de 1L se agregan lentamente 300mL de H₂SO₄ concentrado a unos 600mL de agua destilada, se enfría la solución a temperatura ambiente y se diluye a 1 L con agua destilada.

- Reactivo I solución de molibdato de amonio

Se disuelven 25 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ en 175 mL de agua destilada se agregaron cuidadosamente 280 mL H₂SO₄ concentrado a 400 mL de agua destilada, se deja enfriar, se mezcla con la solución anterior y se diluye a 1 L.

²⁵Norma Mexicana análisis de aguas- determinación de fósforo total en aguas naturales y residuales

²⁶Norma Venezolana determinación de fósforo en aguas naturales y residuales

➤ **REACTIVO II SOLUCIÓN DE CLORURO ESTAÑOSO**

Se disuelven 2.5 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100mL de glicerol, se calienta en baño de vapor mezclando con agitador de vidrio hasta lograr su completa disolución, este reactivo no es estable²⁷.

➤ **SOLUCIÓN CONCENTRADA DE FOSFATOS**

(1.00mL=50.0 μg PO_4^{-3}), se disuelven en agua destilada 219.5 mg de KH_2PO_4 anhidro, previamente secado durante 1 hora a 105C y se diluye a 1 L.

➤ **REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN**

Disolvente isobutanol-tolueno se mezclan volúmenes iguales de tolueno y alcohol isobutílico.

PRECAUCIÓN este disolvente es altamente inflamable, cancerígeno altamente tóxico, se debe trabajar bajo campana.

2.3.2. PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

PROCEDIMIENTO

➤ **CALIBRACIÓN**

a una serie de matraces aforados de 100mL, se agregan alícuotas de la solución patrón de fosfatos para preparar los patrones con concentraciones en el rango 0 mg-P/L a 2.0 mg-P/L, a cada matraz se le agregara 4 mL de reactivo I molibdato de amonio y 0.5 mL (10 gotas) de cloruro estañoso.

TÉCNICA DE ENSAYO

Acondicionamiento de la muestra

Se transfieren 100mL o menos de muestra que contenga menos de 200 μg -P, libre de color y turbiedad a un vaso de precipitado de 200mL de capacidad, se agregan 0.05 mL (1 gota) de indicador fenolftaleína. Si la muestra se torna rosada, se le agregan gota a gota solución concentrada de ácido, justo hasta eliminar el color. Si se requieren más de 0.25 mL se utiliza un volumen menor de la muestra y se diluye a 100 mL con agua destilada antes de ajustar el P^{H} .

Se agregan, mezclando vigorosamente después de cada adición, 4 mL de reactivo I molibdato de amonio y 0.5 mL (10 gotas) de cloruro estañoso.

²⁷ Norma Mexicana análisis de aguas- determinación de fósforo total en aguas naturales y residuales

La velocidad a la que se desarrolla el color y su intensidad depende de la temperatura de la solución, cada incremento de 1 °C produce aproximadamente un incremento de 1 % en la intensidad del color, por tal razón se deben mantener muestras, patrones y reactivo a una temperatura entre 20 °C y 30 °C con no más de 2 °C de diferencia entre ellos.

Después de 10 minutos pero no más de 15 minutos usando el mismo intervalo de tiempo para todas las determinaciones, se mide las absorbancias de la soluciones a una longitud de onda de 690nm, utilizando el patrón de 0 mg-P/L tratado para calibrar el espectrofotómetro²⁸.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La concentración de fósforo, expresada en mg-P/L, se calcula de la siguiente manera:

Procedimiento directo:

$$\text{mg-P/L de fósforo reactivo (ortofosfatos)} = A * 1000/B \quad \text{Ecc. (1)}$$

Donde:

A = contenido de fósforo en 104.5 mL de volumen final de la muestra, mg.

B = volumen de la muestra, mL.

Tiempo de análisis

El tiempo necesario para efectuar una determinación sin incluir pre tratamiento de la muestra es de 30 minutos.

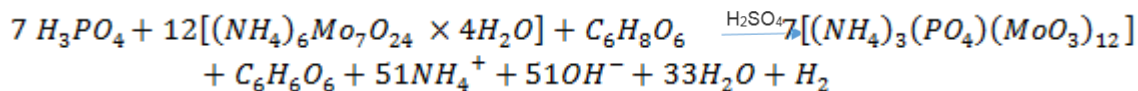
2.4. MÉTODO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES

2.4.1. “OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO AZUL DE FOSFOMOLIBDATO DE AMONIO PARA LA DETERMINACIÓN DE (FÓSFORO) POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE”

Para la determinación de fósforo mediante espectrofotometría UV-visible, se empleó el **método del azul de molibdeno con ácido ascórbico**, cuyo fundamento consiste en adicionar molibdato de amonio en presencia de fosfatos y este compuesto se reduce a un complejo azul soluble (fosfomolibdato de amonio), tal y como se representa en las reacciones químicas de la ecuación²⁹:

²⁸Norma Mexicana análisis de aguas- determinación de fósforo total en aguas naturales y residuales

²⁹Norma Venezolana determinación de fósforo en aguas naturales y residuales



La concentración de fosfomolibdato de amonio $(NH_4)_3(PO_4)(MoO_3)_{12}$ formado es proporcional a la concentración de fósforo P.

Se preparó las siguientes soluciones:

2.4.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN REDUCTORA

- ✓ Preparación de molibdato de amonio 2.53×10^{-3} M

$$100 \text{ mL} \times \frac{2.53 \times 10^{-3} \text{ mol } (NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1235.9 \text{ g molibdato de amonio}}{1 \text{ mol molibdato de amonio}} = 0.3126 \text{ g molibdato de amonio}$$

Se pesaron 0.3126 g de molibdato de amonio y se disolvió en 50 mL agua destilada.

- ✓ Preparación de ácido ascórbico 0.024 M

$$100 \text{ mL} \times \frac{0.024 \text{ mol } C_6H_8O_6}{1000 \text{ mL}} \times \frac{176 \text{ g } C_6H_8O_6}{1 \text{ mol } C_6H_8O_6} = 0.4224 \text{ g } C_6H_8O_6$$

Se pesaron 0.4224 g de ácido ascórbico los cuales fueron disueltos en la anterior solución del molibdato de amonio.

- ✓ Finalmente se le añadieron 4.4 mL de H_2SO_4
- ✓ Los tres reactivos se los disuelve en un volumen de 80 mL con agua destilada con sumo cuidado más que todo con el H_2SO_4
- ✓ Posteriormente ya mezcladas las tres soluciones se mezclaron llevándose a un aforo de 100 mL obteniéndose así la solución reductora.

2.4.3. PREPARACIÓN DEL PATRÓN KH_2PO_4

Para la determinación de fósforo mediante espectrofotometría UV-visible, se empleó el método del azul de molibdeno³⁰.

- ✓ Preparación de KH_2PO_4 100 ppm que será equivalente a P

$$100 \text{ mL} \times \frac{100 \text{ mg P}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ g P}}{1000 \text{ mg P}} \times \frac{1 \text{ mol P}}{31 \text{ g P}} \times \frac{1 \text{ mol } PO_4^{-3}}{1 \text{ mol P}} \times \frac{1 \text{ mol } KH_2PO_4}{1 \text{ mol } PO_4^{-3}} \times \frac{136 \text{ g } KH_2PO_4}{1 \text{ mol } KH_2PO_4} = 0.04387 \text{ g } KH_2PO_4$$

³⁰ Norma Venezolana determinación de fósforo en aguas naturales y residuales

Se pesaron 0.04387 g de KH_2PO_4 , secado previamente a $105^\circ\text{C}/1$ h, disuelto en agua destilada, aforando a 100mL. Esta disolución es equivalente estequiométricamente a la concentración teórica de 100 mgL^{-1} de fósforo P de la disolución madre³¹.

- ✓ Realizamos una previa dilución para las respectivas concentraciones de 100 ,10 y 1 ppm (mgL^{-1} de fósforo P) esto con el fin de poder realizar las respectivas disoluciones 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, mg/L de fósforo P.
- ✓ para las concentraciones bajas 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, se utilizó la dilución de 1 ppm A partir de esta disolución se preparó los patrones de trabajo.
- ✓ Para las concentraciones más altas 1.2, se utilizó la dilución de 10 ppm. A partir de esta disolución se preparó los patrones de trabajo.



Solución patrón de 100ppm Solución patrón de 10ppm Solución patrón de 1 ppm

Respectivas disoluciones que se realizó de patrón KH_2PO_4 que será equivalente a mg fósforo P /L para tener las respectivas concentraciones.

2.4.4. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

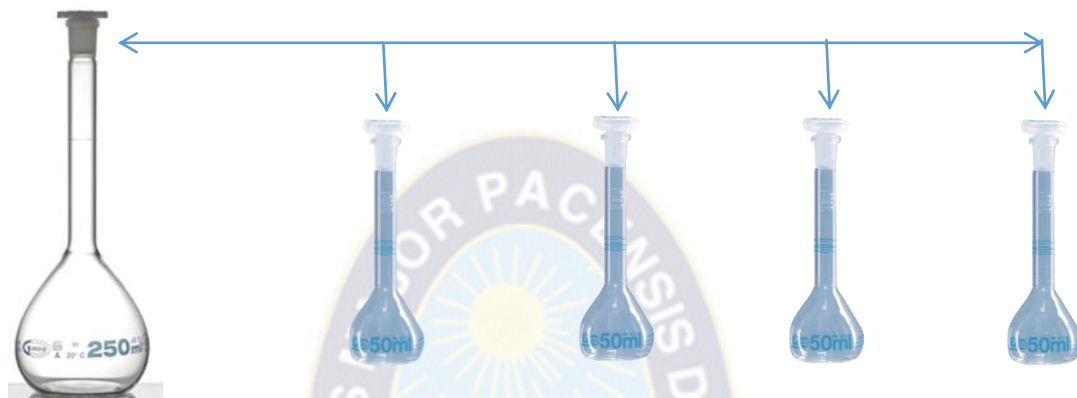
Se preparó estándares en matraces aforados de 50 mL, para esto se preparó las concentraciones respectivas de 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, mg/L fósforo P de la solución de trabajo, y se le añade a cada una 20mL de la solución reductora³².

³¹Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia

³²Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud

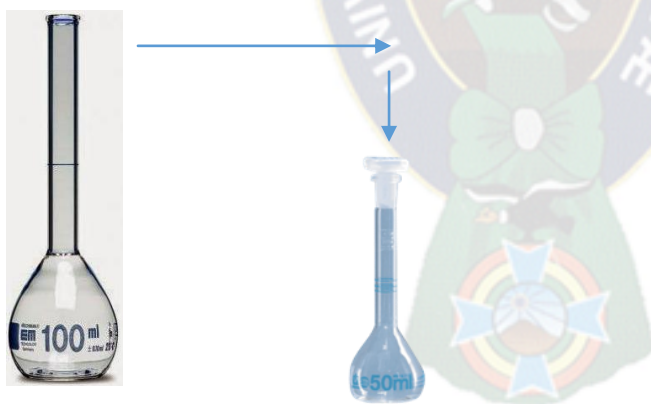
Preparación de patrones 0 – 0.8 mg fósforo P /L

Para fines de comodidad se utilizó buretas de 50ml y no así las tradicionales pipetas volumétricas esto con el fin de poder disminuir el error en las respectivas diluciones³³.



Solución patrón de 1 ppm	5 mL	10 mL	20 mL	40 mL
mg fósforo P/L	0.1 ppm	0.2 ppm	0.4 ppm	0.8 ppm

Preparación del patrón de 1.2 mg fósforo P /L



Solución patrón de 10 ppm	6 mL
mg fósforo P /L	1.2 ppm

A todos los matraces se añade 20 mL de la solución reductora.

³³Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud

2.4.5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

2.4.5.1. UBICACIÓN DE MUESTREO

Para nuestro análisis se muestreo agua procedente de una vertiente ubicada atrás de la segunda parada del teleférico de la línea amarilla ubicada en la zona Cotahuma de la urbe paceña, a continuación se muestra en el gráfico la ubicación exacta de la vertiente de donde se tomó la muestra de agua.

Gráfica 2.4.5.1. Tomada por el GPS de la vertiente



Gráfica 2.4.5.2. de la vertiente donde habitantes de la zona usan las aguas para el lavado ropa.



Gráfica 2.4.5.3. Laguna que se forma después del descargo de agua de la vertiente y se puede evidenciar una eutrofización debido al uso que le da, la gente para el lavado de ropa.



Gráfica 2.4.5.4. Toma de muestra en un extremo de la laguna, se tomó una sola muestra para el análisis de fósforo.



2.4.5.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Por las características que tiene la muestra aplicando la ley Boliviana N°1333 reglamento de contaminación hídrica de medio ambiente **TÍTULO I DISPOSICIONES CAPÍTULO III DE LA CLASIFICACIÓN DE CUERPOS DE AGUAS ARTÍCULO 4º**. Se pudo constatar que el tipo de agua que se muestreó en el lugar ya mencionado es de CLASE D. (aguas de mínima calidad, que para consumo humano, en casos extremos de necesidad pública) ver página 15³⁴.

Para el tratamiento de la muestra seguimos el siguiente procedimiento:

- ✓ Se acondicionó primeramente la muestra de agua, la misma que se muestreó en un envase de plástico, previamente lavado y enjuagado con el agua a analizar.
- ✓ Los datos físicos de la muestra son los siguientes :

procedencia	Ciudad de La Paz, zona Cotahuma altura a la segunda parada del teleférico línea amarilla
Características físicas	
Fecha toma de muestra	16 de noviembre 2016
Hora de toma de muestra	07:45 am
Temperatura	7 °C
P ^H	6.31
Color	Incoloro
Olor	Sin olor
Aspecto	Con partículas en suspensión

- ✓ una vez medidos estos parámetros se agregó 1 mL de ácido nítrico para la conservación del agua residual.
- ✓ se midió 5 mL de esta agua previamente filtrada (papel filtro N° 42) y se traspasó en un matraz aforado de 50 mL, enjuagando la pipeta volumétrica con agua destilada.
- ✓ Luego se añade 20mL de disolución reductora (molibdato de amonio) y se aforó a 50 mL con agua destilada.
- ✓ Verificar el P^H (6-7) de la solución.
- ✓ Para la muestra se preparó por duplicado. La absorbancia de las disoluciones acuosas conteniendo fósforo P y la absorbancia de la muestra se determinó en un espectrofotómetro marca shimadzu UV-mini 1240 a una longitud de onda de 825 nm, y la absorbancia obtenida es directamente

³⁴Reglamento en materia de contaminación hídrica ley Boliviana del medio ambiente N° 1333

proporcional a la concentración de fósforo P presente en la muestra de agua residual³⁵.

Dilución de la muestra



Medimos 5 mL de agua residual y se añade 20 ml de solución reductora y aforamos a 50 mL

Factor de dilución (fdn)

Única dilución $50/5 = 10$

APLICABILIDAD DEL MÉTODO CONVERSIÓN DE FÓSFORO A FOSFATOS EN AGUAS NATURALES Y RESIDUALES

Para confirmar la validación del método analítico utilizado, se procedió a evaluar la aplicabilidad del método para cuantificar la concentración de fósforo en el agua residual, a continuación realizaremos una conversión de fósforo P-fosfatos (PO_4^{-3}) esto por cuestiones de interpretación de resultados³⁶.

$$mg \frac{PO_4^{-3}}{L} = \frac{mg \text{ Fósforo P}}{L} \times \frac{94.9714 \text{ mg } PO_4^{-3}}{30.9738 \text{ mg fósforo P}} \times (fdn) \dots \dots \text{Ecc. (2)}$$

2.5. FUNDAMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRA VIOLETA – VISIBLE

2.5.1. ESPECTROFOTOMETRÍA

El fundamento de la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible³⁷. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la

³⁵Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud

³⁶Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud

³⁷Aplicaciones y criterios de uso de la espectroscopia de absorción

eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Esto permite poner en funcionamiento ciclos vitales como la fotosíntesis en plantas y bacterias. Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, E_1 , a un estado de mayor energía (estado excitado), E_2 . Y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula -esto es, su espectro de absorción constituye una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético

$$E_2 - E_1 = h\nu$$

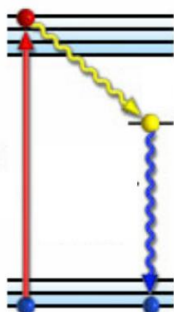


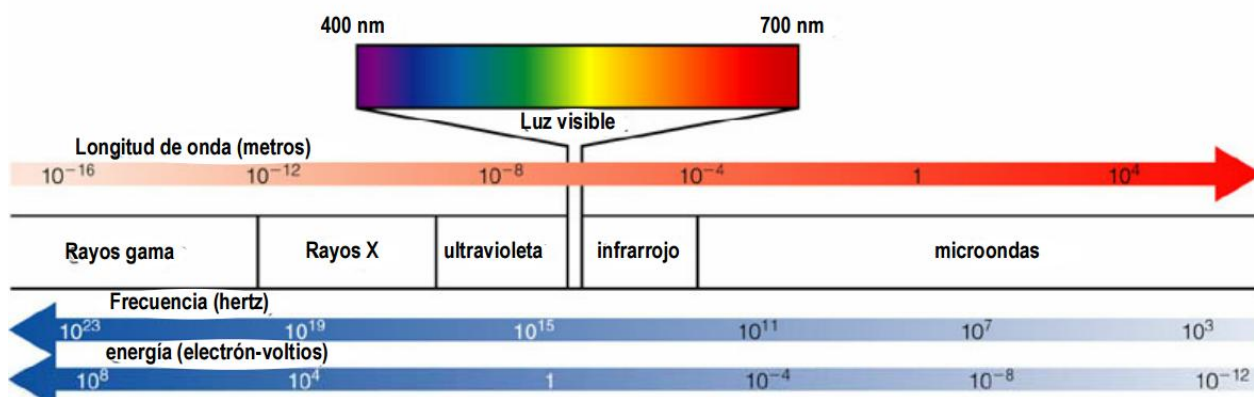
Figura 1. Diagrama de niveles de energía en una molécula. La absorción de energía luminosa hace que la molécula pase desde un estado fundamental (E_1) a otro excitado (E_2). Posteriormente la molécula relaja su energía mediante distintos mecanismos (vibración, rotación, etc.)

fundamental.

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante. El vidrio, que parece ser completamente transparente, absorbe longitudes de onda que pertenecen al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en la región del IR. La absorción de las radiaciones UV, visibles e IR depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. El color de las sustancias se debe a que absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y sólo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbida.

Esta espectrofotometría utiliza radiaciones del campo UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm (UV cercano) y de luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar las soluciones en la región ultravioleta-visible del espectro. Se rige por una ley muy importante: la ecuación de Beer-Lambert³⁸.

³⁸Aplicaciones y criterios de uso de la espectroscopia de absorción



Gráfica del campo electromagnético con la respectiva longitud de onda

2.5.2. LA REGIÓN UV

Se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores -como pH, concentración de sal y el disolvente- que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio³⁹.

2.5.3. LA REGIÓN VISIBLE

longitud de onda aproximada	color de luz que se absorbe	color de luz que se refleja o ve
390 - 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 - 490	Azul	Amarillo
490 - 580	Verde	Rojo
580 - 595	Amarillo	Azul
595 - 650	Naranja	Azul verdoso
650 - 780	Rojo	Verde azulado

Apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la

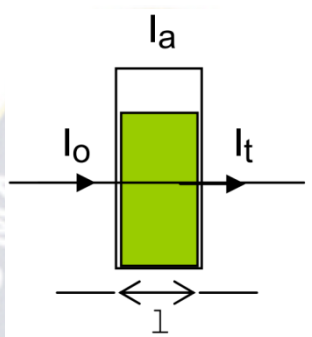
³⁹Aplicaciones y criterios de uso de la espectroscopia de absorción

solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm.

2.5.4. TRANSMITANCIA Y ABSORBANCIA

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad I_0 incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple:

$$I_0 = I_a + I_t \dots \text{Ecc. (3)}$$



2.5.5. LA TRANSMITANCIA (T)

De una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, I_t , y la cantidad de luz que incidió sobre ella, I_0 , y se representa normalmente en tanto por ciento:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \dots \text{Ecc. (4)}$$

$$\% T = \frac{I_t}{I_0} \times 100 \dots \text{Ecc. (5)}$$

La transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre %T y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa⁴⁰.

2.5.6. LA ABSORBANCIA (A)

Es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de $1/T$, en consecuencia:

$$A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t / I_0 \dots \text{Ecc. (6)}$$

⁴⁰Aplicaciones y criterios de uso de la espectroscopia de absorción

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_o = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale $\log 1 = 0$.

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste⁴¹.

2.5.7. LEY DE LAMBERT-BEER

Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \log I/I_o = \epsilon \cdot c \cdot l \dots \text{Ecc. (7)}$$

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará; y por último, depende de ϵ , una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de ϵ dependen de las de c y l . La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M , con lo que las dimensiones de ϵ resultan ser $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar (ϵ_m). Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M , por ejemplo $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, las dimensiones de ϵ resultan ser distintas, por ejemplo $\text{g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico⁴² (ϵ_s).

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de c altos, ϵ varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc.

2.5.8. INSTRUMENTACIÓN PARA LA MEDICIÓN DE ABSORBANCIAS DE LA LUZ VISIBLE Y ULTRAVIOLETA: ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE

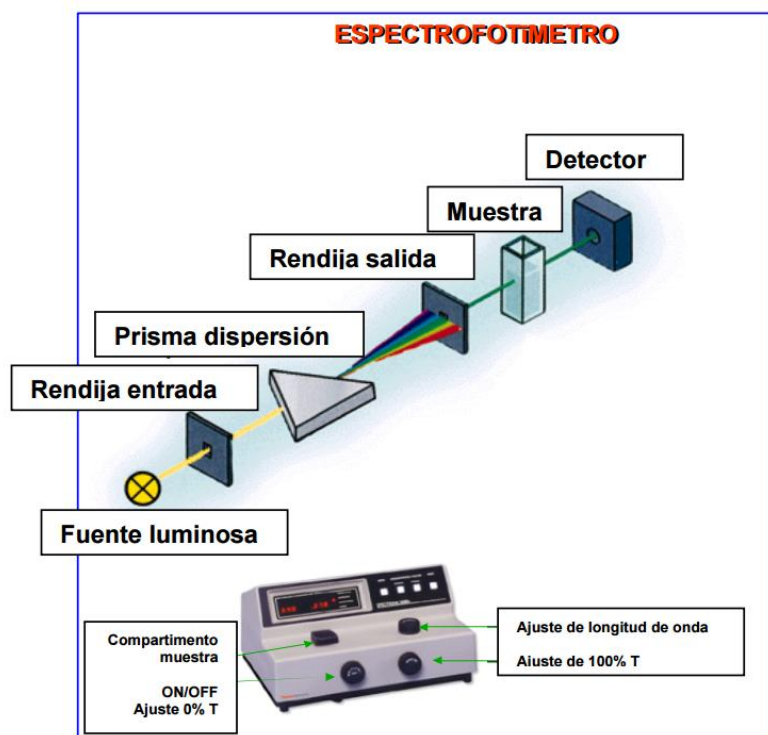
La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros. Aunque pueden variar en diseño, en

⁴¹Aplicaciones y criterios de uso de la espectroscopia de absorción

⁴²www.espectrometria.com/espectrometria_ultravioleta-visible

especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura, de:

- Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
- Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
- Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
- Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
- Un registrador o sistema de lectura de datos⁴³.



Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de doble haz (con dos celdillas para dos cubetas); en nuestro caso se trabajará con los de un solo haz. Se mide primero la absorbancia del disolvente (conocido como blanco) y al que se le asigna el valor de cero mediante el ajuste del mando, de forma que la intensidad incidente y transmitida sean iguales ($I_0 = I_t$), y por tanto la

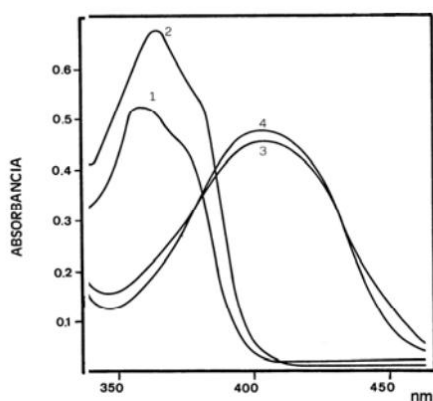
⁴³www.espectrometria.com/espectrometria_ultravioleta-visible

absorbancia es cero. A continuación se pone en la celdilla la cubeta con la muestra y se lee la absorbancia de ésta.

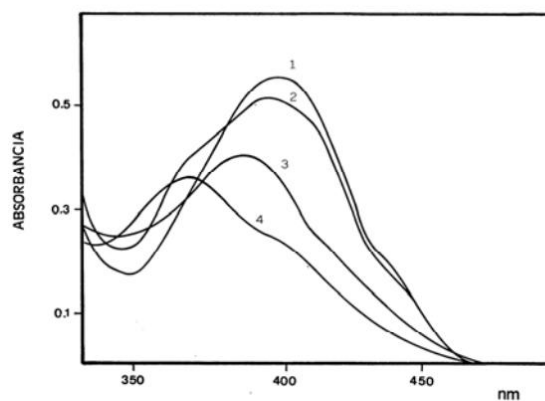
2.5.9. OBTENCIÓN DE UN ESPECTRO DE ABSORCIÓN

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida (ϵ) a diferentes valores de λ . A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia (λ_{\max}). Dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto. El espectro de absorción de un cromóforo depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula⁴⁴.

No obstante, hay una gran cantidad de factores que originan variaciones en los valores de λ_{\max} y ϵ_m , entre los que se incluye el pH, la polaridad del solvente o moléculas vecinas y la orientación de los cromóforos vecinos; y cada uno afecta de forma particular. Por ejemplo, variaciones originadas por cambios de pH son debidas al efecto de éste sobre la ionización del compuesto. A continuación se muestran como ejemplo los espectros de absorción de HNTS (un reactivo empleado para la determinación de especies oxidantes) y comprobándose que por espectrofotometría se puede seguir el efecto que ejercen el pH y los oxidantes.



Efecto del pH en la absorción de HNTS. Espectros 1 y 2 en medio ácido (máximo de absorción a 370 nm); espectros 3 y 4 en medio básico (máximo a 410 nm).



Desplazamiento del máximo de absorción y descenso de absorbancia cuando el HNTS se incubaba con H₂O₂ a distintos tiempos (0, 5, 10 y 15 minutos).

⁴⁴www.espectrometria.com/espectrometria_ultravioleta-visible

2.5.10. CURVA DE CALIBRADO

Para obtener una curva de calibrado de un compuesto se preparan soluciones de diferentes concentraciones del mismo, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a λ_{\max} . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de abscisas (eje de x) y los de concentración en el eje de ordenadas (eje de y). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas la linealidad se pierde y se observa que la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables. La representación de Lambert-Beer,

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \dots \text{Ecc. (8)}$$

Nos permitirá calcular el valor del coeficiente de extinción molar, que corresponde a la pendiente de la recta⁴⁵.

2.6. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO (FOSFOMOLIBDATO DE AMONIO CON ÁCIDO ASCÓRBICO)

2.6.1. Exactitud

Es la cercanía del valor analítico al "valor verdadero" de concentración del compuesto de interés en el material bajo examen. Es la concordancia entre la mejor estimación de una cantidad y su valor real. La inexactitud es la diferencia numérica entre el valor promedio de un conjunto de repeticiones y el valor verdadero.

Uno de los criterios de calidad que tiene gran relevancia en la estandarización y optimización de un método analítico es la exactitud, ya que este parámetro refleja de manera evidente, el grado de concordancia entre un valor real (medido) y un valor teórico (verdadero) y generalmente se sustenta a través del porcentaje de recuperación o recobro.

Los valores obtenidos para la exactitud del método por medio del porcentaje de recuperación, calculados a partir de la Ecuación (9), los valores puede considerar porcentaje de recuperación se encuentran dentro del rango $100 \pm 1\%$ considerado como aceptable. En validación, el porcentaje de recuperación aceptable está entre 85 y 115%

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida} \times 100}{\text{Concentración real}} \dots \text{Ecc. (9)}$$

⁴⁵www.espectrometria.com/espectrometria_ultravioleta-visible

2.6.2. LINEALIDAD

Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo de trabajo (una respuesta lineal facilita el trazado, interpolación e interpretación)

2.6.2.1. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA LINEALIDAD

Estudio a partir de disoluciones patrón según el método de la recta de calibrado. La linealidad se debe establecer a partir de al menos cinco niveles de concentración que abarquen todo el intervalo de trabajo y analizarlos por triplicado (tres rectas de calibrado en días distintos para el mismo grupo de patrones)

2.6.2.2. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD

- Visualización gráfica de la recta de calibrado y de los puntos que la generan.
- Ecuación de la recta por el método de mínimos cuadrados, coeficiente de correlación (r) y errores de los distintos parámetros de la recta.
- Análisis gráfico de los residuos.

La linealidad de la curva de calibración se determinó utilizando cinco concentraciones diferentes con un rango de (0.1 - 4.0) mg fósforo P/L por triplicado, obteniéndose 15 lecturas, a una longitud de onda de 825nm. Este parámetro se evaluó por inspección visual del gráfico señal contra la concentración del analito y por dos métodos estadísticos apropiados: coeficiente de determinación (R²) y coeficiente de correlación de Pearson (R)⁴⁶

Coeficiente de determinación

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (Y - \hat{Y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2} \quad \text{Ecc (10)}$$

Donde: $\hat{Y} = \sum y / n$

Coeficiente de Correlación de Pearson

$$R = \frac{[a \sum y + b \sum x - n(\hat{Y})^2]}{\sum y^2 - n\hat{Y}^2}$$

Donde:

$$\hat{Y} = \sum y / n$$

Ecc (11)

⁴⁶www.espectrometria.com/espectrometria_ultravioleta-visible

El criterio de aceptación es si R y/o $R^2 > 0.995$, entonces el método es lineal.

2.6.3. SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un método mide su capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. La sensibilidad (m) se define como el cociente entre la señal medida (absorbancia, s) y la concentración (c) de analito:

$$M = s/c \quad \text{Ecc. (12)}$$

En una regresión lineal, la sensibilidad es la pendiente de la curva a una concentración dada. En caso de ser una recta, coincide con la pendiente de la misma. Como valor se puede utilizar el promedio de las pendientes obtenidas en las rectas de los ensayos de estandarización, indicando su desviación estándar

2.6.3.1. LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección de un método analítico es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede detectar aunque no cuantificar bajo las condiciones experimentales descritas para dicho método.

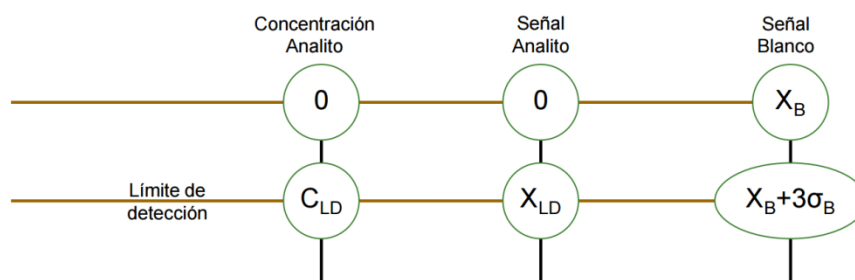
El límite de detección considera la amplitud de la señal y el ruido de la línea de fondo, además la concentración más baja que se puede distinguir claramente a partir del cero⁴⁷.

$$LD = \frac{3 \times S_{\text{Blancos}}}{B} \quad \text{Ecc. (13)}$$

Donde:

S_B = desviación estándar del blanco

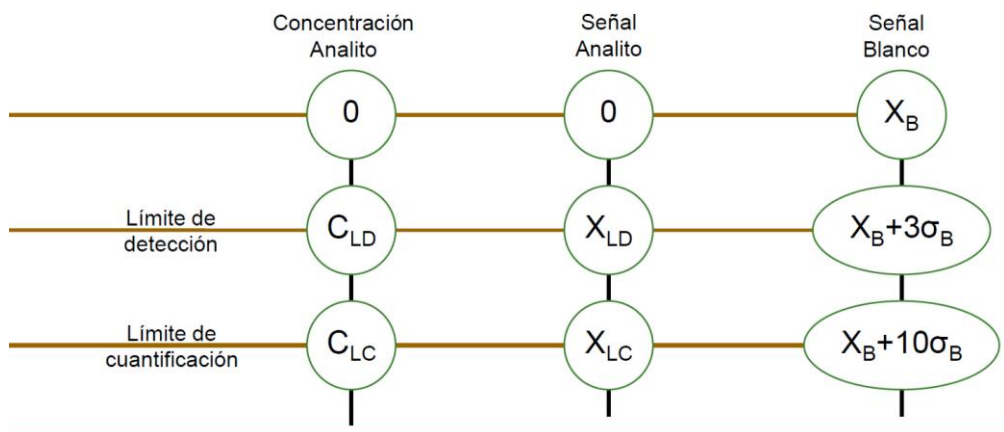
B = pendiente de la curva



⁴⁷Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultra violeta visible Laboratorio de Hidroquímica, Instituto de Investigaciones Químicas, UMSA, La Paz – Bolivia

2.6.3.2. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación de un método analítico es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar bajo las condiciones experimentales descritas para dicho método, con una adecuada exactitud y precisión.



El límite instrumental de cuantificación, detecta pequeñas cantidades de un analito que se pueda cuantificar confiablemente por el instrumento. Generalmente se acuerda la cuantificación como la señal para una concentración igual a 10 veces la desviación estándar del blanco⁴⁸. Esto se llama el límite de la cuantificación o límite de la determinación.

$$LC = \frac{10 \times S_{Blancos}}{B} \text{Ecc. (14)}$$

S_B = desviación estándar del blanco

B = pendiente de la curva

Tabla de la relación entre el límite de detección y el límite de cuantificación

Tabla N° 1 Relación entre el límite de detección y límite de cuantificación [4]

	Desviación estándar absoluta	Desviación estándar relativa
Límite de detección	3σ	33%
Límite de cuantificación	10σ	10%

⁴⁸Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultra violeta visible Laboratorio de Hidroquímica, Instituto de Investigaciones Químicas, UMSA, La Paz – Bolivia

The logo of Universidad Mayor Pacensis Divi Andree is a circular emblem. It features a sun with rays at the top, a mountain range in the middle, and a green field with a white cross at the bottom. The text "UNIVERSITAS MAJOR PACENSIS DIVI ANDREE" is written around the perimeter of the circle.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA DE TRABAJO

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA DE TRABAJO

En este capítulo daremos a conocer los parámetros estadísticos como la exactitud, linealidad del método, límite de cuantificación y límite de detección para dar la veracidad del método a optimizar.

3.1. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE CALIDAD PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE FOSFOMOLIBDATO DE AMONIO CON ÁCIDO ASCÓRBICO

3.1.1. EXACTITUD

Se utilizaron estándares de trabajo preparados a partir de una disolución madre de fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4 que es equivalente a fósforo P, de la que se realizaron previas disoluciones 1 y 10 mg fósforo P /L para las respectivas disoluciones posteriores.

Para la evaluación la exactitud, se utilizaron las concentraciones de (0.8, 1.2, 1.6, 2.0 y 4.0) mg fosforo P/L, a una longitud de onda de 825nm⁴⁹.

El cálculo del porcentaje de recuperación se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida} \times 100}{\text{Concentración real}} \text{ Ecc. (9)}$$

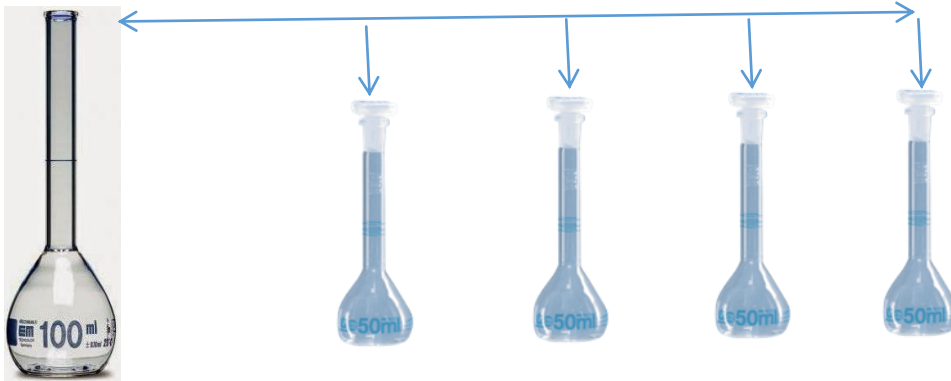
Preparación de estándares para la exactitud



Solución patrón de 1 ppm 40mL

mg fósforo P /L 0.8 ppm

⁴⁹Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultra violeta visible



Solución patrón de 10ppm	6 mL	8 mL	10 mL	20 mL
mg fósforo P /L	1.2 ppm	1.6 ppm	2.0 ppm	4 ppm

A cada matraz se añade 20mL de la solución reductora, se trabajó por triplicado.

3.2.2. LINEALIDAD

La linealidad de la curva de calibración se determinó utilizando cinco concentraciones diferentes con un rango de (0.1– 4.0) mg fósforo P /L, para la determinación de fósforo con tres repeticiones cada una, obteniéndose 15 lecturas, a una longitud de onda de 825nm. Este parámetro se evaluó por inspección visual del gráfico señal contra la concentración del analito y por dos métodos estadísticos apropiados: coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de correlación de Pearson (R). Estas determinaciones de linealidad no son excluyentes unas de otras⁵⁰.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (Y - \hat{Y})^2}{\sum (Y - \bar{Y})^2} \quad \text{Ecc. (10)}$$

Donde: $\hat{Y} = \sum y / n$

Coeficiente de Correlación de Pearson

$$R = \frac{[a \sum y + b \sum x - n(\hat{Y})^2]}{\sum y^2 - n\hat{Y}^2}$$

Donde:

$$\hat{Y} = \sum y / n$$

Ecc. (11)

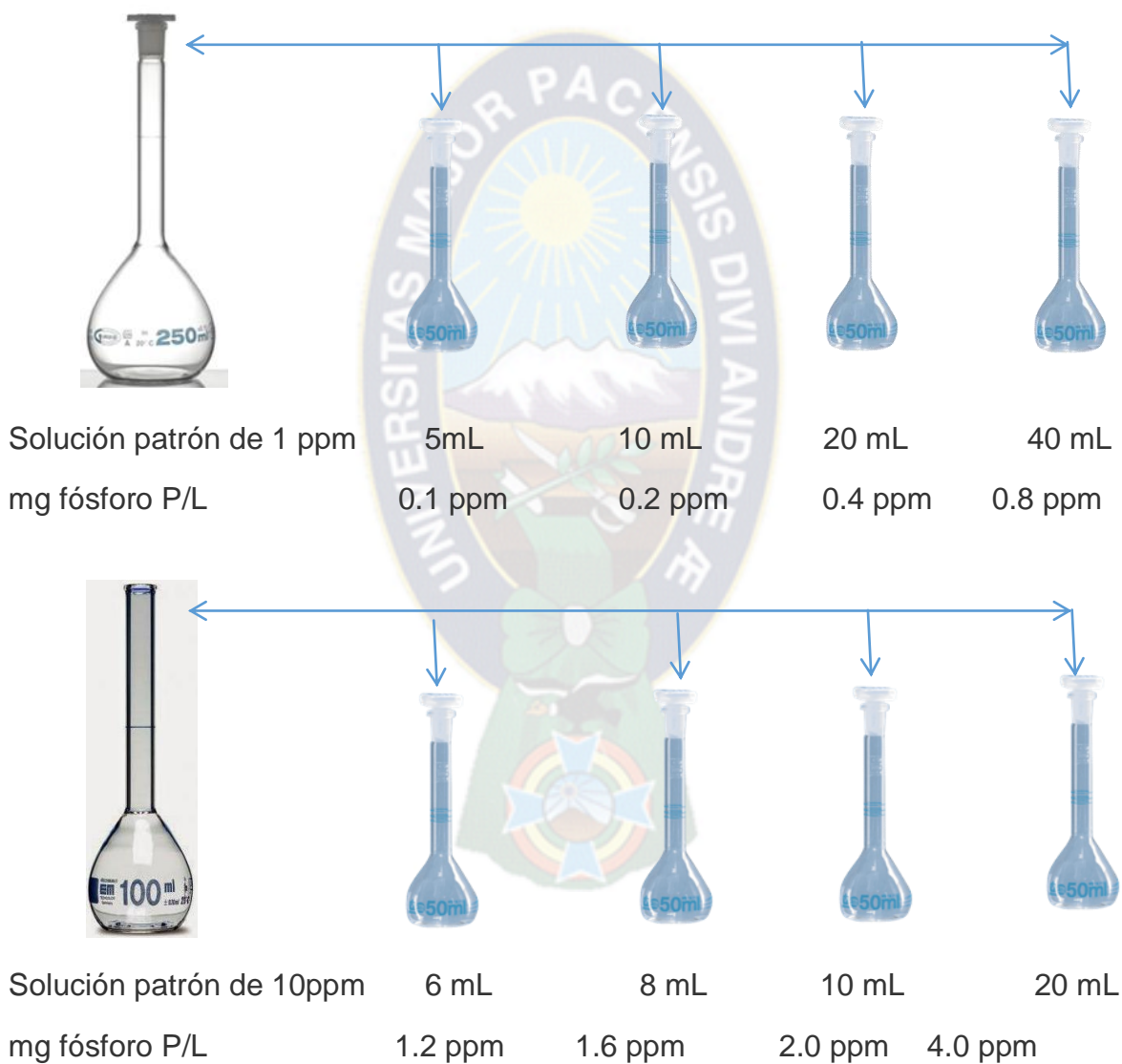
⁵⁰Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultra violeta visible

Para la linealidad se realizó la respectiva calibración de la curva obtenida con las respectivas concentraciones de fósforo mg P/L y sus absorbancias, y utilizando el coeficiente de correlación sabremos si el método presenta una linealidad y así obtener las respectivas concentraciones reales para cada concentración⁵¹.

Esto utilizando la ecuación de una recta:

$$Y_{\text{abs}} = A + BX_{\text{conc}} \quad \text{Ecc. (15)}$$

PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES PARA LA LINEALIDAD



⁵¹Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultra violeta visible

A cada matraz se añade 20mL de la solución reductora, se la realizó por triplicado llegando a calcularlas concentraciones reales de cada matraz con la calibración de la curva.

3.2.3. LÍMITE DE DETECCIÓN (LD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)

Las determinaciones de LD y LC, se realizaron posteriormente a la determinación del parámetro de linealidad, donde se aplicó una calibración lineal aplicando la ecuación de una recta:

$$Y_{\text{abs}} = A + BX_{\text{conc}} \quad \text{Ecc. (15)}$$

Para determinar los parámetros LD y LC se midieron cinco disoluciones de referencia de mg fósforo P/L para elaborar su curva de calibración. El análisis se realizó por triplicado para cada concentración

En tanto que para evaluar el límite de detección (LD) se trabajó en un rango de (0.1 - 0.8) mg fósforo P/L y el límite de cuantificación (LC) se trabajó en un rango de (0.1 a 2.0) mg fósforo P/L⁵².

Para determinar estos parámetros se utilizaron las ecuaciones que figuran

Límite de Cuantificación(LC)

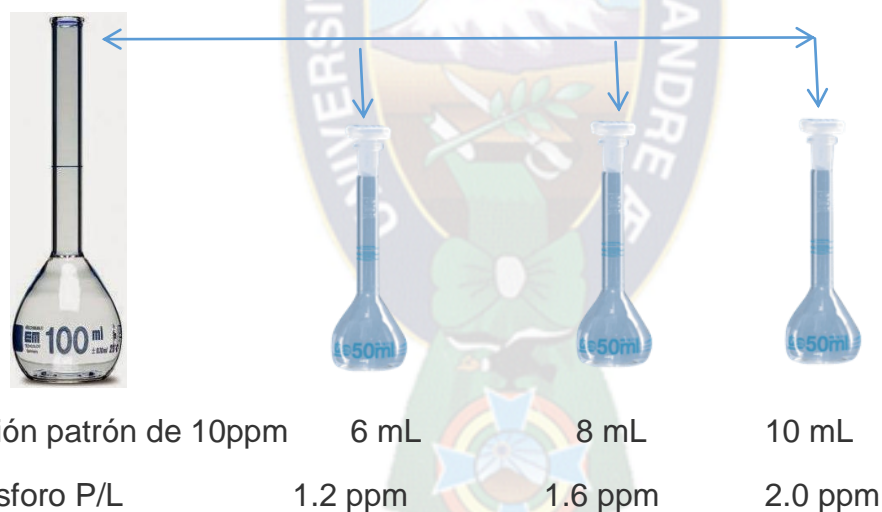
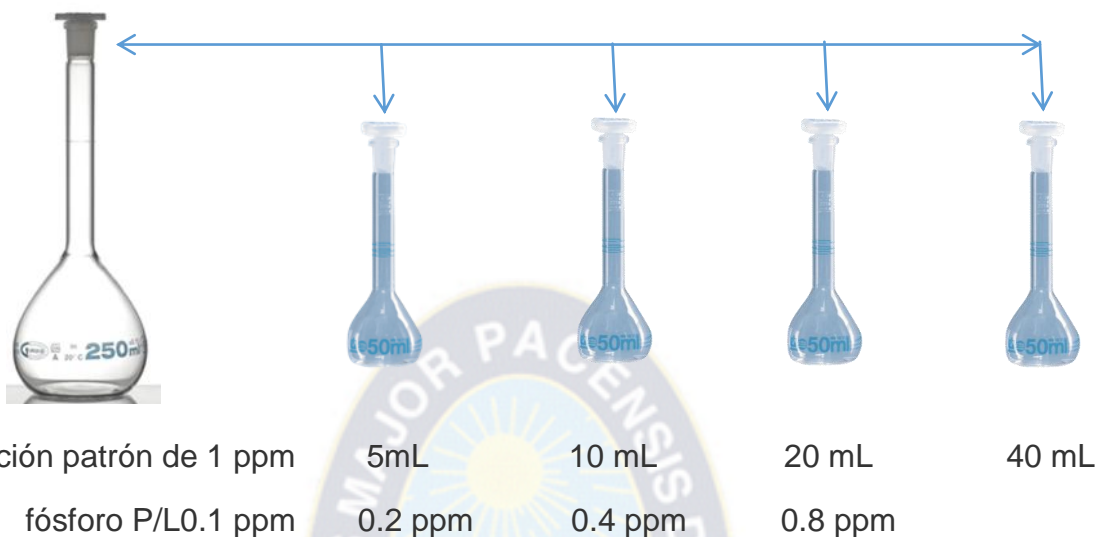
$$LC = \frac{10 \times S_{\text{Blancos}}}{B} \quad \text{Ecc. (14)}$$

Límite de detección (LD)

$$LD = \frac{3 \times S_{\text{Blancos}}}{B} \quad \text{Ecc. (13)}$$

⁵²Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultra violeta visible

PREPARACIÓN DE LOS ESTANDARES



A cada matraz se añade 20 mL de la solución reductora.

Todos los patrones preparados para la linealidad, exactitud límite de cuantificación y límite de detección deberán reposar a temperatura ambiente por lo menos unas 2 horas, esto con el fin de que reaccionen todos los patrones⁵³, si se quiere acelerar se recomienda calentar la soluciones 50°C por media hora.

⁵³Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultra violeta visible

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS Y RESULTADOS



CAPÍTULO 4

ANÁLISIS Y RESULTADOS

4.1. MATERIALES Y EQUIPOS

Los materiales y equipos utilizados se detallan en el siguiente cuadro⁵⁴.

Equipo	Uso
Estufa (LABORATORIO DE QMC-IND)	eliminación de humedad
Espectrofotómetro UV-mini 1240 (LABORATORIO DE QMC-IND)	Lectura de absorbancias a diferentes concentraciones de fósforo P
Balanza Analítica digital (LABORATORIO DE QMC-IND)	Medición de la masa de reactivos
Phmetro digital (LABORATORIO DE QMC-IND)	Lectura del P ^H de la muestra

MATERIAL DE VIDRIO Y ACCESORIOS

Pipeta volumétrica 1,5 mL	Pipeta graduada 10 mL
Bureta 50 mL	Varilla
Vaso de precipitado de 100,250,500 mL	Cepillo
Matraces aforados de 50, 100, 250, 500 mL	Piceta
Embudo analítico	Porta bureta
Matraz Erlenmeyer 250 mL	Soporte universal
Vidrio de reloj	Mortero
Propipeta	Espátula
Papel Phmetro	Porta embudo

REACTIVOS

Ácido sulfúrico
Ácido ascórbico
Fosfato monobásico
Molibdato de amonio

⁵⁴Material y reactivo del laboratorio de la carrera de Química Industrial Facultad de Tecnología UMSA

4.2. DATOS OBTENIDOS PARA EL ANÁLISIS DE LA MUESTRA AGUA RESIDUAL POR EL MÉTODO FOSFOMOLIBDATO DE AMONIO CON ÁCIDO ASCÓRBICO⁵⁵

4.2.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

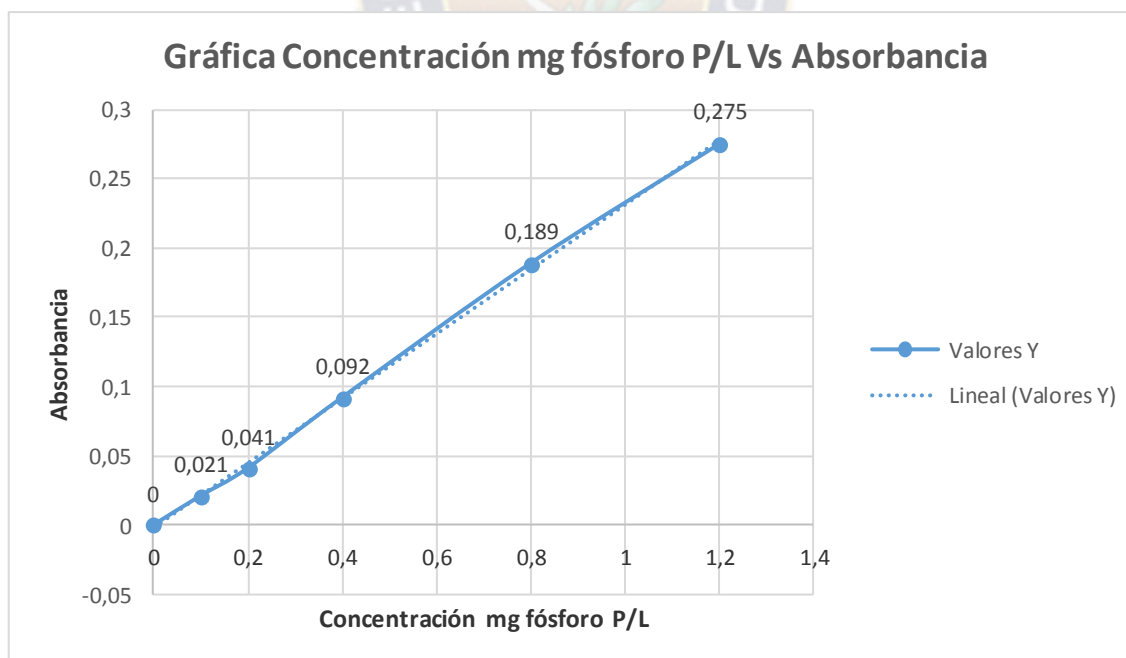
Tabla 4.3.1. Resultados obtenidos

Para determinar la concentración de fósforo en la muestra de agua residual se tomó una muestra por duplicado, su respectivo patrón de (0.0-1.2)mg fósforo P/L

n	Concentración mgfósforo P/L	Absorbancia
1	0.0	0.00
2	0.1	0.021
3	0.2	0.041
4	0.4	0.092
5	0.8	0.189
6	1.2	0.275

Muestras	Absorbancia
M _{1.0}	0.105
M _{1.1}	0.103

Gráfica 4.3.1. Calibración de la curva



⁵⁵Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultra violeta visible

$$A = -1.7348 \times 10^{-3}$$

$$B = 0.232744$$

$$r = 0.99961$$

Cálculo de las concentraciones de la muestra (se trabajó por duplicado)

Para este cálculo utilizamos la siguiente ecuación despejado (X= concentración de las respectivas muestras) y como dato tenemos sus respectivas absorbancias⁵⁶.

$$Y_{\text{abs}} = A + BX_{\text{conc}} \quad \text{Ecc. (14)}$$

Resultando la ecuación de la recta

$$Y_{\text{abs}} = -1.7348 \times 10^{-3} + 0.232744 \times X_{\text{conc}}$$

Despejando la concentración de la ecuación tenemos:

➤ Muestra 1.0

$$X_{1.0} = \frac{0.105 - (-1.7348 \times 10^{-3})}{0.232744} = 0.4586 \text{ mg P/L}$$

Aplicando el factor de dilución y la conversión de fósforo a fosfatos según la ecuación

$$\text{mg} \frac{PO_4^{-3}}{L} = \frac{\text{mg Fósforo P}}{L} \times \frac{94.9714 \text{ mg } PO_4^{-3}}{30.9738 \text{ mg fósforo P}} \times (fdn) \quad \text{Ecc. (13)}$$

$$\begin{aligned} \text{mg} \frac{PO_4^{-3}}{L} &= \frac{0.4586 \text{ mg Fósforo P}}{L} \times \frac{94.9714 \text{ mg } PO_4^{-3}}{30.9738 \text{ mg fósforo P}} \times (10) \\ &= 14.0615 \text{ mg} \frac{PO_4^{-3}}{L} \cong 14.06 \frac{PO_4^{-3}}{L} \end{aligned}$$

➤ Muestra 1.1.

$$X_{1.1} = \frac{0.103 - (-1.7348 \times 10^{-3})}{0.232744} = 0.450 \text{ mg P/L}$$

Aplicando el factor de dilución y la conversión de fósforo a fosfatos según la ecuación

$$\text{mg} \frac{PO_4^{-3}}{L} = \frac{\text{mg Fósforo P}}{L} \times \frac{94.9714 \text{ mg } PO_4^{-3}}{30.9738 \text{ mg fósforo P}} \times (fdn) \quad \text{Ecc. (13)}$$

⁵⁶Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

$$\begin{aligned} \text{mg} \frac{\text{PO}_4^{-3}}{\text{L}} &= \frac{0.450 \text{ mg Fósforo P}}{\text{L}} \times \frac{94.9714 \text{ mg PO}_4^{-3}}{30.9738 \text{ mg fósforo P}} \times (10) \\ &= 13.7978 \text{ mg} \frac{\text{PO}_4^{-3}}{\text{L}} \cong 13.80 \frac{\text{PO}_4^{-3}}{\text{L}} \end{aligned}$$

Tabla 4.3.2. Resultados de la muestra

n Muestra	Absorbancia	Factor de dilución	Concentración mg P-PO ₄ ⁻³ /L	DESVIACIÓN ESTÁNDAR mg P-PO ₄ ⁻³ /L
1.0	0.105	10	14.06	± 0.22
1.1	0.103	10	13.80	

4.3. DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO FOSFOMOLIBDATO DE AMONIO CON ÁCIDO ASCÓRBICO

Para la determinación de la exactitud, se realizará por triplicado, empleando la solución patrón de una concentración de (0.8 - 4.0) mg fósforo P/L expresando los resultados en % de recuperación la cual se utilizará la respectiva ecuación⁵⁷:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración real}} \times 100 \text{ Ecc. (9)}$$

4.3.1. DATOS OBTENIDOS EN EL TETSPARA LA OBTENCIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO

Test de exactitud # 1

n	Concentración mg fósforo P/L	Absorbancia
1	0.8	0.183
2	1.2	0.256
3	1.6	0.330
4	2.0	0.477
5	4.0	0.882

⁵⁷Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

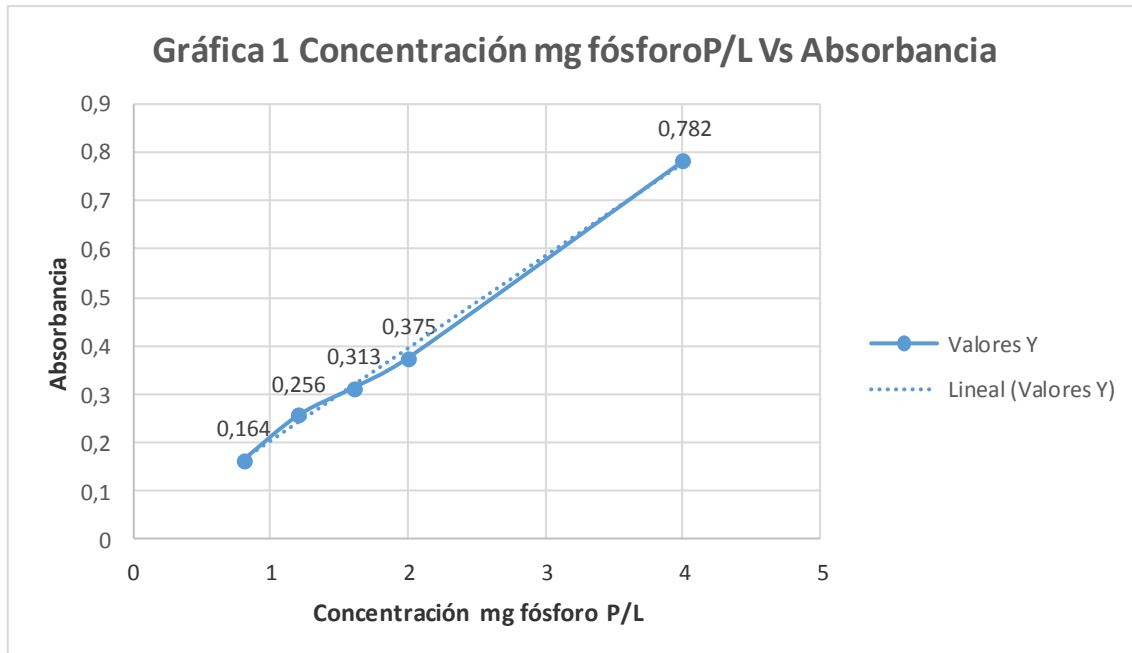
Determinación del coeficiente de correlación (r) para verificar la linealidad

$$A = -5.3608 \times 10^{-4}$$

$$B = 0.221946$$

$$r = 0.996915$$

Gráfica 4.3.1.1. Test de exactitud # 1



Cálculo de las concentraciones reales para cada una de las concentraciones para ello utilizaremos la ecuación⁵⁸:

$$Y_{abs} = A + BX_{conc} \quad \text{Ecc. (15)}$$

Despejando la concentración tenemos

$$X_{conc 1} = \frac{Y_{Abs 1} - A}{B}$$

✓ Para la concentración de 0.8 mg fósforo P/L

$$Abs 1 = 0.183$$

$$X_{conc 1} = \frac{0.183 - (-5.3608 \times 10^{-4})}{0.221946} = 0.826940 \frac{mg \text{ fósforo P}}{L}$$

⁵⁸Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

✓ Para la concentración de 1.2 **mg fósforo P/L**⁵⁹

Abs 2 = 0.256

$$X_{conc 2} = \frac{0.256 - (-5.3608 \times 10^{-4})}{0.221946} = 1.155849 \frac{mg \text{ fósforo P}}{L}$$

✓ Para la concentración de 1.6**mg fósforo P/L**

Abs 3 = 0.330

$$X_{conc 3} = \frac{0.330 - (-5.3608 \times 10^{-4})}{0.221946} = 1.489263 \frac{mg \text{ fósforo P}}{L}$$

✓ Para la concentración de 2.0 **mg fósforo P/L**

Abs 4 = 0.477

$$X_{conc 4} = \frac{0.477 - (-5.3608 \times 10^{-4})}{0.221946} = 2.151587 \frac{mg \text{ fósforo P}}{L}$$

✓ Para la concentración de 4.0 **mg fósforo P/L**

Abs 5 = 0.882

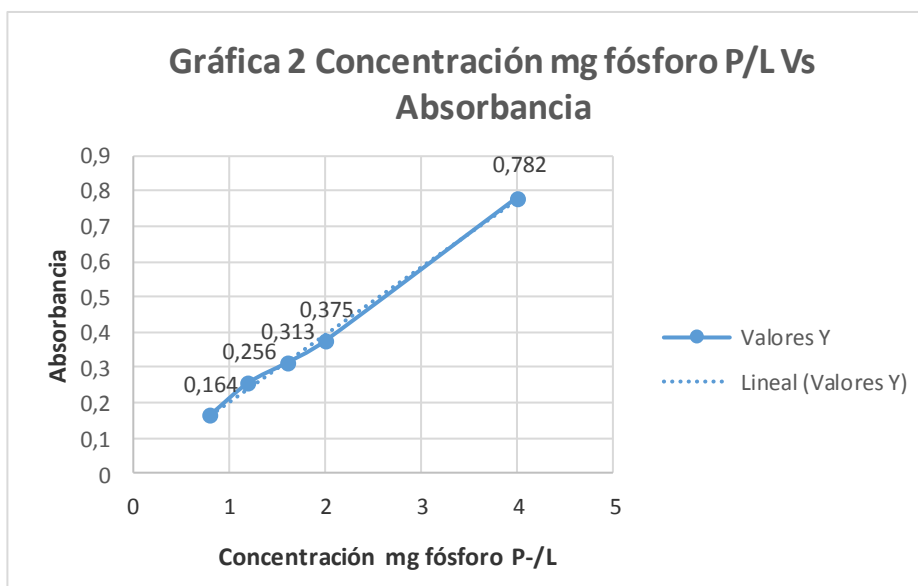
$$X_{conc 5} = \frac{0.882 - (-5.3608 \times 10^{-4})}{0.221946} = 3.976355 \frac{mg \text{ fósforo P}}{L}$$

Test de exactitud # 2

n	Concentración mg fósforo P/L	Absorbancia
1	0.8	0.164
2	1.2	0.259
3	1.6	0.313
4	2.0	0.375
5	4.0	0.782

⁵⁹Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

Gráfica 4.3.1.2. test de exactitud # 2



Determinación del coeficiente de correlación (r) para verificar la linealidad⁶⁰

$$A = 0.011722$$

$$B = 0.191082$$

$$r = 0.998381$$

Calculo de las concentraciones reales para cada una de las concentraciones para ello utilizaremos la ecuación:

$$Y_{abs} = A + BX_{conc} \quad \text{Ecc. (15)}$$

Despejando la concentración tenemos

$$X_{conc 1} = \frac{Y_{Abs 1} - A}{B}$$

✓ Para la concentración de 0.8mg fósforo P/L

$$\text{Abs 1} = 0.164$$

$$X_{conc 1} = \frac{0.164 - 0.011722}{0.191082} = 0.796925 \text{ mg fósforo P/L}$$

⁶⁰Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

✓ Para la concentración de 1.2mg fósforo P/L

Abs 2 = 0.259

$$X_{conc2} = \frac{0.259 - 0.011722}{0.191082} = 1.294093 \text{ mg fósforo P/L}$$

✓ Para la concentración de 1.6mg fósforo P/L⁶¹

Abs 3 = 0.313

$$X_{conc3} = \frac{0.313 - 0.011722}{0.191082} = 1.576695 \text{ mg fósforo P/L}$$

✓ Para la concentración de 2.0mg fósforo P/L

Abs 4 = 0.375

$$X_{conc4} = \frac{0.375 - 0.011722}{0.191082} = 1.901163 \text{ mg fósforo P/L}$$

✓ Para la concentración de 4.0mg fósforo P/L

Abs 5 = 0.782

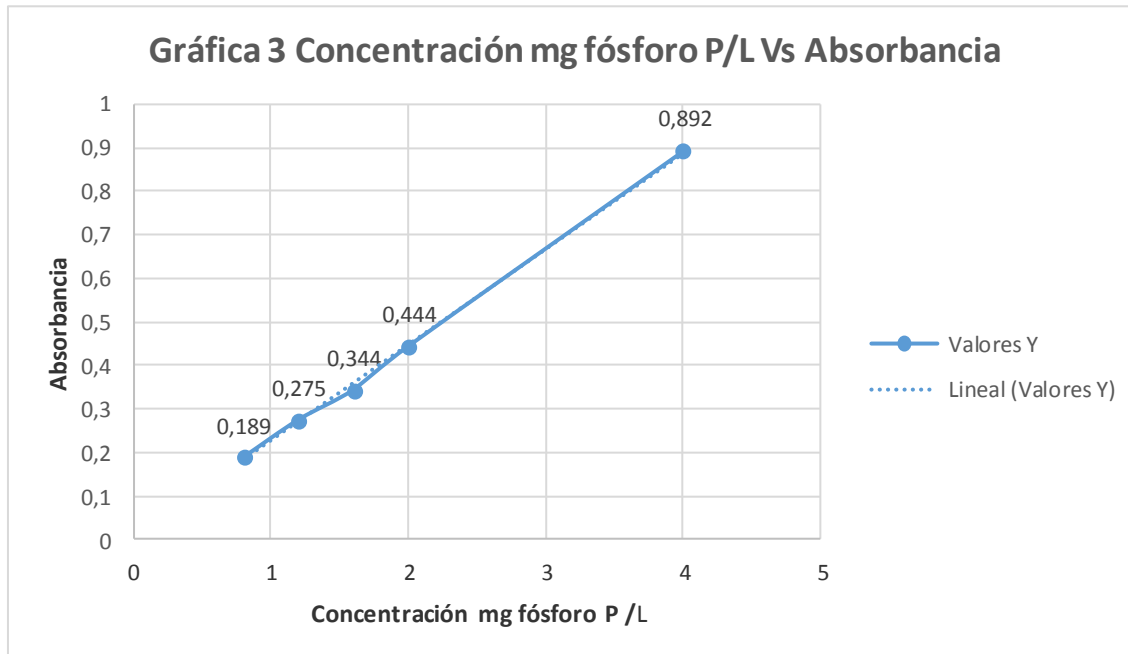
$$X_{conc5} = \frac{0.782 - 0.011722}{0.191082} = 4.031138 \text{ mg fósforo P/L}$$

Test de exactitud # 3

N	Concentración mg fósforo P/L	Absorbancia
1	0.8	0.189
2	1.2	0.275
3	1.6	0.344
4	2.0	0.444
5	4.0	0.892

⁶¹Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

Gráfica 4.3.1.3. Test de exactitud # 3⁶²



Determinación del coeficiente de correlación (r) para verificar la linealidad⁶³

$$A = 4.7422 \times 10^{-3}$$

$$B = 0.220863$$

$$r = 0.999497$$

Calculo de las concentraciones reales para cada una de las concentraciones para ello utilizaremos la ecuación:

$$Y_{\text{abs}} = A + B X_{\text{conc}} \quad \text{Ecc. (15)}$$

Despejando la concentración tenemos

$$X_{\text{conc } 1} = \frac{Y_{\text{Abs } 1} - A}{B}$$

✓ Para la concentración de 0.8 **mg fósforo P/L**

$$\text{Abs } 1 = 0.189$$

⁶²Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

$$X_{conc1} = \frac{0.189 - 4.7422 \times 10^{-3}}{0.220863} = 0.834263 \text{ mg fósforo P/L}$$

✓ Para la concentración de 1.2 mg fósforo P/L

Abs 2 = 0.275

$$X_{conc2} = \frac{0.275 - 4.7422 \times 10^{-3}}{0.220863} = 1.223644 \text{ mg fósforo P/L}$$

✓ Para la concentración de 1.6 mg fósforo P/L

Abs 3 = 0.344

$$X_{conc3} = \frac{0.344 - 4.7422 \times 10^{-3}}{0.220863} = 1.536055 \text{ mg fósforo P/L}$$

✓ Para la concentración de 2.0 mg fósforo P/L

Abs 4 = 0.375

$$X_{conc4} = \frac{0.375 - 4.7422 \times 10^{-3}}{0.220863} = 1.676414 \text{ mg fósforo P/L}$$

✓ Para la concentración de 4.0 mg fósforo P/L

Abs 5 = 0.892

$$X_{conc5} = \frac{0.892 - 0.011722}{0.191082} = 4.017231 \text{ mg P-PO}_4\text{/L}$$

Tabla 4.3.1. Resultados obtenidos para la exactitud a partir de las 5 concentraciones de mg fósforo P/L por triplicado.

Réplica	Concentración de mg fósforo P/L				
	0.8	1.2	1.6	2.0	4.0
1	0.826940	1.155849	1.489263	2.151588	3.976355
2	0.796925	1.294093	1.576695	1.901163	4.031138
3	0.834263	1.223644	1.536055	1.676414	4.017231
promedio	0.819376	1.224529	1.534004	1.909722	4.008241
Desviación estándar	±0.0198	±0.0691	±0.0437	±0.2377	±0.0286
Recuperación (%)	101.80	102.07	99.99	99.99	99.99
%CV	2.416	5.643	2.849	12.447	0.714

Promedio % de recuperación = 100.77%; %CV= 2.3244

Para su confirmación se aplicara una prueba de significancia: prueba de t-student

$$t_{exp} = \frac{|100 - x| * \sqrt{n}}{CV}$$

$$t_{exp} = \frac{|100 - 100.77| * \sqrt{3}}{2.3244} = 0.5738$$

$$t_{exp} = 0.5738$$

$$t_{tabla} = (\alpha = 0.05; gL = n - 1) = t_{tabla} = 4.303$$

$t_{exp} < t_{tabla}$ No existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% por lo que la exactitud es correcta.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO FOSFOMOLIBDATO DE AMONIO CON ÁCIDO ASCÓRBICO

La linealidad de la curva de calibración se determinó utilizando cinco concentraciones patrones diferentes con un rango de (0.1– 4.0) mg fósforo P /L, para la determinación de fósforo con tres repeticiones cada una, obteniéndose 15 lecturas, a una longitud de onda de 825nm⁶⁴.

4.4.1. Datos para la curva de calibración de mg fósforo/L

Tabla 4.4.1

n	Concentración de mg fósforo P /L X	Absorbancias Y	X ²	Y ²	X*Y
blanco	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.1	0.021	0.01	4.41x10 ⁻⁴	2.1x10 ⁻³
2	0.2	0.041	0.04	1.681x10 ⁻³	8.2x10 ⁻³
3	0.4	0.092	0.16	8.464x10 ⁻³	0.0368
4	0.8	0.189	0.64	0.035721	0.1512
5	1.2	0.275	1.44	0.075625	0.3300
6	1.6	0.344	2.56	0.118336	0.5344
7	2.0	0.444	4.00	0.197136	0.888
8	4.0	0.892	16.00	0.795664	3.568
	$\sum X = 10.30$	$\sum Y = 2.298$	$\sum X^2 = 24.850$	$\sum Y^2 = 1.233068$	$\sum X * Y = 5.5187$

⁶⁴Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

Regresión lineal por mínimos cuadrados

$$B = \frac{n \times \sum X * Y - \sum X \times \sum Y}{n \times \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$B = \frac{8 \times 5.5187 - 10.31 \times 2.298}{8 \times 24.850 - 10.30^2} = 0.222379$$

$$A = \frac{\sum Y - B \times \sum X}{n}$$

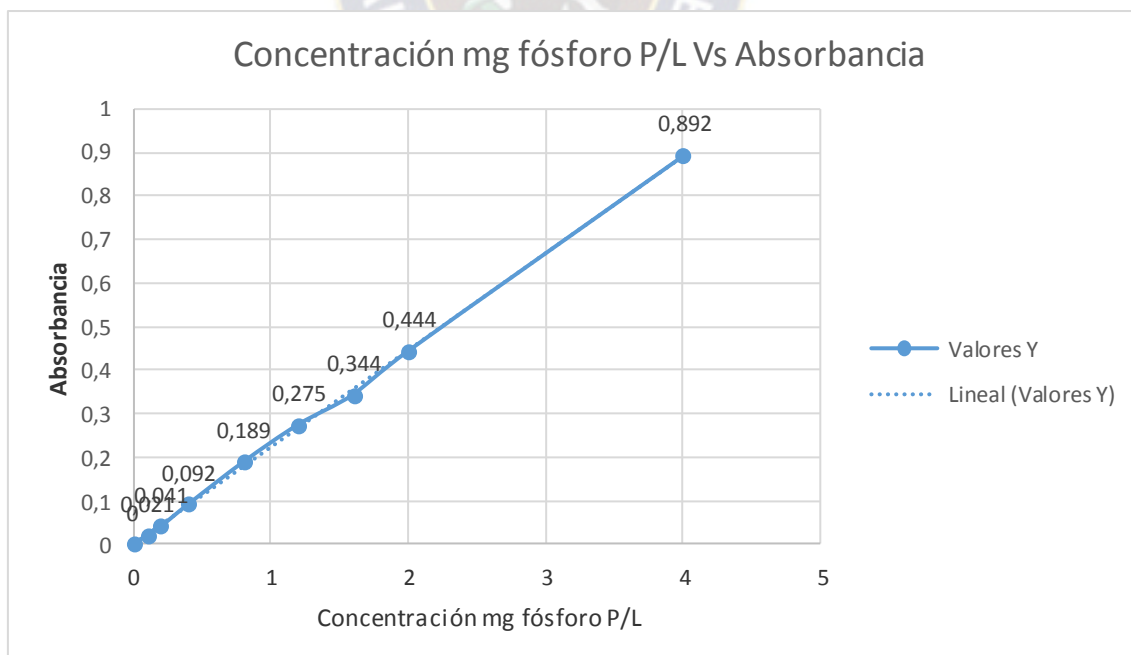
$$A = \frac{0.243 - 0.01109092 \times 88.80}{8} = 8.3268 \times 10^{-4}$$

$$r^2 = \frac{(8 \times 5.5187 - 10.31 \times 2.298)^2}{(8 \times 24.850 - 10.31^2)(8 \times 1.233068 - (2.298)^2)} = 0.981725$$

$$r^2 = 0.981725$$

$$r = 0.999727$$

Gráfica4.4.1. Curva de calibración de la recta para la linealidad⁶⁵



⁶⁵Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

Ecuación de la recta

$$Y_{\text{abs}} = A + BX_{\text{conc}}$$

$$Y_{\text{abs}} = 8.3268 \times 10^{-4} + 0.222379 X_{\text{conc}}$$

Por la recta que nos da se puede constatar que la recta es lineal por lo tanto el método fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico es lineal⁶⁶.

4.4.2. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Tabla 4.4.2. Linealidad del método Fosfomolibdato de Amonio con Ácido Ascórbico.

n	Concentración de <i>mg fósforo P/L</i> X	Absorbancias Y	X ²	Y ²	X*Y
blanco	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.1	0.020	0.01	4x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³
2	0.1	0.020	0.01	4x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³
3	0.1	0.021	0.01	4.41x10 ⁻⁴	0.021
1	0.2	0.045	0.04	2.025x10 ⁻³	9x10 ⁻³
2	0.2	0.040	0.04	1.6x10 ⁻³	8x10 ⁻³
3	0.2	0.041	0.04	1.681x10 ⁻³	8.2x10 ⁻³
1	0.4	0.091	0.16	8.281x10 ⁻³	0.0364
2	0.4	0.080	0.16	6.4x10 ⁻³	0.0320
3	0.4	0.092	0.16	8.464x10 ⁻³	0.0368
1	0.8	0.183	0.64	0.033489	0.1464
2	0.8	0.164	0.64	0.026896	0.1312
3	0.8	0.189	0.64	0.035721	0.1512
1	1.2	0.256	1.44	0.065536	0.3072
2	1.2	0.259	1.44	0.067081	0.3108
3	1.2	0.275	1.44	0.075625	0.3300
1	1.6	0.330	2.56	0.1089	0.5280
2	1.6	0.313	2.56	0.0977969	0.5008
3	1.6	0.344	2.56	0.118336	0.5504
1	2.0	0.477	4.00	0.227529	0.9540
2	2.0	0.375	4.00	0.140625	0.7500
3	2.0	0.444	4.00	0.197136	0.8880

⁶⁶Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

1	4.0	0.882	16.00	0.777924	3.5280
2	4.0	0.782	16.00	0.611524	3.1280
3	4.0	0.892	16.00	0.795664	3.5680
	$\sum X = 30.9$	$\sum Y = 6.615$	$\sum X^2 = 74.55$	$\sum Y^2 = 3.411458$	$\sum X * Y = 15.4266$

$$B = \frac{n \times \sum X * Y - \sum X \times \sum Y}{n \times \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$B = \frac{24 \times 15.4266 - 30.9 \times 6.615}{24 \times 74.55 - 30.9^2} = 0.196324$$

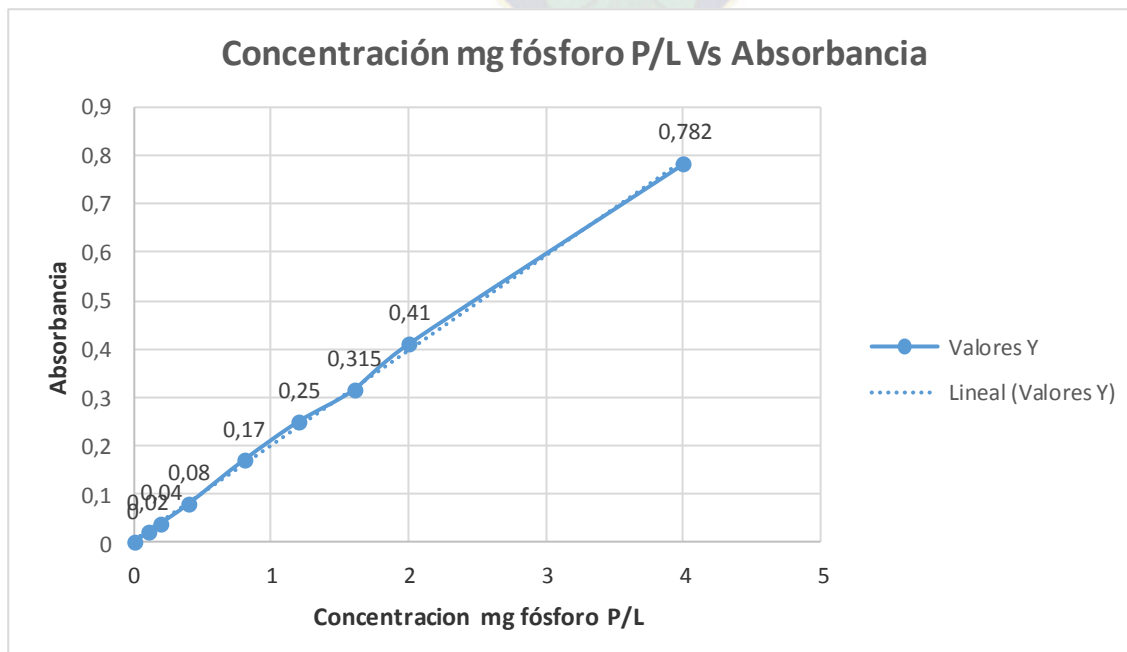
$$A = \frac{\sum Y - B \times \sum X}{n}$$

$$A = \frac{6.615 - 0.198750 \times 30.9}{24} = 4.9843 \times 10^{-3}$$

$$r^2 = \frac{(24 \times 15.4266 - 30.9 \times 6.615)^2}{(24 \times 74.55 - 30.9^2)(24 \times 3.411458 - (6.615)^2)} = 0.99792$$

$$r = 0.999536$$

Gráfica 4.4.2. Linealidad del método



4.4.3. ANALÍISIS DE LAVARIANZA: ANOVA

Test de Cochran⁶⁷

Concentración mg fósforo P /L X	f(y/x)	Promedio	Desviación estándar S	Varianza S ²
0.1	0.2000	0.2033	0.0047	2.209×10^{-5}
0.1	0.2000			
0.1	0.2100			
0.2	0.2250	0.2100	0.0108	1.166×10^{-4}
0.2	0.2000			
0.2	0.2050			
0.4	0.2275	0.2192	0.0136	1.849×10^{-4}
0.4	0.2000			
0.4	0.2300			
0.8	0.2288	0.2231	0.0132	1.742×10^{-4}
0.8	0.2050			
0.8	0.2363			
1.2	0.2133	0.2194	0.0070	4.9×10^{-5}
1.2	0.2158			
1.2	0.2292			
1.6	0.2063	0.2056	0.0080	6.4×10^{-5}
1.6	0.1956			
1.6	0.2150			
2.0	0.2385	0.2160	0.0212	4.49×10^{-4}
2.0	0.1875			
2.0	0.2220			
4.0	0.2205	0.2130	0.0124	1.538×10^{-4}
4.0	0.1955			
4.0	0.2230			

$$G_{exp} = \frac{S_{máxima}^2}{\sum S_i^2}$$

G_{exp}

$$= \frac{4.49 \times 10^{-4}}{2.209 \times 10^{-5} + 1.166 \times 10^{-4} + 1.849 \times 10^{-4} + 1.742 \times 10^{-4} + 4.9 \times 10^{-5} + 6.4 \times 10^{-5} + 4.49 \times 10^{-4} + 1.538 \times 10^{-4}}$$

$$G_{exp} = 0.36998$$

⁶⁷Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

$$G_{tablas} = (\alpha = 0.05; k = 8; n = 3)$$

$$G_{tablas} = 0.653$$

$G_{exp} < G_{tablas}$ Significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Por lo que se llega a la conclusión de que la regresión es representativa⁶⁸.

4.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO FOSFOLIBDATO DE AMONIO CON ÁCIDO ASCÓRBICO

Se realizaron las respectivas lecturas a la longitud de onda de 825 nm por triplicado de 0.1 – 2.0 mg fósforo P/L

Tabla 4.1 resultados del límite de cuantificación

n	Concentración teórica mg fósforo P /L	Concentración real mg fósforo P/L X	Absorbancia Y	X ²	Y ²	XY
1	0.1	0.0844	0.021	7.12x10 ⁻³	4.41x ⁻⁴	1.7724x10 ⁻³
2	0.2	0.1751	0.041	0.0307	1.681x10 ⁻³	7.1791x10 ⁻³
3	0.4	0.4064	0.092	0.1652	8.464x10 ⁻³	0.03739
4	0.8	0.8462	0.189	0.7161	0.03572	0.15993
5	1.2	1.2362	0.275	1.5282	0.07563	0.33995
6	1.6	1.5491	0.344	2.3997	0.11834	0.53289
7	2	2.0025	0.444	4.0101	0.19714	0.88911
		$\sum X = 6.2999$	$\sum Y = 1.406$	$\sum X^2 = 7.8571$	$\sum Y^2 = 0.4374$	$\sum XY = 1.9682$

Pendiente

$$B = \frac{n \times \sum X * Y - \sum X \times \sum Y}{n \times \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$B = \frac{7 \times 1.9682 - 6.2999 \times 1.406}{7 \times 7.8571 - 6.2999^2} = 0.22053459$$

⁶⁸Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

$$A = \frac{\sum Y - B \times \sum X}{n}$$

$$A = \frac{1.406 - 0.22053459 \times 6.2999}{7} = 2.376010 \times 10^{-3}$$

$$r^2 = \frac{(7 \times 1.9682 - 6.2999 \times 1.406)^2}{(7 \times 7.8571 - 6.2999^2)(7 \times 0.4374 - (1.406)^2)} = 0.9987$$

$$r = 0.998909$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$\frac{S_y^2}{x} = \frac{\sum Y^2 - B \times \sum XY - A \times \sum Y}{n - 2}$$

$$\frac{S_y^2}{x} = \frac{0.4374 - 0.22053459 \times 1.9682 - 2.376010 \times 10^{-3} \times 1.406}{7 - 2} = 6.2998 \times 10^{-7}$$

$$S_B^2 = \frac{\frac{S_y^2}{x}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$S_B^2 = \frac{6.2998 \times 10^{-7}}{7.8571 - \frac{(6.2999)^2}{7}} = 2.8802 \times 10^{-7}$$

$$S_B = 5.3667 \times 10^{-4}$$

Intervalo de confianza⁶⁹

$$IC = B \pm t_{tablas} S_B \quad t_{tablas} (\alpha = 0.05; gL = n - 2) = t_{tabla} = 2.571$$

$$IC = 0.22053459 \pm 2.571 \times 5.3667 \times 10^{-4}$$

$$IC = 0.22053459 \pm 1.3798 \times 10^{-3}$$

$$IC = 0.2219 ; 0.2191$$

Tabla 4.2. Resultado de blancos mg fósforo P/L

⁶⁹Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

Blancos n	Absorbancias Y	Y ²
1	0.000	0.000
2	0.001	1.6x10 ⁻⁶
3	0.001	1.6x10 ⁻⁶
4	0.000	0.000
5	0.001	1.6x10 ⁻⁶
	$\sum Y = 0.003$	$\sum Y^2 = 3x10^{-6}$

Desviación estándar de los blancos

$$S_{Blancos} = \sqrt{\frac{n \times \sum Y^2 - (\sum Y)^2}{n(n-1)}}$$

$$S_{Blancos} = \sqrt{\frac{5 \times 3x10^{-6} - (0.003)^2}{5(5-1)}} =$$

$$S_{Blancos} = 5.4772x10^{-4}$$

Límite de cuantificación

$$LC = \frac{10 \times S_{Blancos}}{B}$$

$$LC = \frac{10 \times 5.4772x10^{-4}}{0.22053459}$$

$$LC = 0.0248 \text{ ppm Fósforo P/L} \cong 0.02 \text{ ppm Fósforo P/L}$$

El límite de cuantificación se comprobó de forma práctica con la ayuda del espectrofotómetro shimadzu UV-mini 1240, concluyendo que el equipo es capaz de cuantificar hasta 0.1 ppm fósforo P; pero con la ayuda de cálculos estadísticos se determinó un valor de **0.0248 ppm fósforo P/L** \cong **0.02 ppm fósforo P/L** para la determinación de fósforo además el valor de la pendiente se encuentra dentro

del intervalo de confianza de la misma y el coeficiente de determinación $r^2 = 0.9987$ mayor que 0.98⁷⁰.

4.6. LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO FOSFOMOLIBDATO DE AMONIO CON ÁCIDO ASCÓRBICO

Se realizaron las respectivas lecturas a la longitud de onda de 825 nm por triplicado de 0.1 – 0.8 mg Fósforo P/L.

4.6.1. Tabla de resultados del límite de detección.

n	Concentración teórica mg fósforo P/L	Concentración real mg fósforo P/L X	Absorbancia Y	X ²	Y ²	XY
1	0.1	0.0958	0.020	9.1776x10 ⁻³	4x ⁻⁴	1.916x10 ⁻³
2	0.2	0.2036	0.045	0.041453	2.025x10 ⁻³	9.162x10 ⁻³
3	0.4	0.4019	0.091	0.161524	8.281x10 ⁻³	0.036573
4	0.8	0.7987	0.183	0.637922	0.033489	0.146162
		$\sum X = 1.5$	$\sum Y = 0.339$	$\sum X^2 = 0.850077$	$\sum Y^2 = 2.85x10^{-4}$	$\sum XY = 0.193813$

Pendiente

$$B = \frac{n \times \sum X * Y - \sum X \times \sum Y}{n \times \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$B = \frac{4 \times 0.193813 - 1.5 \times 0.339}{4 \times 0.850077 - 1.5^2} = 0.231913$$

$$A = \frac{\sum Y - B \times \sum X}{n}$$

$$A = \frac{0.339 - 0.231913 \times 1.5}{4} = -2.21739 \times 10^{-3}$$

⁷⁰Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

$$r^2 = \frac{(4 \times 0.193813 - 1.5 \times 0.339)^2}{(4 \times 0.850077 - 1.5^2)(4 \times 2.85 \times 10^{-4} - (0.339)^2)} = 0.99867$$

$$r = 0.99937$$

Intervalo de confianza

$$\frac{S_y^2}{x} = \frac{\sum Y^2 - B \times \sum XY - A \times \sum Y}{n - 2}$$

$$\frac{S_y^2}{x} = \frac{2.85 \times 10^{-4} - 0.231913 \times 0.193813 - (-2.21739 \times 10^{-3} \times 0.339)}{4 - 2} = 0.021954$$

$$S_B^2 = \frac{\frac{S_y^2}{x}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$S_B^2 = \frac{0.021954}{0.850077 - \frac{(1.5)^2}{4}} = 0.076341$$

$$S_B = 0.276299$$

Intervalo de confianza

$$IC = B \pm t_{tablas} S_B \quad t_{tablas} (\alpha = 0.05; gL = n - 2)$$

$$IC = 0.231913 \pm 4.303 \times 0.276299 \quad t_{tablas} = 4.303$$

$$IC = 0.231913 \pm 1.188914$$

$$IC = 1.420828; 0.957001$$

Tabla 4.2. Resultado de blancos mg fósforo P/L

Blancos	Absorbancias	Y2
n	Y	
1	0.000	0.000
2	0.001	1.6x10 ⁻⁶
3	0.001	1.6x10 ⁻⁶

4	0.000	0.000
5	0.001	1.6x10 ⁻⁶
	$\sum Y = 0.003$	$\sum Y^2 = 3x10^{-6}$

Desviación estándar de los blancos

$$S_{Blancos} = \sqrt{\frac{n \times \sum Y^2 - (\sum Y)^2}{n(n-1)}}$$

$$S_{Blancos} = \sqrt{\frac{5 \times 3x10^{-6} - (0.003)^2}{5(5-1)}} =$$

$$S_{Blancos} = 5.4772x10^{-4}$$

Límite de detección

$$LD = \frac{3 \times S_{Blancos}}{B}$$

$$LD = \frac{3 \times 5.4772x10^{-4}}{0.231913} = 7.085x10^{-3} \text{ mg fósforo P/L} \cong 0.01 \text{ mg fósforo P/L}$$

Como el límite de cuantificación es únicamente cualitativo, el resultado nos muestra que **0.01** ppm fósforo P aún se detecta la señal por el equipo, este valor es hallado con la aplicación de cálculos estadísticos⁷¹.

4.7. Intervalo (rango)

Para el intervalo del método se considera que debe estar conformado por el valor máximo confiable del parámetro de la linealidad y el valor del parámetro del límite de cuantificación, donde ambos valores no presentan desviación considerable de la ley de Beer.

Por lo que es el intervalo del método es:

0.01 ppm fósforo P - 4.00 ppm fósforo P

⁷¹Validación de métodos laboratorios farmacéuticos Lafar

CAPÍTULO 5

RESULTADOS



CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1. RESULTADOS OBTENIDOS DEL MÉTODO PROPUESTO

Método fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico

A continuación se presentan los resultados de los parámetros de desempeño esto para los parámetros que se consideró para la optimización del método de azul fosfomolibdato.

Misma que nos reporta resultados favorables para la aplicación de este método, los cuales, nos lanzaron resultados de linealidad, exactitud límite de detección y cuantificación aceptables mismas que se reflejan en el siguiente cuadro.

Parámetro	Criterios de aceptación	Resultados obtenidos
exactitud	Valor aceptable del % de recuperación 99.00-101.00%	% de recuperación = 100.77% Cv = 2.3244%
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$ análisis de varianza $G_{exp} < G_{tablas}$	$A = 4.9893 \times 10^{-3}$ $B = 0.196324$ $r^2 = 0.99792$ $r = 0.999536$ $G_{exp} < G_{tablas}$ se cumple
Límite de cuantificación	$r^2 \geq 0.98$ el IC no debe incluir el cero	$0.0248 \text{ ppm P} \cong 0.02 \text{ ppm P}$ IC = 0.2219 ; 0.2191
Límite de detección	$r^2 \geq 0.98$ el IC no debe incluir el cero	$7.085 \times 10^{-3} \text{ ppm P}$ $\cong 0.01 \text{ ppm P}$ IC = 1.420828; 0.957001
intervalo	Intervalo al valor máximo cuantificable del parámetro de linealidad y el valor del parámetro de limite cuantificación.	$(0.01 - 4.00) \text{ ppm fósforo P}$

- ✓ La linealidad del método nos reportó una linealidad con un coeficiente de correlación $r = 0.999536$ que es aceptable lo cual nos demuestra que existe la linealidad del método; a comparación del método colorimétrico con cloruro estañoso donde existe una clara varianza en la inestabilidad

consecuencia de este reductor que reportaba inestabilidad en la linealidad; llegando a la conclusión de que si es lineal el método.

- ✓ Para la exactitud nos dieron resultados favorables las cuales se los interpretó con el porcentaje de recuperación promedio de un 100.77 % la misma que se encuentra en el rango de aceptación (99-101.00) %.
- ✓ El límite de cuantificación del método analítico azul de fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico fue de **0.0248 ppm Fósforo P/L \cong 0.02 ppm Fósforo P/L** La cual nos indica que es la mínima cantidad de analíto presente en la muestra que se puede cuantificar bajo las condiciones experimentales descritas para dicho método, con la exactitud obtenida anteriormente.
- ✓ El límite de detección que se pudo obtener con el método azul de fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico reportando la mínima cantidad de analíto presente en la muestra que fue de **7.085×10^{-3} mg fósforo P/L \cong 0.007 mg fósforo P/L** lo que nos puede detectar claramente a partir de una concentración de 0 ppm de fósforo dándonos favorables resultados para la aplicación de este método planteado.
- ✓ Con los parámetros estadísticos que obtuvimos en el trabajo, nos indica que el método aplicado (azul de fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico) es válido para la determinación de fósforo reportando resultados favorables, logrando la optimización del método.

RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA MUESTRA

Con el método aplicado se pudo evidenciar la presencia de contenido fosfatos en una muestra de agua residual misma reportando resultados:

Tabla 4.3.2. Resultado de la muestra

n Muestra	Absorbancia	Factor de dilución	Concentración mg P-PO ₄ ⁻³ /L	DESVIACIÓN ESTÁNDAR mg P-PO ₄ ⁻³ /L
1.0	0.105	10	14.06	± 0.22
1.1	0.103	10	13.80	

- ✓ Las mismas que reporta resultados que están en rango según la legislación europea nos indican que el límite máximo en concentración de fosfatos es de 10-15 ppm de fosfatos, comparando con nuestros resultados se encuentran por en rango y son aceptables.
- ✓ Con los parámetros estadísticos de linealidad y exactitud que se determinó, nos muestra la veracidad del método aplicado, y el tratamiento que se da a

la muestra, son óptimos para el análisis de fósforo para luego interpretarlas como fosfatos en una muestra de agua residual.

- ✓ Entre estos parámetros estadísticos más importantes para el análisis de la muestra, está el límite de detección donde el agua residual que se analizó no esta tan contaminada y además entra en el rango de detección que es de **$7.085 \times 10^{-3} \text{mg fósforo P/L} \cong 0.01 \text{mg fósforo P/L}$** que se encuentran por muy debajo de las concentraciones obtenidas de la muestra de agua residual analizada.
- ✓ Otro parámetro estadístico para el análisis de la muestra es el límite de cuantificación en un rango de **$(0.0248 \text{ ppm Fósforo P/L} \cong 0.02 \text{ ppm Fósforo P/L})$** donde el equipo (espectrofotómetro) me puede cuantificar la mínima cantidad de fósforo y aplicando este resultado a la muestra de agua residual, vemos que está por muy debajo las concentraciones obtenidas para muestra de agua, por lo que podemos decir que el método aplicado, con base a parámetros estadísticos es aplicable en la muestra de agua residual analizada.
- ✓ Con todo lo mencionado anteriormente el método aplicado, con los parámetros estadísticos puesto a prueba en el trabajo, llegamos a la conclusión que nuestros resultados obtenidos son de completa confianza y fueron aplicados para el análisis de la muestra de agua residual y por tanto los resultados obtenidos para la muestra de agua son verídicos.
- ✓ Aplicando la ley Boliviana N° 1333 reglamento de contaminación hídrica se pudo el definir el tipo de agua que muestreó, llegando a ser de clase “D” según el **TÍTULO I DISPOSICIONES CAPÍTULO III DE LA CLASIFICACIÓN DE CUERPOS DE AGUAS ARTÍCULO 4º** (aguas de mínima calidad, que para consumo humano, en casos extremos de necesidad pública) ver página 15⁷².

⁷²Ley Boliviana N° 1333 reglamento de contaminación hídrica

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES



CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES

Diferencia entre el método actual (colorimétrico con cloruro estañoso) y el método propuesto (fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico)

- ✓ Con los resultados obtenidos a lo largo del trabajo se puede llegar a la conclusión que el método de fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico es mucho más eficiente, que el, ya existente (método colorimétrico con cloruro estañoso) no solo dando estabilidad en el método, sino en base a resultados de exactitud, linealidad límite de detección y límite de cuantificación es mucho más eficiente, llegando a la optimización del método.
- ✓ Existe mayor estabilidad en las soluciones patrón del método fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico a comparación del método anterior, (método colorimétrico con cloruro estañoso)
- ✓ Se gastó menos reactivo a comparación del anterior método generando menos contaminación, menos gastos que es lo que siempre se pretende obtener cuando se realiza cualquier tipo de análisis.
- ✓ Esta contaminación debido al fosfato se debe a que los habitantes de esta zona cotauma, utilizan el agua de esta vertiente para el lavado de prendas de vestir pues a consecuencia de este uso la concentración de fosfatos en estas aguas van aumentando provocando una gran contaminación de estas aguas con la proliferación de una eutrofización y matando la vida acuática en estas aguas.
- ✓ Se pudo denotar que en Bolivia no existe una normativa específica para la determinación de la concentración de fosfatos en aguas naturales y residuales, tampoco un método establecido para este fin, por lo que se opta por bibliografía de otros países y aplicó estos métodos.
- ✓ A consecuencia de la ausencia de una normativa se recurre a la ley Boliviana N° 1333 reglamento de contaminación hídrica donde norma la cantidad permisible pero de fósforo total y no así los límites permisibles de fosfatos para el tipo de agua que se analizó, en nuestro caso clase "D" (aguas de mínima calidad, que para consumo humano, en casos extremos de necesidad pública) ver página 15, por lo que se recurre a normativas internacionales entre ellas la venezolana, mexicana y Colombia.

CAPÍTULO 7

ANEXOS



CAPÍTULO 7

ANEXOS

Filtración de la muestra



Tratamiento previo del patrón utilizado KH_2PO_4



PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PATRÓN



PREPARACIÓN DE LOS PATRONES Y LAS MUESTRAS

SE UTILIZÓ BURETAS PARA LA PRAPARACIÓN RESPECTIVOS PATRONES DE FÓSFORO P





Patrones preparados



Soluciones listas para la respectiva lectura a una longitud de onda 825nm



Lecturas de los patrones y las muestras preparadas





Determinación del P^H del agua



TABLAS UTILIZADAS PARA EL CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS ANTERIORMENTE

TABLA t-student

Tabla 6
Distribución t de Student

g.l. \ α	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
35	0,682	0,852	1,052	1,306	1,690	2,030	2,438	2,724	3,591
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
45	0,680	0,850	1,049	1,301	1,679	2,014	2,412	2,690	3,520
50	0,679	0,849	1,047	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	3,496
60	0,679	0,848	1,045	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
80	0,678	0,846	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,416
100	0,677	0,845	1,042	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,390
∞	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,290

Nota: Para cada valor de los g.l. (primera columna) y de α (primera fila), en el interior de la tabla se da el valor t_α tal que a la izquierda de $-t_\alpha$ y a la derecha de $+t_\alpha$ queda un área total de α .

TABLA DE G de COCHRAN

Prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran

$\alpha = 0.05$

k	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.998	0.975	0.939	0.905	0.877	0.853	0.833	0.815	0.801	0.788	0.734	0.660	0.581	0.500
3	0.966	0.870	0.797	0.745	0.707	0.677	0.653	0.633	0.616	0.602	0.546	0.474	0.403	0.333
4	0.906	0.767	0.684	0.628	0.589	0.559	0.536	0.517	0.501	0.488	0.436	0.372	0.309	0.250
5	0.841	0.683	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.438	0.424	0.411	0.364	0.306	0.251	0.200
6	0.780	0.616	0.532	0.480	0.444	0.418	0.398	0.381	0.368	0.336	0.313	0.261	0.211	0.166
7	0.727	0.561	0.480	0.430	0.397	0.372	0.353	0.338	0.352	0.315	0.275	0.227	0.183	0.142
8	0.679	0.515	0.437	0.391	0.350	0.336	0.318	0.304	0.292	0.282	0.246	0.202	0.161	0.125
9	0.638	0.477	0.402	0.358	0.328	0.306	0.290	0.276	0.265	0.256	0.222	0.182	0.144	0.111
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.302	0.282	0.266	0.254	0.243	0.235	0.203	0.165	0.130	0.100

$\alpha = 0.01$

k	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.999	0.995	0.979	0.958	0.937	0.917	0.898	0.882	0.867	0.853	0.794	0.706	0.606	0.500
3	0.993	0.942	0.883	0.831	0.793	0.760	0.733	0.710	0.691	0.674	0.605	0.515	0.423	0.333
4	0.967	0.864	0.781	0.711	0.676	0.641	0.612	0.589	0.570	0.553	0.488	0.405	0.325	0.250
5	0.927	0.788	0.693	0.632	0.587	0.553	0.525	0.503	0.485	0.469	0.409	0.335	0.264	0.200
6	0.882	0.721	0.625	0.563	0.519	0.486	0.460	0.440	0.422	0.408	0.352	0.285	0.222	0.166
7	0.837	0.664	0.568	0.508	0.465	0.434	0.410	0.391	0.375	0.361	0.310	0.249	0.192	0.142
8	0.794	0.615	0.520	0.462	0.422	0.393	0.370	0.352	0.337	0.324	0.277	0.221	0.170	0.125
9	0.754	0.572	0.481	0.425	0.387	0.359	0.337	0.320	0.306	0.295	0.251	0.199	0.152	0.111
10	0.717	0.535	0.446	0.393	0.357	0.330	0.310	0.294	0.281	0.270	0.228	0.181	0.137	0.100

BIBLIOGRAFÍA

Análisis de aguas-determinación de la acidez en aguas naturales México

Aplicaciones y criterios de uso de la espectroscopia de absorción

CENAM- ema. (2009). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México, D.F.

Christian, G.D. (2009). Química Analítica. Sexta edición. Ed McGraw Hill. pp. 65-113. México

Estudio publicada en 2011 por www.bivica.org/caracterizacion de los efluentes de Puchokollo en la ciudad de La Paz.

Estudio de la adsorción de fosfatos en aguas depuradas mediante intercambio iónico escuela técnica superior de Barcelona.

Farmacia. Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, Centro América.

Guía Técnica No. 1. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago de Chile.

Instituto de hidrología, metrología y estudios ambientales ministerio de medio ambiente, vivencia y desarrollo territorial república de Colombia.

INECC-CCA. (2010). Guía para la implantación, validación y verificación del desempeño continuo de un método analítico. México, p. 27.

Interpretación de resultados de fósforo en análisis clínicos.

IUPAC. (2014). Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, Pure and Appl. Chem. vol. 71:337-348.

Ley Boliviana N° 1333 reglamento de contaminación hídrica

López, L.M. (2009). Determinación de parámetros de desempeño en métodos analíticos espectrofotométricos específicos para cuantificar fósforo y potasio en suelos utilizados para cultivo de café. Tesis de licenciatura en Química y

López, L.M. (2009). Determinación de parámetros de desempeño en métodos analíticos espectrofotométricos específicos para cuantificar fósforo y potasio en suelos utilizados para cultivo de café.

Martínez, L.D.E. y Noyola, M.E.T. (2012). Determinación del contenido de ácido fosfórico y cafeína en bebidas de cola de mayor consumo en los cafetines de la Universidad de El Salvador. Tesis de Licenciatura en química y farmacia. El Salvador, Centro América.

Métodos de análisis de aguas Luisggonzales@upct.es

Método de validación laboratorios farmacéuticos Lafar

Miller, N.J. y Miller, C.J. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Editorial Prentice Hall, 4ª Edición.

Murphy, J. (1983). Determination of phosphoric acid in cola beverages. Journal of Chemical Education. Vol. 60 No. 5.

Norma boliviana ISO 512 agua potable requisitos

Norma mexicana determinación de fósforo total en aguas naturales residuales y tratadas

Norma venezolana aguas, industriales y residuales determinación de fósforo

Parámetros y características de las aguas naturales (ingeniería de tratamiento y acondicionamiento de aguas)

www.azulambientalistas.org

www.calidadnatural.com/contaminacion-nitrogeno-fosforo

[www.espectrometria.com/espectrometra_ **ultravioleta-visible**](http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible)

Reglamento semapa para aguas Cochabamba Bolivia

[www. Quiminet.com/articulos/el uso-del-fósforo-en –la-agricultura](http://www.Quiminet.com/articulos/el-uso-del-fosforo-en-la-agricultura)

www.saludgeoambiental.org/ambiental