

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN – LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



***“APLICACIÓN Y COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ESPECTOFOTOMÉTRICOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN CEREALES”***



MONOGRAFÍA
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADAS EN QUÍMICA

PRESENTADO POR:

BR. NORA LISETH RAYO MARTINEZ
BR. SINDY VALESKA ZELLES PEREZ

TUTORES:

DR. SERGIO LÓPEZ GRÍO
Msc. FAVIO PALLAVICINI
2012: AÑO DEL BICENTENARIO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN – LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

***“APLICACIÓN Y COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS ESPECTOFOTOMÉTRICOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN CEREALES”***

MONOGRAFÍA

PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADAS EN QUÍMICA

PRESENTADO POR:

**BR. NORA LISETH RAYO MARTINEZ
BR. SINDY VALESKA ZELLES PEREZ**

TUTORES:

**DR. SERGIO LÓPEZ GRÍO
Msc. FAVIO PALLAVICINI**

2012: AÑO DEL BICENTENARIO

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Nuestro Dios, nuestro Señor quien nos ha dado la sabiduría para poder concluir nuestros estudios universitarios y guiar nuestros pasos por el camino correcto.

De Manera muy especial a Nuestros tutores: Dr. Sergio López Grío y MSc. Fabio Pallavicini quienes estuvieron dispuestos a guiarnos en este trabajo y con sus conocimientos y dedicación nos condujeron a la culminación de esta tesis.

A nuestros maestros, por siempre apoyarnos en el camino de nuestra formación y compartir sus valiosos conocimientos en el transcurso de nuestra carrera universitaria.

Y a todas aquellas personas que nos brindaron su apoyo moral y económico. .

DEDICATORIA

*A Dios por su amor infinito, por estar presente en mi vida,
A mis padres Adriana Martínez y Napoleón Rayo por su apoyo
incondicional y su comprensión en el transcurso de mis estudios.
A mis hermanas Lic. Kennia Arriaza, Br. Beatriz Rayo y a mis
hermanos Lic. Dagoberto Arriaza y Br. Andrés Rayo por su ayuda
brindada y por estar presentes en mi vida.*

Br. Nora Lisseth Rayo Martínez.

DEDICATORIA

A Dios Padre, quien ha mostrado su amor misericordioso a lo largo de mi vida y quien me ha permitido llegar hasta el día de hoy.

A mis padres Luisa Ivania Pérez Moreno y Jorge Mauricio Zelles Huete, quienes estuvieron presentes en cada momento quienes me apoyaron tanto moral como económicamente en el transcurso de mis estudios.

A mi abuelito Clemente Zelles por su apoyo incondicional y su amor paternal.

A mi abuelita Elia Rosa Huete Flores que en paz descansa por haberme apoyado y dirigido en el tiempo que estuvo a mi lado.

A mi tío Ulises Torres quien pasó parte de mi vida brindándome su amor y cariño, su apoyo incondicional en todo momento.

A mi tía Carmen Izcano quien estuvo pendiente siempre de que concluyera con éxito esta tesis.

A mi hermana, demás familiares y amistades.

Br. Sindy Valeska de Fátima Zelles Pérez



INDICE DE CONTENIDOS

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. OBJETIVOS	3
III.1 Objetivo General.....	3
III.2 Objetivos Específicos.....	3
IV MARCO TEORICO	4
IV.1 Historia y Estado natural del fósforo	4
IV.1.1 Descripción.....	4
IV.1.2 Fósforo	5
IV.2 Generalidades	6
IV.2.1 Características	9
IV.2.2 Aplicaciones	9
IV.2.3 Obtención	9
IV.2.4 Compuestos	9
IV.2.5 Isotopos.....	13
IV.2.6 Precauciones.....	14
IV.3 MÉTODO	15
IV.3.1 Principio del método	15
IV.3.2 Espectrofotometría.....	15
IV.3.2.1 Radiaciones espectrofotométricas	15



ÍNDICE CONTENIDOS

IV 3.3 Ley de la Espectrofotometría	16
IV.3.3.1 Ley de Beer	17
IV.3.3.2 Desviaciones de la ley de Beer	18
IV.3.4 Métodos espectrofotométricos	19
IV.3.5 Tratamiento de los datos espectrofotométricos	19
IV.3.4.1 Curvas espectrales	19
IV.3.4.2 Curvas de calibrado	20
IV.4 VALIDACIÓN	20
IV.4.1 Definición	20
IV.4.2 Requerimientos	21
IV.4.3 Parámetros de validación de los métodos analíticos	22
IV.4.3.1 Precisión	22
IV.4.3.2 Repetibilidad	22
IV.4.3.3 Precisión intermedia	22
IV.4.3.4 Reproducibilidad	22
IV. 4.3.5 Exactitud	23
IV.4.3.6 Especificidad	23
IV.4.3.7 Linealidad	24
IV.4.3.8 Rango	24
IV.4.3.9 Límite de Detección	25
IV.4.3.10 Límite de Cuantificación	25
IV.4.3.11 Inercia	25



ÍNDICE CONTENIDOS

IV.4.3.12 Incertidumbre.....	26
IV.5 Tratamientos de los Datos	26
IV.5.1 ANOVA de un Factor	27
V. PARTE EXPERIMENTAL	30
V.1 Materiales y método	30
V.1.1 Equipos	30
V.1.2 Reactivos.....	31
V.2 PROCEDIMIENTO	31
V.2.1 Preparación de soluciones	31
V.2.1.1 Solución Estándar de Fosforo.....	31
V.2.1.2 Solución Tampón de acetato pH 4.....	31
V.2.1.3 Solución ácido ascórbico	31
V.2.1.4 Solución molibdato amónico sulfúrico.....	31
V.2.1.5 Solución molibdato de amonio- vanadato de amonio en acido nitrico	32
V.2.2 Preparación del blanco para el método del Amarillo	32
V.2.3 Preparación del blanco para el método del Azul.....	32
V.3 Curva de Calibración Normal.....	32
V.3.1 Curva de Calibración Normal por en método del Amarillo.....	32
V.3.2 Curva de Calibración Normal por el método del Azul.....	32
V.4. Curva de Adición Patrón	33
V.4-1.Curva de Adición Patrón por el método del Amarillo.....	33
V.4.2.Curva de Adición Patrón por el método del Azul.....	33



ÍNDICE CONTENIDOS

VI. METODOLOGÍA	34
VI.1. Determinación de Fósforo	34
VI.1.1. Método del Azul Molibdato Sulfúrico.....	34
VI.1.2. Método del Amarillo Vanadato-Molibdato	35
VI.1.3 Determinación de fósforo por ambos métodos.....	36
VII. ANALISIS DE LOS RESULTADOS	37
VII.1. Selección de la Muestra	37
VII.2. Determinación de los parámetros experimentales del método del Amarillo	38
VII.2.1. Precisión: En términos de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.....	38
VII.2.1.1.Repetibilidad y reproducibilidad instrumental	39
VII.2.1.2.Repetibilidad y reproducibilidad del Método.....	41
VII.2.2. Linealidad	44
VII.2.2.1 Coeficiente de Determinación	44
VII.2.2.2.Porcentaje de Linealidad	45
VII.2.3. Límites de detección y límite de Cuantificación	46
VII.2.4. Exactitud.....	48
V.2.5. Efecto Matriz	50
VII.2.5.1. Comparación de las pendientes de las rectas CAP respecto a la pendiente de la recta de la CCN	51
VII.2.6. Incertidumbre.....	55
VIII Conclusión.....	60
IX Bibliografía	63



I. RESUMEN

En este trabajo se presenta, un estudio comparativo en la determinación de fósforo utilizando dos métodos espectrofotométricos, el del amarillo del ácido Vanadomolibdofosfórico y el del azul de Molibdato de amonio. Ambos se basan en la medición de ortofosfatos, por lo que es necesario la digestión del fosforo ya sea orgánico, disuelto o en partículas. Para esto comparamos parámetros de validación tales como precisión en términos de repetibilidad, linealidad, límite de detección y cuantificación, exactitud, efecto de matriz y la incertidumbre de los resultados, todos estos evaluados en cada método.

Se parte del supuesto de conocer la cantidad de fosforo presentes en cereales tales como avena, pinol y cebada, y de la optimización de los métodos.

El estudio de la repetibilidad se realizó tanto para un estándar de fósforo 10 ppm, así como también para una muestra de cereal por ambos métodos y durante dos días consecutivos. La linealidad se evaluó preparando una serie de soluciones estándares de concentraciones entre 5 y 40 ppm de Fósforo usando ambos métodos.

El límite de detección y de cuantificación se evaluó de dos maneras: utilizando la desviación residual de la CCN y a partir de las lecturas del blanco.

Al mismo tiempo se evaluó la incertidumbre aplicando la ley de propagación del error para ambos métodos y al final se realizó la aplicabilidad de cada método a diferentes muestras de cereales (tres muestras diferentes), obteniendo en ambos casos respuestas favorables.



II. INTRODUCCION

El análisis de fósforo se realiza para evaluar el contenido de éste en cereales, en este caso tomamos como muestra tres de ellos; avena, cebada y pinol. Para la selección de la muestra tomamos en cuenta tres criterios importantes como son el consumo, existencia en el mercado y precio. El fósforo es un componente esencial de los organismos y uno de los minerales más abundantes y necesarios en el cuerpo humano.

Debido a la importancia del Fósforo en la dieta alimenticia es necesario realizar la cuantificación de éste en los alimentos. Para ello nosotros utilizamos dos métodos espectrofotométricos los cuales son:

- Método Amarillo del ácido Vanadomolibdofosfórico.
- Método Azul Molibdato de amonio.

Parte del trabajo también incluye La validación de los métodos analíticos, Según ISO 17025, la validación es la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos como: Instrumentos calificados y calibrados, Métodos documentados, Patrones de referencia confiables, Analistas calificados, Integridad de la muestra.

Los parámetros experimentales del método aplicados son: Precisión en términos de repetibilidad, Linealidad, Limite de detección y cuantificación, Exactitud, Efecto matriz, Incertidumbre de los resultados. En la obtención de estos parámetros, empleamos en la mayoría de los casos más de una forma para obtenerlos, esto con el fin de tener suficientes elementos que confirmaran nuestras apreciaciones y a su vez proporcionaran elementos que podrían ser utilizados para futuros estudios relacionados con la temática del presente estudio.



III. OBJETIVOS:

III.1 OBJETIVO GENERAL

- Aplicar y comparar los métodos azul de Molibdato de amonio y amarillo de Vanadomolibdofosfórico para la determinación espectrofotométrica de fósforo en cereales.

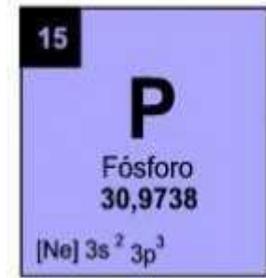
III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar las muestras de estudio según criterios específicos.
2. Optimizar los métodos de Azul de Molibdato de amonio y Amarillo Vanadomolibdofosfórico para la determinación de fósforo en cada uno de los cereales.
3. Determinar algunos parámetros analíticos de validación para ambos métodos tales como: precisión, límites de detección, límite de cuantificación y linealidad.
4. Evaluar la incertidumbre de medición del contenido de Fósforo en cereales para ambos métodos.

IV. MARCO TEÓRICO

IV.1 HISTORIA Y ESTADO NATURAL DEL FÓSFORO

IV.1.1 DESCRIPCIÓN



El fósforo fue descubierto en 1669 por el alquimista Henning BRAND, de Hamburgo, el primer hombre conocido que descubre un elemento. Buscando la piedra filosofal, BRAND destiló una mezcla de arena y orina evaporada, y obtuvo un cuerpo que tenía la propiedad de lucir en la oscuridad. Se le llamó “fósforo de Brand” para distinguirlo de otros materiales luminosos denominados también fósforo. Durante un siglo se vino obteniendo ésta sustancia exclusivamente de la orina, hasta que en 1771 SCHEELE la produjo de huesos calcinados. Más tarde, la palabra fósforo se reservó para designar esta sustancia. Cuando LAVOISIER demostró que era un elemento e investigó alguno de los productos formados al quemarla en el aire.

Debido a su marcada actividad, el fósforo no se encuentra libre en la naturaleza, pero se presenta abundantemente distribuido en forma de fosfatos. Sus principales minerales son la fosforita, $(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}_3$, y los apatitos, $\text{F}_2\text{Ca} \cdot 3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ y $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$.

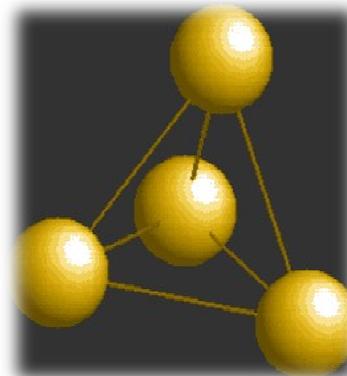
Las plantas necesitan fósforo para construir algunas partes esenciales del tejido vegetal. Un suelo fértil debe, pues, contener compuestos solubles de fósforo (sobre un 0.05%) y cuando estos son insuficientes se le añaden fosfatos como abonos.

El organismo animal también contiene fósforo en forma de complejos fosforados orgánicos en los nervios, los músculos y el cerebro y como fosfato cálcico, que constituye de los huesos y de los dientes. Alimentos tales como la leche, la yema de huevo, las nueces, y el trigo integral son ricos en fósforo.

MARCO TEÓRICO

IV.1.2 FÓSFORO

El fósforo es un elemento químico de número atómico 15 y símbolo P. Es un no metal multivalente perteneciente al grupo del nitrógeno (Grupo 15 (VA): nitrogenoideos) que se encuentra en la naturaleza combinado en fosfatos inorgánicos y en organismos vivos pero nunca en estado nativo. Es muy reactivo y se oxida espontáneamente en contacto con el oxígeno atmosférico emitiendo luz.



El fósforo en forma de fosfatos está ampliamente difundido en la naturaleza. Tanto en el reino mineral como en el vegetal y el animal. El fósforo representa entre el 0.8% y el 1.1% del peso total del cuerpo (unos 600-900 gr. Un 80% del cual está en el esqueleto, incluyendo los dientes, en combinación con el calcio. El restante 20% se encuentra en el suero y está distribuido por todas las células.

El nivel en suero es de 3-4.5 mg por 100 ml en adultos. En los niños es de 4-7 mg por 100 ml. En el organismo, el fósforo existe en forma de sales orgánicas e inorgánicas. El contenido de fósforo de los tejidos blandos tiene prioridad metabólica sobre el de los huesos. El fósforo inorgánico es más ionizable y difusible a través de las membranas que el orgánico. La bilis y jugo pancreático, lo mismo que el jugo intestinal, contienen iones de fosfato en proporción considerable y contribuyen a mantener el equilibrio entre la ingestión de fósforo y su excreción fecal.

IV.2 GENERALIDADES

IV.2.1 FISIOLÓGÍA: La absorción del fósforo está íntimamente ligada a la del calcio. El fósforo es absorbido más eficientemente que el calcio. Se absorbe un 70% del fósforo presente en la dieta.

La vitamina D interviene en el mecanismo de absorción de ambos componentes. Facilita la absorción de fósforo por el intestino delgado. Los fosfatos de sodio o de calcio bi o tricalcio son poco o nada asimilables, circunstancia que puede agravarse al tomar una dieta rica en calcio o en cloruro de magnesio. La excreción del fósforo se produce por vía renal y tracto gastrointestinal. El riñón mantiene una relación entre el fósforo excretado y el fósforo presente en el suero.

La hormona paratiroidea, parathormona, moviliza fósforo del hueso y aumenta la excreción de fósforo por los túbulos renales. La vitamina D actúa en sentido contrario. Sin embargo, a dosis elevadas aumenta la pérdida de fósforo. La hormona paratiroidea bloquea la reabsorción del fósforo cuando éste aumenta en relación con el nivel de calcio en sangre.

Es indispensable para la formación del hueso y su mantenimiento y mineralización. Las dosis elevadas de vitamina D, el hipertiroidismo, la ACTH, los glucocorticoides suprarrenales y los preparados sintéticos de cortisona desencadenan la liberación de fósforo de los huesos y ocasionan osteoporosis.

La vitamina D acelera la transferencia del fosfato orgánico de los tejidos blandos a fosfato inorgánico del tejido óseo. Juega un papel importante en el metabolismo de los hidratos de carbono.

Contribuye a la absorción de la glucosa en el intestino mediante el proceso de fosforilación, en el cual el fósforo se combina con la glucosa y el glicerol de grasa. Estimula la reabsorción tubular renal de la glucosa mediante el mismo proceso.

MARCO TEÓRICO

Forma parte del músculo e interviene en su metabolismo. Interviene en el transporte de los ácidos grasos, llevándolos en moléculas de fosfolípidos por la corriente sanguínea. Forma parte de las nucleoproteínas celulares con el ADN y los fosfátidos que intervienen en la formación de numerosas enzimas en el proceso de oxidación de la glucosa y producción de energía (A.T.P.).

Contribuye al control del equilibrio ácido-base en la sangre mediante su forma de ácido fosfórico y fosfato. El ácido ortofosfórico es acidificante. Forma parte del tejido nervioso. Es indispensable para su buen funcionamiento, y el mantenimiento de la energía nerviosa, intelectual y sexual.

IV.2.2 NECESIDADES: Se recomienda una ración de fósforo igual a la de calcio en la dieta, excepto en los lactantes: para los cuales la proporción de fósforo debe ser más baja. Otros autores opinan que la relación 1 a 1 en cuanto a calcio y fósforo debe mantenerse en el embarazo, el crecimiento y la lactancia, mientras que en el adulto la cantidad de fósforo ingerido debería ser mayor que la de calcio en una relación de 1-1'5.

IV.2.3 DÓNDE SE ENCUENTRA: Almendras, trigo (especialmente en el germinado), ajo, avena, flores de capuchina, cebada, guisantes nuevos, maíz, judías frescas, lentejas, coles, espinacas, cebolla, lechuga, zanahoria, manzana, arroz, apio, patata, coliflor, puerro, ciruela, fresa, tomate, escarola, pepino, castañas, setas, alcachofas, nueces, avellanas, pescado, leche y lácteos, carne magra.



MARCO TEÓRICO

IV.2.4 CARENCIA: La hipofosfatemia se manifiesta fundamentalmente por síntomas como: debilidad muscular, alteraciones óseas, osteomalacia y raquitismo.

La hipofosfatemia se produce en:

- Aumentos del consumo de glúcidos, como por ejemplo en el restablecimiento de la acidosis diabética.
- Afecciones intestinales con dificultad de absorción de fósforo, como sprúe y enfermedad celíaca.
- Trastornos del balance calcio-fósforo en osteomalacia y raquitismo.
- Hiperparatiroidismo primario.
- Ingestión insuficiente con la dieta.
- Por aumento de la excreción renal de fósforo.
- Hiperparatiroidismo.

IV.2.5 EXCESO: El exceso de fósforo es responsable de síntomas fundamentalmente musculares, como tetania.

Se produce en casos de:

- Insuficiencia renal.
- Hipoparatiroidismo.
- Ingestión excesiva.
- Administración endovenosa de fósforo en forma demasiado rápida.
- Glomerulonefritis aguda y crónica.
- Crecimiento excesivo de los huesos, como sucede en los niños pequeños y en los acromegálicos.

MARCO TEÓRICO

IV.2.6 CARACTERÍSTICAS:

- Es un no metal multivalente perteneciente al grupo del nitrógeno.
- El fósforo es un componente esencial de los organismos.
- Forma parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN).
- Forman parte de los huesos y dientes de los animales.
- Es el segundo mineral más abundante en el cuerpo humano.
- El fósforo común es un sólido.
- De color blanco, pero puro es incoloro.
- Un característico olor desagradable
- Es un no metal.
- Emite luz por fosforescencia



Existen varias formas alotrópicas del fósforo siendo las más comunes el fósforo blanco y el rojo; ambos formando estructuras tetraédricas de cuatro átomos. El fósforo blanco, extremadamente tóxico e inflamable presenta dos formas, alfa y beta, con una temperatura de transición de $-3.8\text{ }^{\circ}\text{C}$; expuesto a la luz solar o al calor ($300\text{ }^{\circ}\text{C}$) se transforma en fósforo rojo en reacción exotérmica.

Éste es más estable y menos volátil y tóxico que el blanco y es el que se encuentra normalmente en los laboratorios y con el que se fabrican las cerillas. El fósforo negro presenta una estructura similar al grafito y conduce la electricidad, es el más denso de los otros dos estados y no se inflama.

IV.2.7 APLICACIONES:

- El fósforo rojo se usa, junto al trisulfuro de tetrafósforo, P_4S_3 , en la fabricación de fósforos de seguridad.
- El fósforo puede utilizarse para: pesticidas, pirotecnia, bombas incendiarias, bombas de humo, balas trazadoras, etc.
- El fósforo (sobre todo blanco y rojo) se emplea principalmente en la fabricación de ácido fosfórico, fosfatos y polifosfatos (detergentes).

MARCO TEÓRICO

- El pentaóxido de fósforo se utiliza como agente desecante.
- El hidruro de fósforo, PH_3 (fosfina), es un gas enormemente venenoso. Se emplea en el dopado de semiconductores y en la fumigación de cereales.
- El trisulfuro de tetrafósforo constituye la masa incendiaria de las cerillas.
- Los fosfatos se usan en la producción de vidrios especiales, como los usados en las lámparas de sodio.
- El fosfato de calcio tratado con ácido sulfúrico origina superfosfato. tratado con ácido fosfórico origina superfosfato doble. Estos superfosfatos se utilizan ampliamente como fertilizantes.
- La ceniza de huesos, compuesta por fosfato de calcio, se ha usado para fabricar porcelana y producir fosfato monocálcico, que se utiliza en polvos de levadura panadera.
- El fosfato sódico es un agente limpiador, cuya función es ablandar el agua e impedir la formación de costras en caldera y la corrosión de tuberías y tubos de calderas.
- Los fosfatos desempeñan un papel esencial en los procesos biológicos de transferencia de energía: metabolismo, fotosíntesis, función nerviosa y muscular. Los ácidos nucleicos que forman el material genético son polifosfatos y coenzimas.

IV.2.8 OBTENCIÓN:

El fósforo lo obtuvo por primera vez Henning Brandt en 1669. El método de obtención partía de ingentes cantidades de orines dejados descomponer durante largo tiempo. Después se destilaban, condensándose los vapores en agua. Se obtenía así un producto blando que en la oscuridad irradiaba luz. Fue, por tanto, el primer elemento aislado a partir de un material biológico.

En 1833 la sociedad occidental descubrió lo fácil que era producir una llama utilizando cerillas de fósforo blanco. Sin embargo cientos de mujeres que trabajaban en las fábricas de cerillas murieron debido a la extrema toxicidad del P blanco.

MARCO TEÓRICO

Su nombre deriva de las palabras griegas phos (luz) y phorus (portador); el fósforo es el portador de luz.

Actualmente se obtiene, en una escala de millones de toneladas/año, por reducción del fosfato con carbón de coque, en presencia de sílice (SiO_2):



La reacción puede considerarse como una reacción ácido-base, seguida de una reacción redox.



El CaSiO_3 separa como escoria. En las condiciones de reacción, el fósforo se volatiliza (mezcla P_4 y P_2) y se condensa bajo agua como P_4 . El proceso consume una cantidad ingente de electricidad.



La mayor parte del fósforo obtenido se destina a la obtención de ácido fosfórico. Los restantes elementos se obtienen por reducción con H_2 o C de los óxidos correspondientes.

Se obtiene por métodos electroquímicos, en atmósfera seca, a partir del mineral (fosfato) molido mezclado con coque y arena y calentado a 1400°C en un horno eléctrico o de fuel. Los gases de salida se filtran y enfrían hasta 50°C con lo que condensa el fósforo blanco, que se recoge bajo agua o ácido fosfórico. Calentando suavemente se transforma en fósforo rojo.

MARCO TEÓRICO

IV.2.9 COMPUESTOS DEL FOSFORO:

El hidruro de fósforo o fosfina (PH_3) es un gas incoloro enormemente venenoso y se emplea en el dopado de semiconductores y en la fumigación de cereales.

El pentaóxido de fósforo presenta estructura dímica en estado sólido y líquido. Hay al menos cuatro modificaciones sólidas y dos líquidas. Es higroscópico y al aire se convierte en ácido fosfórico. Se utiliza como agente desecante.

Entre los sulfuros de fósforo, tienen interés el P_4S_3 , que constituye la masa incendiaria de las cerillas, y el P_4S_{10} , que se emplea en la obtención de lubricantes, como insecticida y agente de azufrado de combinaciones orgánicas.

El ácido ortofosfórico o fosfórico es un ácido de fuerza media. Se emplea en la fabricación de superfosfatos (fertilizantes), medicamentos y como acidificante.

Los fosfatos naturales son muy insolubles en agua; para aumentar su solubilidad se tratan con ácido sulfúrico: El fosfato de calcio (apatito y fosforita) tratado con ácido sulfúrico origina superfosfato (dihidrógenofosfato de calcio y yeso). Tratado con ácido fosfórico origina superfosfato doble (hidrógeno y dihidrógenofosfato de calcio). El empleo de estos superfosfatos, con un contenido de P_2O_5 del orden de 70-75%, ha adquirido gran importancia en la producción agrícola. Esto ha aumentado la demanda y la producción de fosfatos.

Los fosfatos se usan en la producción de vidrios especiales, como los que se usan en las lámparas de sodio.

La ceniza de huesos, compuesta por fosfato de calcio, se ha usado para fabricar porcelana y producir fosfato monocálcico, que se utiliza en polvos de levadura panadera.

MARCO TEÓRICO

El fosfato de trisódico es un agente de limpieza, para ablandar agua y para impedir la formación de costras en calderas y corrosión de tuberías y tubos de calderas.

El fósforo es componente esencial de los huesos y dientes; también del protoplasma celular y del tejido nervioso. Los enlaces fosfodiéster sirven para almacenar energía para los procesos celulares. El hombre necesita un aporte de 1 g diario en forma de combinaciones fosforadas.

IV.2.10 ISÓTOPOS:

Hay por lo menos 6 clases de fósforo (alótropos); los más importantes son: blanco (o amarillo), rojo, negro y violeta. Las diferencias entre las modificaciones son más claras que las que existen entre los metales alcalinos.

El fósforo ordinario es un sólido blanco céreo; cuando es puro es incoloro y transparente. En corte reciente parece amarillento. En todos los estados de agregación, la unidad estructural es P₄. Tiene a su vez dos modificaciones: a-P₄ (cúbica) y b-P₄ (romboédrica) con una temperatura de cambio a -3,8°C. Es insoluble en agua y soluble en disulfuro de carbono. Arde espontáneamente en el aire con llama blanco-amarillenta, produciendo vapores blancos de pentaóxido de difósforo (P₂O₅). El fósforo blanco debe guardarse en agua, ya que en el aire es un reactivo muy peligroso, debe manejarse con pinzas, puesto que en contacto con la piel produce quemaduras (se emplea en la fabricación las bombas de fósforo).

El fósforo blanco es un aislante. Brilla en la oscuridad al aire debido a la transformación del P₂O₃ de su superficie en P₂O₅, más estable. El fósforo rojo presenta una estructura cúbica, el negro ortorrómbico, y el violeta monoclinica.

MARCO TEÓRICO

En estado líquido (PF: 44,1 °C) humea al aire con desprendimiento de calor y formación del P_2O_5 . Se disuelve en disulfuro de carbono (CS_2) y tricloruro de fósforo (PCl_3) y es insoluble en agua. Es extraordinariamente reactivo y un reductor muy fuerte: sus reacciones con el azufre y los halógenos son muy violentas. Por encima de 700°C aparece la forma P_2 .

IV.2.11 PRECAUCIONES:

El fósforo blanco es extremadamente venenoso —una dosis de 50 mg puede ser fatal— muy inflamable por lo que se debe almacenar sumergido en aceite, el contacto con el agua (Oxígeno) lo haría estallar. Provoca quemaduras si entra en contacto con la piel. La exposición continua al fósforo provoca la necrosis de la mandíbula.

El fósforo rojo no se inflama espontáneamente en presencia de aire y no es tóxico, pero debe manejarse con precaución ya que puede producirse la transformación en fósforo blanco y la emisión de vapores tóxicos al calentarse.

IV.3 METODO

IV.3.1 PRINCIPIO DEL METODO

Existen varios métodos para la cuantificación de fósforo, de los cuales seleccionamos dos métodos:

- Azul – Molibdeno
- Amarillo de Vanadomolibdofosfórico.

Ambos métodos se basan en la medición de los ortofosfatos, por lo que es necesario la digestión del fósforo ya sea orgánico disuelto o en partículas.

La digestión se lleva a cabo, normalmente, calentando la muestra (550 C° por 12 hrs) hasta la obtención de ceniza blanca y acidificada con ácido nítrico. Durante la digestión todos los compuestos de fósforo de la muestra se convierten a orto-fosfato.

En medios ácidos los orto-fosfatos se combinan con el molibdato de amonio para formar ácido molíbdico fosfórico. Con la ayuda de un agente reductor, se puede formar el compuesto azul-fósforo-molibdeno cuya intensidad es posible medir fotométricamente a 660 nm.

Los iones de orto-fosfato reaccionan no sólo con el molibdato de amonio, sino también con el vanadato de amonio y se forma el compuesto amarillo vanadomolibdato de amonio-fosfórico cuya intensidad es posible medir fotométricamente a 470nm.

IV.3.2 ESPECTROFOTOMETRÍA.

La espectrofotometría se refiere a los métodos cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como métodos espectrofotométricos y según sea la radiación utilizada como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta, infrarroja.

IV.3.2.1 RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS

Pueden considerarse como un conjunto de corpúsculos, llamados fotones, los cuales llevan asociada una onda. La energía de radiación esta relacionada con la longitud de onda. Las longitudes de onda más cortas poseen mayor energía que las longitudes de onda más largas. De tal manera que podemos hablar de un espectro electromagnético constituido por las radiaciones electromagnéticas, mismo que se ha dividido en varias regiones, de acuerdo con la longitud de onda (λ) y la energía.

- ⊙ Rayos X (1-100 nm)
- ⊙ Ultravioleta (100-390 nm)
- ⊙ Visible (390-700 nm)
- ⊙ Infrarrojo (700-100000 nm)
- ⊙ Microondas (100000- 1000000 nm)

Experimentalmente para el establecimiento de un método espectrofotométrico, después de optimizar las condiciones químicas del sistema (pH, temperatura, control de interferentes, concentración adecuada de reactivos, solvente apropiado, protección a la luz para evitar reacciones fotoquímicas, etc.) que garanticen que se tiene la especie de interés en condiciones adecuadas para la medida.

IV.3.3 LEYES DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA

Cuando un haz de energía monocromática incide sobre una capa homogénea de una sustancia transparente, parte de la energía es absorbida y el resto transmitida.(En realidad también una pequeña parte es reflejada por lo que cuando se diseña un aparato para hacer estas medidas se tiene en cuenta este factor, de tal forma que se elimine su influencia). Si la energía radiante incidente tiene longitudes de onda en la región visible del espectro y el medio a través del cual tiene que pasar, absorbe selectivamente ciertas longitudes de onda, el color observado corresponderá a las longitudes de onda de la energía transmitida.

MARCO TEÓRICO

IV.3.3.1 LEY DE BEER.

La ley de Beer establece que la absorbancia es proporcional a las especies absorbentes.

$A = abc$, esta ecuación, fundamental para aplicar la espectrofotometría en química se denomina ley de Beer.

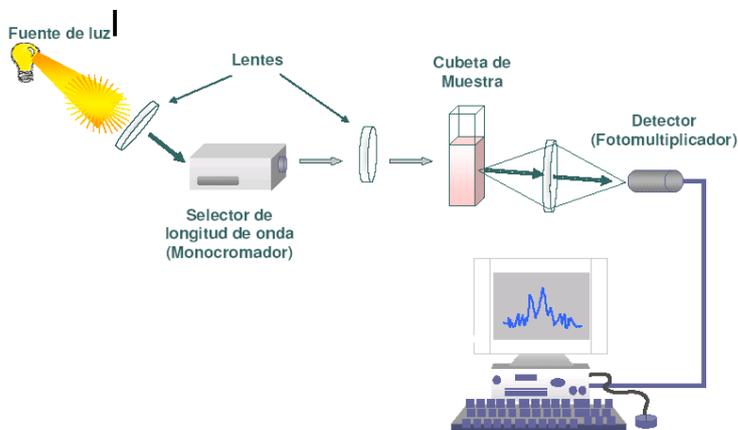
En donde,

a: es la absortividad.

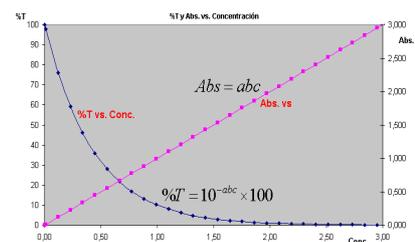
b: longitud del trayecto óptico.

c: la concentración de la muestra.

Absorbancia, A, es el logaritmo en base 10 del recíproco de la transmitancia, T, en el que el disolvente puro es el material de referencia; esto es, $A = \text{Log}_{10} 1/T = -\text{Log}_{10} T$.



$$A = \epsilon l C$$



IV.3.3.2 DESVIACIONES DE LA LEY DE BEER.

Normalmente se emplea como comprobante, de conformidad con la ley de Beer ó como prueba de la desviación, una grafica de A o de log T en una función de la concentración, que sirve también como curva de calibración para el análisis de disoluciones.

La mayor parte de esas desviaciones son más aparentes que reales y son debidas a una de las siguientes causas:

Carencia de monocromatismo de la luz incidente. Aparecen con frecuencia desviaciones aparentes de la absorbancia cuando se mide un fotómetro de filtro, en el que la radiación incidente ésta incluida en una banda amplia de longitudes de onda para la que se mide el sistema con máximo de absorción.

Cambios químicos en el sistema, de tal forma que las especies absorbentes no representan la totalidad de la concentración.

Los cambios más frecuentes son la asociación, disociación, interacción con el disolvente (por ejemplo, hidrólisis), efecto de pH, etc. Las desviaciones reales de la ley de Beer son insignificantes a concentraciones menores de 0.01M, pero puede aumentar porque él termino constante en la ley no es la absortividad, sino una función de la absortividad y del índice de refracción. También a altas concentraciones, las partículas de soluto quedan tan juntas que se altera su distribución de carga y la capacidad para absorber radiaciones de una determinada longitud de ondas.

IV.3.4 MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO

Un método espectrofotométrico para que sea cuantitativo es necesario:

- ⊙ Que sea selectivo al analito que se desea analizar.
- ⊙ Que esté libre de interferencias que afecten el resultado analítico ó que las interferencias se puedan controlar.
- ⊙ Que tenga alta precisión y exactitud.
- ⊙ Que tenga una alta sensibilidad.
- ⊙ Que el límite de detección corresponda a una concentración baja.

IV.3.5 TRATAMIENTO DE LOS DATOS ESPECTROFOTOMETRICOS.

IV.3.5.1 Curvas Espectrales:

La curva espectral de una sustancia química indica las características de absorción de dicha sustancia con relación a la longitud de onda. A veces se la presenta como Absorbancia vs longitud de onda y el espectro se llama "espectro de absorción", o en función de la transmitancia, y se llama, "espectro de transmisión".

Esto sucede por la retención de energía radiante por la capa de material interpuesta en la trayectoria de la radiación, y aunque la energía absorbida corresponde a una misma longitud de onda se observa una banda de absorción y no líneas, así la curva del espectro esta formada por las lecturas que realiza el aparato para reproducir un gráfico en función de una longitud de onda especifica, con el fin de apreciar los trazos que capta el espectrofotómetro. La determinación cuantitativa de una especie, con base en observaciones que dependan de la cantidad de radiación absorbida, dependen de la comparación entre el valor de la absorción de un patrón de referencia y la absorción de la muestra.

MARCO TEÓRICO

IV.3.5.2 Curva de calibrado:

Después de determinar la longitud de onda a la cual deben de realizarse las medidas, se calibra el método (lo que incluye el instrumento que se ha de utilizar) midiendo una serie de patrones del constituyente estudiado. Las medidas de transmitancia (o absorbancia) se realizan comúnmente ajustando la escala de medida del instrumento a 100% de transmitancia (absorbancia cero) cuando el rayo luminoso pasa a través de un blanco, que debe ser idéntico a la muestra en todo, excepto en que no debe contener el constituyente que se ha de determinar. El blanco deberá contener los reactivos, aditivos, disolventes, etc. En la misma naturaleza y concentración que las utilizadas en cada muestra desconocida en la que se desarrolle color; de esta manera, las lecturas de las muestras están corregidas automáticamente para cualquier absorción pequeña por acción de los reactivos y del disolvente.

Con los datos de transmitancia o absorbancia para las diferentes concentraciones de las series patrón se construye una curva de calibrado representando las absorbancias en las ordenadas y las concentraciones en las abscisas haciendo uso de ésta, por interpolación se determinan las concentraciones de las muestras desconocidas.

IV.4 VALIDACIÓN DE LOS METODOS ANALÍTICOS

IV.4.1 DEFINICIONES

Según la Norma UNE EN ISO 9000, la validación es la confirmación, mediante examen y aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Según la EURACHEM, la validación es un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio mediante el cual se pone de manifiesto que un método analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar.

MARCO TEÓRICO

Según ISO 17025, la validación es la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto.

IV.4.2 REQUERIMIENTOS

La validación de métodos analíticos o de ensayo requiere:

- Instrumentos calificados y calibrados.
- Métodos documentados.
- Patrones de referencia confiables.
- Analistas calificados.
- Integridad de la muestra.

IV.4.3 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN EN MÉTODOS DE ANÁLISIS CUANTITATIVOS

Existen diferentes criterios de la selección de los parámetros de calidad a considerar en la validación según diferentes organismos como la ONA (Oficina Nacional de Acreditación) e internacionales como la AOAC, la convención de farmacopea de USA (USP), conferencia internacional de armonización (ICH) unión europea o los establecidos por la ISO/IEC 17025. Desafortunadamente no hay unanimidad en todas las organizaciones e incluso, a veces, en el concepto para algunos parámetros. Los parámetros de validación en estudios indicados por la ISO, ICH y otras organizaciones son:

- Precisión.
- Exactitud.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación
- Especificidad/Selectividad.
- Linealidad y rango.

MARCO TEÓRICO

- Inercia diferenciando (Robustez y Solidez) AOAC
- Incertidumbre

IV.4.3.1 PRECISIÓN: La precisión se define como el grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitiva e independientemente el mismo método analítico a alícuotas de una misma muestra. Desde un punto de vista estadístico la precisión mide la dispersión de un grupo de resultados alrededor de la media. Se distinguen tres contextos en el estudio de la precisión: Repetibilidad, Precisión Intermedia y Reproducibilidad.

IV.4.3.1.1 REPETIBILIDAD: Es la precisión obtenida analizando alícuotas de una muestra homogénea sometidas independientemente a todo el proceso analítico en las condiciones más favorables; mismo método, mismo análisis, mismo equipo, mismos volumétricos, mismas condiciones y repetidas en un corto periodo de tiempo en un día si es posible.

IV.4.3.1.2 PRECISIÓN INTERMEDIA: Llamada también reproducibilidad intralaboratorio y se determina comparando los resultados de la precisión de un método a lo largo del tiempo en un mismo laboratorio. La precisión intermedia puede reflejar diferentes días, operadores, instrumentos o alguna combinación de ellos en un mismo laboratorio.

IV. 4.3.1.3 REPRODUCIBILIDAD: Es la precisión obtenida analizando alícuotas de, muestras homogéneas en las condiciones menos favorables, distintos analistas, diferentes instrumentos, diferentes periodos de tiempo en diferentes laboratorios. El objetivo es verificar si el método dará los mismos resultados en los diferentes laboratorios. La evaluación de la precisión se fundamenta en parámetros estadísticos basados en las distribuciones normales o gaussianas.

MARCO TEÓRICO

IV.4.3.5 EXACTITUD: La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor verdadero o el valor de referencia aceptado (ISO). La exactitud está relacionada con términos como veracidad y bías que caracterizan los errores sistemáticos.

Existen bastantes confusiones sobre ellos ya que las definiciones dadas por diferentes organismos son algunas veces contradictorias. ISO define la veracidad como el grado de concordancia entre el valor medio obtenido de una amplia serie de resultados de un ensayo y el valor de referencia aceptado. La definición añade que la medida de la veracidad se expresa en bías, es decir la veracidad es el concepto y bías es la medida. En términos prácticos según ISO ambos términos esencialmente significan lo mismo.

La IUPAC asigna esta definición a Bías pero no reconoce el término veracidad.

La AOAC establece una jerarquía entre ellos:

- Exactitud: Diferencia entre un resultado individual y el valor verdadero aceptado o asignado como verdadero.
- Veracidad: Diferencia entre una medida de resultado de un ensayo y el valor verdadero aceptado o asignado como verdadero.
- Bías: Diferencia entre la media de un número elevado de resultados de un ensayo y el valor verdadero aceptado o asignado como verdadero.

IV.4.3.6 ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD: El término especificidad se refiere a un método que produce respuesta para un único analito, mientras que el término selectivo se refiere a un método que responde a varios analitos pero con respuestas diferenciadas entre sí. Debido a que pocos métodos responden a un único analito, el término selectivo es generalmente más apropiado.

MARCO TEÓRICO

IV.4.3.7 LINEALIDAD: La linealidad de un método es su capacidad para obtener resultados que son proporcionales a la concentración del analito en la muestra de un rango determinado, bien directamente o a través de una transformación matemática. En general la linealidad se determina realizando de 3 a 6 medidas de 5 o más estándares cuyas concentraciones cubran entre el 80 y 120 % del rango esperado. La evaluación de la linealidad se realiza de forma gráfica o, de forma alternativa, matemáticamente.

Si los residuales no muestran una tendencia estando los valores positivos y negativos igualmente distribuidos y el error aleatorio es bajo la linealidad puede aceptarse.

Por otro lado existen también métodos matemáticos para evaluar la linealidad:

- Valor de coeficiente de correlación, r , entre 0.98 y 1.
- El valor de n exponente en la ecuación de regresión: $y = mx^n + b$ debe de estar entre 0.9 y 1.1
- Test de falta de ajustes (lack of fit F – test) el cual evalúa la probabilidad de que la diferencia o sesgo entre los valores experimentales o predichos por el modelo (residuales) sea debida exclusivamente al error aleatorio experimental y no a la existencia de la curvatura.

IV.4.3.8 RANGO: El rango de un método analítico es el intervalo de aplicación, en unidades de concentración entre el nivel más alto y más bajo de analito que se puede determinar con exactitud y linealidad usando el método. No existe requerimiento específicos para este parámetro aunque si es importante señalar que la linealidad debe establecerse en el rango de concentración establecidas.

MARCO TEÓRICO

IV.4.3.9 LÍMITE DE DETECCIÓN: el límite de detección es la mínima concentración, que proporciona una señal significativamente diferente a la del blanco, es decir que puede considerarse causada por el analito con una confianza de $(1 - \alpha) 100$, si la señal es inferior solo puede decirse con una confianza de $(1 - \beta) 100 \%$, que la concentración del componente es menor que un determinado valor.

Recordando que α o error de la 1° especie es la posibilidad de que la señal del blanco sea considerada como señal de la muestra lo que origina falsos positivos (error: rechazo de una hipótesis cierta) mientras que el error β o 2° especie es la probabilidad de que la señal de la muestra sea considerada como señal del blanco originándose los falsos negativos (error: aceptación de una hipótesis falsa).

IV.4.3.10 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN: Se define como la mínima concentración de analito que origina medidas cuantitativas con aceptable exactitud y precisión que puede considerarse como el límite inferior del rango lineal.

IV.4.3.11 INERCIA: La inercia mide la resistencia de un método analítico a generar valores inexactos cuando se modifica ligeramente el valor operacional de las condiciones experimentales.

El estudio de la inercia puede llevarse a cabo atendiendo dos tipos de modificaciones, lo que da lugar a que pueda caracterizarse a través de dos propiedades:

- a. Robustez (robustness): Mide la resistencia de un procedimiento a generar valores sesgados (con errores sistemáticos) cuando se modifica el valor nominal de las variables experimentales intrínsecas al proceso, concentraciones, pH, temperatura, velocidad de flujo, etc.

MARCO TEÓRICO

- a. Solidez (ruggedness): mide la resistencia cuando se modifican condiciones experimentales extrínsecas al proceso: reactivos y o consumibles (lotes fabricantes), equipos (aparatos, instrumentos, sistemas informáticos) operadores, condiciones ambientales, días, etc.

Es necesario indicar que los estudios de solidez así definidos son iguales a los de precisión intermedia, por tanto este término de solidez va dirigido a estudios interlaboratorio.

La robustez evalúa principalmente variables cuantitativas (también son posibles cualitativas presencia/ausencia de cierto componente) mientras que la solidez tiene que ver con variables fundamentalmente de tipo cualitativas. Ambas pretenden estimar la influencia de un cambio en todos los factores de interés sobre la respuesta predicha, para una determinada concentración de analito.

IV.4.3.12 INCERTIDUMBRE: La incertidumbre se define como un parámetro asociado con el resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando (VIM).

IV.5 TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Para poder realizar el tratamiento de los datos obtenidos del análisis de muestras de distintos orígenes, se suelen usar diferentes estrategias de tratamiento estadístico, de estos datos.

Por lo que los laboratorios, utilizan una gran variedad de herramientas estadísticas definidas para usos generales o concretos. Los datos se deben obtener mínimo por triplicado, para mayor seguridad del mismo y luego se procede a definir qué o cual herramienta nos sirve para el propósito que nos hemos planteado.

MARCO TEÓRICO

En nuestro caso, el fin es el comparar, relacionar o asociar muestras, y por lo tanto se deben emplear 2 herramientas, entre las que se mencionan:

1. Comparación de varianzas a través de los test de Fisher, Bartlett o Levene.
2. Comparación de medias: con varianzas iguales o diferentes

IV.5.1 ANOVA DE UN FACTOR

Análisis de varianza (**ANOVA**, según terminología inglesa) es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados. El análisis de varianza sirve para comparar si las medias de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar.

Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones.

El ANOVA se basa en la descomposición de la variación total de los datos con respecto a la media global (SCT), que bajo el supuesto de que H_0 es cierta con una cierta estimación obtenida a partir de toda la información muestral, en dos partes:

1. **Variación dentro de las muestras (SCD) o Intra grupos**, cuantifica la dispersión de los valores de cada muestra con respecto a sus correspondientes medias.
2. **Variación entre muestras (SCE) o Inter-grupos**, cuantifica la dispersión de las medias de las muestras con respecto a la media global.

MARCO TEÓRICO

Las expresiones para el cálculo de los elementos que intervienen en el Anova son las siguientes:

$$\text{Media Global: } \bar{X} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} X_{ij}}{n}$$

$$\text{Variación Total: } SCT = \sum_{j=1}^K \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X})^2$$

$$\text{Variación Intra-grupos: } SCD = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - \bar{X}_j)^2$$

$$\text{Variación Inter-grupos: } SCE = \sum_{j=1}^k (\bar{X}_j - \bar{X})^2 n_j$$

Siendo x_{ij} el i -ésimo valor de la muestra j -ésima; n_j el tamaño de dicha muestra y \bar{x}_j su media. Cuando la hipótesis nula es cierta $SCE/K-1$ y $SCD/n-K$ son dos estimadores insesgados de la varianza poblacional y el cociente entre ambos se distribuye según una F de Snedecor con $K-1$ grados de libertad en el numerador y $N-K$ grados de libertad en el denominador.

Por lo tanto, si H_0 es cierta es de esperar que el cociente entre ambas estimaciones será aproximadamente igual a 1, de forma que se rechazará H_0 si dicho cociente difiere significativamente de 1.

En esta prueba las hipótesis nula y alternativa son:

$$H_0 = \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_4 = \bar{X}_5 = \dots \bar{X}_i$$

$$H_1 = \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2 \neq \bar{X}_3 \neq \bar{X}_4 \neq \bar{X}_5 \neq \dots \bar{X}_i$$

MARCO TEÓRICO

Se acepta H_0 si:

$$F_{\text{cal}}^2 < F_{(h-1), (N-h), 0.05}^2$$

Se rechaza en caso contrario.

El ANOVA se basa en la comparación de la variabilidad media que hay entre los grupos con la variabilidad que hay dentro de los grupos.

Un método computacional conocido como tabla ANOVA facilita los cálculos. Se trata de disponer en forma de tabla ciertas cantidades que conducen a la obtención del F calculado, se muestra la tabla de resultados de ANOVA.

Variabilidad	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrados Medios	F_{cal}
Entre	$\text{SCE} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{x}_i - \bar{x})^2$ $= \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$k - 1$	$\text{MSE} = \frac{SS_E}{k-1}$	$\frac{\text{MSE}}{\text{MSD}}$
Dentro	$\text{SCD} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$ $= \sum_{i=1}^k (n_i - 1) x_i^2$	$n - k$	$\text{MSD} = \frac{SS_D}{n-a}$	
Total	$\text{SCT} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x})^2$	$n - 1$		

Tabla IV.1 Ecuaciones para el cálculo de ANOVA de un factor.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1 MATERIALES Y MÉTODOS

V.1.1 EQUIPOS

1. Balanza Analítica (Ohaus, EP 210)
2. Balanza Analítica (Sartorius, MCI AC 210 S)
3. Horno Mufla (Heraeus, MR 170 E)
4. Campana Extractora de Gases (Labconco)
5. Espectrofotómetro (Shimadzu, UV 1203)
6. Cocina de Calentamiento Eléctrico (Fisher Scientific)
7. Celdas de Vidrio
8. pH-metro

V.1.2 MATERIALES

1. Desecador de Vidrio (Pyrex)
2. Cápsulas de Porcelana (Fisherbrand)
3. Pinzas de Cápsulas de Porcelana (Fisherbrand)
4. Vidrio de Reloj (Pyrex)
5. Balones aforados de 1000, 250, 100, 50 mL (Pyrex)
6. Beaker de 100 mL (Pyrex)
7. Espátula (Fisher Scientific)
8. Pizeta de 500 mL (Fisher Scientific)
9. Pipeta Serológica de 10, 5, 1 mL



ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.1.3 REACTIVOS

1. Acetato de sodio trihidratado (Fisher Scientific)
2. Acido ascórbico (+)(Baker Analyzed)
3. Acido oxálico (Merck, Darmstadt, Alemania)
4. Molibdato de Amonio(Merck, Darmstadt, Alemania)
5. Acido sulfúrico (Acros Organics)
6. Fosfato ácido de potasio(Merck,Darmstadt,Alemania)
7. Ácido Acético Glacial (Merck, Darmstadt, Alemania)
8. Ácido Nítrico(Merck, Darmstadt, Alemania)
9. Vanadato de Amonio(Fisher Scientific)

V.2 PROCEDIMIENTO

V.2.1 PREPARACION DE SOLUCIONES

V.2.1.1 SOLUCIÓN ESTANDAR DE FOSFORO.

Disolver 0.2195g de KH_2PO_4 y dilúyase a un litro. Esta solución contendrá 50 ppm de fósforo.

V.2.1.2 SOLUCIÓN TAMPON DE ACETATO pH 4.

Pesar 8.5 g de acetato de sodio trihidratado, disolver en agua y mezclar con 14.25 mL de ácido acético glacial, completar 1 litro con agua, controlar pH con pH-metro.

V.2.1.3 SOLUCIÓN ÁCIDO ASCÓRBICO.

Preparar al 1% en solución de ácido oxálico al 0.5% recién preparado.

V.2.1.4 SOLUCIÓN MOLIBDATO AMONIO SULFURICO.

Preparar diluyendo 15 mL de ácido sulfúrico en 40 mL de agua, que son agregados a una solución que contiene 5 g de molibdato de amonio disueltos en 45 mL de agua.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.1.5 SOLUCIÓN DE MOLIBDATO DE AMONIO-VANADATO DE AMONIO EN ÁCIDO NITRICO

Disuélvanse 2.25 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 40 mL de agua. Disuélvanse 0.125 g de Vanadato de Amonio en 30 mL de agua hirviendo. Agréguese la solución de Vanadato de Amonio a la de Molibdato de Amonio y enfríese a la temperatura ambiente. Añádanse 25 mL de Ácido Nítrico concentrado y dilúyase a 100 ml.

V.2.2 PREPARACION DEL BLANCO PARA METODO AMARILLO

10 ml de solución Molibdato/Vanadato y aforar a 50 ml con agua destilada.

V.2.3 PREPARACION DEL BLANCO PARA METODO AZUL

10 ml de la solución tampón de acetato pH 4, luego 1 ml de la solución ácido ascórbico y finalmente 5 ml de Molibdato Amonio Sulfúrico.

V.2.4 CURVA DE CALIBRACION NORMAL

V.2.4.1 CURVA DE CALIBRACION NORMAL PARA METODO AMARILLO

Se preparan soluciones estándares de fósforo de 0, 2, 4, 6, 8 ppm, a partir de una solución madre de 500 ppm, leer la absorbancia a 470 nm a los 30 min exactos después de adicionar la solución Molibdato/Vanadato.

V.2.4.2 CURVA DE CALIBRACION NORMAL PARA METODO AZUL

Se preparan soluciones estándares de fósforo de 0, 2, 4, 6, 8 ppm, a partir de una solución madre de 500 ppm, leer la absorbancia a 660 nm a los 30 min exactos después de adicionar la solución Molibdato Amonio Sulfúrico.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

V.2.5 CURVA DE ADICION PATRON

V.2.5.1 CURVA DE ADICION PATRON PARA METODO AMARILLO

Se preparan 5 soluciones cada una conteniendo 5 mL de muestra, luego se adicionan alícuotas de una solución estándar de fósforo de 500 ppm, se le adiciona el reactivo colorimétrico y se afora a 50 mL con agua destilada. La concentración de los estándares de fósforo son de 0, 2, 4, 6, 8 ppm, se lee la absorbancia a 470 nm a los 30 min exactos después de preparada cada solución.

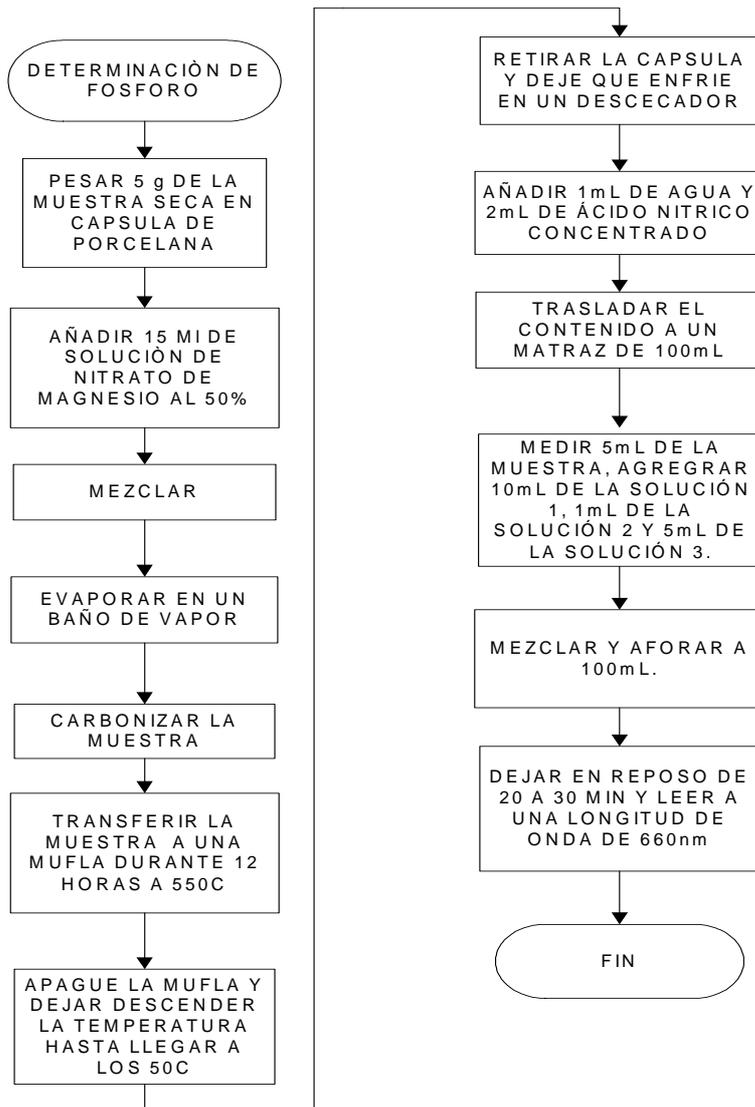
V.2.5.2 CURVA DE ADICION PATRON PARA METODO AZUL

Se preparan 5 soluciones cada una conteniendo 5 mL de muestra, luego se adicionan alícuotas de una solución estándar de fósforo de 500 ppm, se le adiciona el reactivo colorimétrico y se afora a 100 mL con agua destilada. La concentración de los estándares de fósforo son de 0, 2, 4, 6, 8 ppm, se lee la absorbancia a 660 nm a los 30 min exactos después de preparada cada solución.

VI. MÉTODOLÓGIA

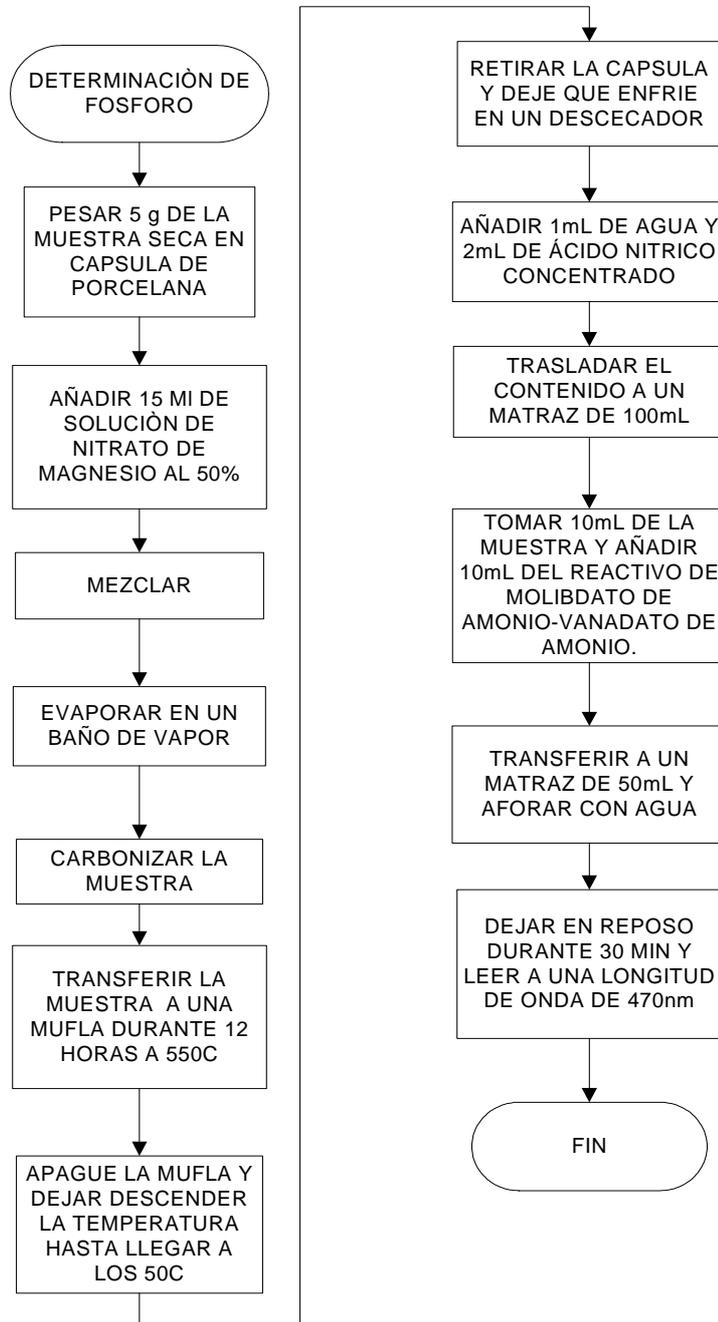
VI.1 DETERMINACIÓN DE FOSFORO

VI.1.1. METODO AZUL-MOLIBDATO SULFURICO



ANÁLISIS DE RESULTADOS

VI.1.2 METODO DE AMARILLO VANADATO-MOLIBDATO



ANÁLISIS DE RESULTADOS

VI.1.3 DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FÓSFORO

VI.1.3.1 METODO AZUL-MOLIBDATO SULFURICO

El método se basa en la reacción del ión fosfato con molibdato (MoO_4^{2-}) que da lugar a fosfomolibdato ($[\text{PO}_4\text{12MoO}_3]^{3-}$). Este último por reducción origina un compuesto cuya estructura exacta se desconoce, denominado “azul de molibdeno”. Como reductores se utiliza el ácido ascórbico.

VI.1.3.2 METODO DE AMARILLO VANADATO-MOLIBDATO.

En algunos medios ácidos, los iones de orto-fosfato reaccionan no sólo con el molibdato de amonio, sino también con el vanadato de amonio y se forma el compuesto amarillo vanadomolibdato de amonio fosfórico el molibdato amónico reacciona en condiciones ácidas para formar un heteropoliácido, ácido molibdofosfórico. En presencia de vanadio forma ácido vanadomolibdofosfórico amarillo. cuya intensidad es posible medir fotométricamente a 380 nm.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

VII.1 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO

En Nicaragua, existe un alto consumo de cereales, todo buen Nicaragüense ha disfrutado de un delicioso vaso de avena, cebada o pinol. Siendo éstos cereales parte fundamental en nuestra alimentación, debido a su variado contenido en vitaminas y minerales. Existen diferentes presentaciones en la cuales podemos encontrar estos cereales, que los volúmenes de venta y consumo son relativamente altos y que no contábamos con un estudio similar al planteado en esta monografía, decidimos elegir las muestras a ser analizadas en base a criterios puramente empíricos.

Decidimos realizar la selección de las muestras a ser estudiadas en base a los siguientes criterios:

- **Consumo:** de todos los cereales que contienen fósforo los más consumidos por la población.
- **Existencia en el mercado:** esto es, las variedades con mayor oferta en el mercado local.
- **Precio:** las presentaciones más accesibles para la población.

Luego de analizar los criterios de selección antes mencionados, nos inclinamos por analizar los cereales elaborados por Café Soluble S.A. (CSSA), los que adquirimos en una distribuidora del centro de la Ciudad de León. Una vez seleccionados los cereales a utilizar, se les realizó el análisis de contenido de fósforo utilizando dos métodos espectrofotométricos diferentes.

VII.2 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS EXPERIMENTALES

Los parámetros experimentales del método fueron:

1. Precisión: en términos de repetibilidad.
2. Linealidad.
3. Limite de detección y cuantificación.
4. Exactitud.
5. Efecto matriz.
6. Incertidumbre de los resultados.

La obtención de estos parámetros fue realizada posteriormente a la optimización de las condiciones experimentales del método en relación a nuestras muestras de estudio.

En la obtención de los parámetros experimentales, empleamos en la mayoría de los casos más de una forma para obtenerlos, esto con el fin de tener suficientes elementos que confirmaran nuestras apreciaciones y a su vez proporcionaran elementos que podrían ser utilizados para futuros estudios relacionados con la temática del presente estudio.

Los parámetros experimentales obtenidos así como un breve análisis de sus resultados se muestran a continuación.

VII.2.1 PRECISIÓN: EN TÉRMINOS DE REPETIBILIDAD.

Tal y como hemos definido en el marco teórico la repetibilidad es la precisión obtenida analizando alícuotas de una muestra homogénea, sometidas independientemente a todo el proceso analítico de forma independiente, en las condiciones más favorables: mismo método de medida, mismo analista, mismo instrumento de medida usado en las mismas condiciones, mismo laboratorio, repetidas en un corto período de tiempo.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

VII.2.1.1. REPETIBILIDAD INSTRUMENTAL

Para realizar el estudio de repetibilidad para ambos métodos, utilizamos un estándar de 10 ppm de fósforo, por dos días consecutivos, obteniendo diez lecturas por día, para un total de 20 lecturas. El estándar fue obtenido de una solución madre de 50 ppm y fue preparado diariamente. Las absorbancias obtenidas experimentalmente en cada método se muestran en la tabla VII.1.

Estándar	Día 1	Día 2
10 ppm	0.238	0.239
	0.239	0.239
	0.238	0.237
	0.238	0.238
	0.236	0.236
	0.236	0.237
	0.239	0.237
	0.239	0.237
	0.239	0.238
	0.236	0.237

Estándar	Día 1	Día 2
10 ppm	0.338	0.339
	0.339	0.338
	0.339	0.338
	0.339	0.338
	0.339	0.339
	0.340	0.338
	0.340	0.339
	0.340	0.340
	0.340	0.341
	0.340	0.340

Tabla VII.1 Resultados de las lecturas del estándar para cada método.

Debido a que para realizar el estudio de la repetibilidad es necesario previamente determinar la homogeneidad de las varianzas, esto es que no existen diferencias significativas entre los resultados de cada día. Para esto aplicamos la prueba estadística de Fisher para comparar las varianzas.

Donde se divide la varianza mayor de un día entre la varianza menor de otro día, se compara con el valor de las tablas de Fisher. Si el valor de Fisher calculado (F_c) es mayor que el valor de las tablas ($F_{0.05}$) se dice que las varianzas no son homogéneas (no hay homocedasticidad)

$$F_c = \frac{S^2_1}{S^2_2}$$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Esta prueba la podemos realizar a partir de los resultados de los promedios y varianzas para cada día y para cada método se pueden observar en la tabla VII.2.

Repetibilidad 10 ppm de Fósforo		
promedio	0.2378	0.2375
desviación	0.001316561	0.000971825
varianza	1.73333E-06	9.44444E-07
CV	0.554	0.409
LI	0.236859087	0.236805461
LS	0.238740913	0.238194539
Fcal	1.84	

Repetibilidad 10 ppm de Fósforo		
promedio	0.3394	0.339
desviación	0.00069921	0.00105409
Varianza	4.8889E-07	1.1111E-06
CV	0.206	0.311
LI	0.3389003	0.33824667
LS	0.3398997	0.33975333
Fc	2.72	

Tabla VII.2 Resultados del análisis de estándar de 10 ppm.

Como se puede observar en los resultados el valor de Fc (1.84 para el amarillo y 2.72 para el azul) en ambos casos es menor que el valor de F de tabla (4.026) por lo cual podemos afirmar que las varianzas son homogéneas tanto para los resultados del método amarillo como del azul. Además en ambos días se obtuvieron coeficientes de variación relativamente bajos, menores del 1%, por lo cual comprobamos la excelente repetibilidad que presentaron los resultados de las lecturas del estándar.

Para comparar los promedios de las lecturas del día 1 con el día 2 se utilizó la prueba estadística de comparación de medias independientes o medias muestrales donde se obtuvo un valor de tc de 0.58 y 1 para el método amarillo y azul respectivamente, donde en ambos casos es menor que el de t de tabla (2.10) por lo cual podemos afirmar que en ambos métodos los promedios del día 1 no difieren significativamente del día 2 por lo cual los promedios son iguales.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Esta comparación también la podemos confirmar por medio de la grafica de los intervalos de confianza para cada día, para esto utilizamos las siguientes ecuaciones:

- *Limite superior:* $\bar{X} + t_{(0.05,n-1)}S/\text{raiz}(n)$
- *Limite medio:* \bar{X}
- *Limite inferior:* $\bar{X} - t_{(0.05,n-1)}S/\text{raiz}(n)$

Las graficas de los intervalos de confianza la podemos observar en la figura VII.1.

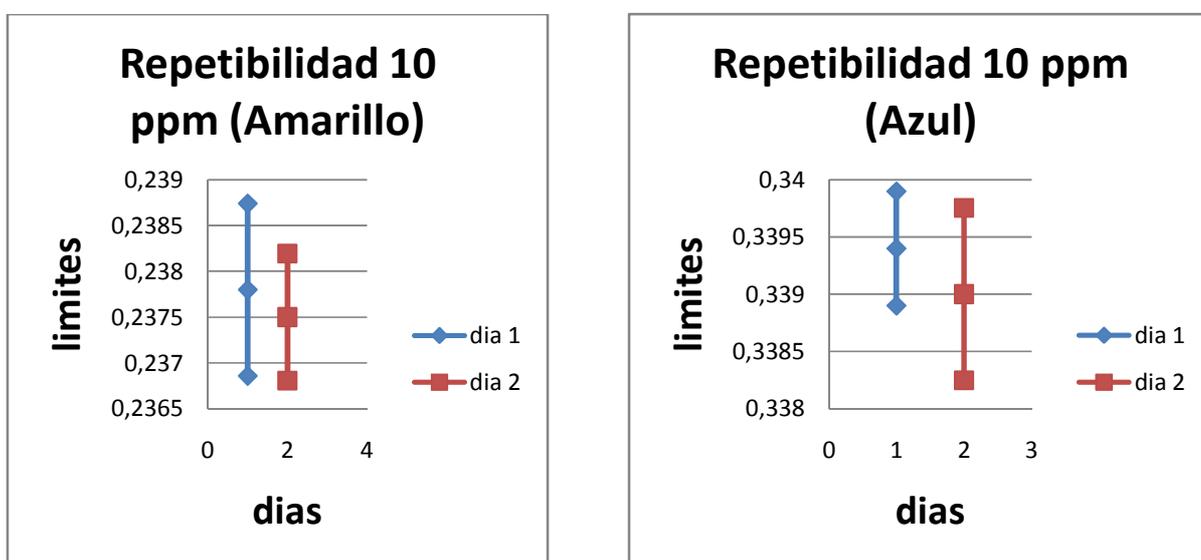


Figura VII.1 Gráfico de Intervalos de confianza de estándar de 10ppm.

Donde se observa que las gráficas presentan puntos en comunes por lo cual confirmamos que los promedios de los dos días son iguales para ambos métodos.

VII.2.1.2 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Para realizar el estudio de repetibilidad y precisión intermedia del método elaboramos dos rectas de calibración en un intervalo de tiempo definido, estas las utilizamos para analizar la muestra de avena, por dos días consecutivos, obteniendo diez lecturas por día, para un total de 20 lecturas por día (Esto fue aplicado a cada muestra). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VII.3.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

	Día 1	Día 2		Día 1	Día 2
Avena	0.398	0.400	Avena	0.414	0.413
	0.401	0.401		0.415	0.415
	0.399	0.401		0.415	0.413
	0.401	0.401		0.415	0.414
	0.399	0.400		0.414	0.413
	0.398	0.400		0.416	0.414
	0.401	0.401		0.415	0.413
	0.400	0.401		0.414	0.414
	0.402	0.400		0.414	0.415
	0.401	0.400		0.414	0.415

Tabla VII.3 Resultados del Análisis de la muestra de Avena por dos días consecutivos.

Al igual que en el caso del estándar de 10 ppm, para realizar el estudio de la repetibilidad es necesario previamente determinar la homogeneidad de las varianzas. Para esto aplicamos la prueba estadística de Fisher para comparar las varianzas. Esta prueba la podemos realizar a partir de los resultados de los promedios y varianzas para cada día y para cada método se pueden observar en la tabla VII.4.

Repetibilidad 10 ppm de Fósforo			Repetibilidad 10 ppm de Fósforo		
promedio	0.4	0.4005	promedio	0.4146	0.4139
desviación	0.00141421	0.00052705	desviación	0.00069921	0.0008756
varianza	0.000002	2.78E-07	varianza	4.89E-07	7.67E-07
CV	0.354	0.132	CV	0.169	0.212
LI	0.3989893	0.40012333	LI	0.4141003	0.41327423
LS	0.4010107	0.40087667	LS	0.4150997	0.41452577
Fc	7.2		Fc	0.64	

Tabla VII.4 Resultados del análisis del estándar de la muestra de avena.

Como se puede observar en los resultados el valor de Fc (7.2 para el amarillo y 0.64 para el azul) en el caso del método azul es menor que el valor de F de tabla (4.026) pero en el caso del amarillo no, sin embargo podemos observar además que existen coeficientes de variación relativamente bajos para ambos casos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para comparar los promedios de las lecturas del día 1 con el día 2 se utilizó la prueba estadística de comparación de medias independientes o medias muestrales donde se obtuvo un valor de t_c de 1.02 para el método amarillo y 1.98 para el método azul respectivamente, donde en ambos casos es menor que el de t de tabla (2.26) por lo cual podemos afirmar que en ambos métodos los promedios del día 1 no difieren significativamente del día 2 por lo cual los promedios son iguales.

Esta comparación también la podemos confirmar por medio de la grafica de los intervalos de confianza para cada día.

Las graficas de los intervalos la podemos observar en la Figura VII.2.

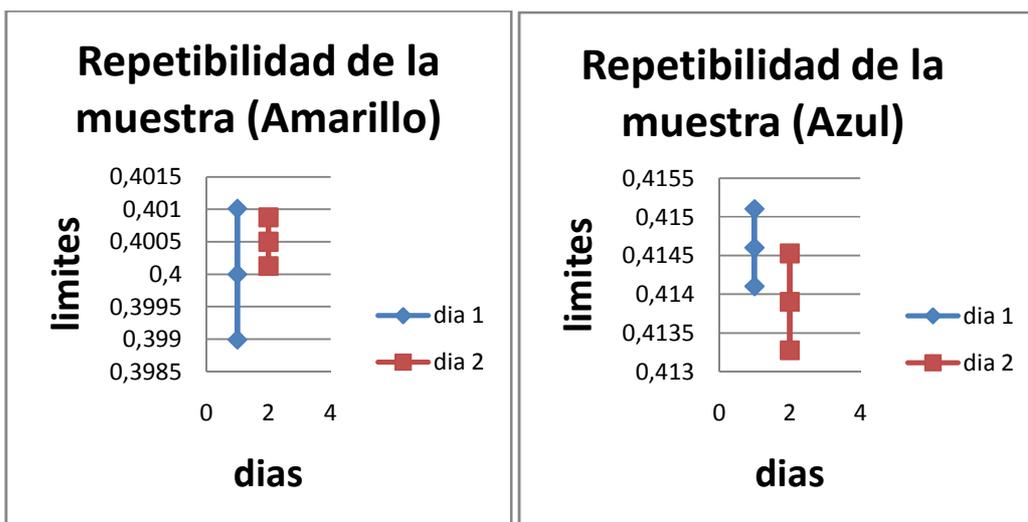


Figura VII.2 Gráfico de Intervalos de confianza de estándar de muestra avena

Donde se observa que las gráficas presentan puntos en comunes por lo cual confirmamos que los promedios de los dos días son iguales para ambos métodos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

VII.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Para evaluar la linealidad se efectuó una curva de calibración normal de 4 puntos en un rango de concentración de 0 a 8 ppm de una serie de estándares de Fósforo. Los resultados fueron evaluados mediante las dos formas siguientes:

1. Coeficiente de determinación
2. Porcentaje de linealidad

VII.2.2.1 COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN

La prueba del coeficiente de determinación, es una de las formas de confirmar el comportamiento lineal entre dos variables. Para que se considere que una recta se ajusta a un modelo lineal el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual que 0.99. Los coeficientes de determinación fueron calculados mediante la siguiente fórmula:

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

Los resultados de las absorbancias de los estándares de Fósforo para cada curva de calibración por ambos métodos y los resultados de los parámetros de regresión se presentan en la tabla VII.5.

CCN			
conc	absorb		
0	0.0006	a	0.00148
2	0.0388	b	0.018355
4	0.0758	r²	0.9998339
6	0.1115	Sa	0.00066918
8	0.1478	Sb	0.0001366
		Sx/y	0.00086391
		n	5

CCN			
conc	absorb		
0	0.0007	a	0.01518
2	0.1524	b	0.06027
4	0.2606	r²	0.9962951
6	0.376	Sa	0.01039535
8	0.4916	Sb	0.00212194
		Sx/y	0.01342033
		n	5

Tabla VII.5 Resultados de los cálculos del coeficiente de determinación para las rectas de calibración

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tal y como se observa en la Tabla VII.5, el valor del coeficiente de determinación de la recta es próximo a la unidad (0.999 para el amarillo y 0.996 para el azul), por lo que podemos decir que se ajusta a un modelo lineal, es decir existe una excelente relación lineal entre la concentración de los estándares de Fósforo y la respuesta de cada uno de ellos, además se observa en la figura VII.3 que prácticamente los puntos están sobre la línea de mejor ajuste.

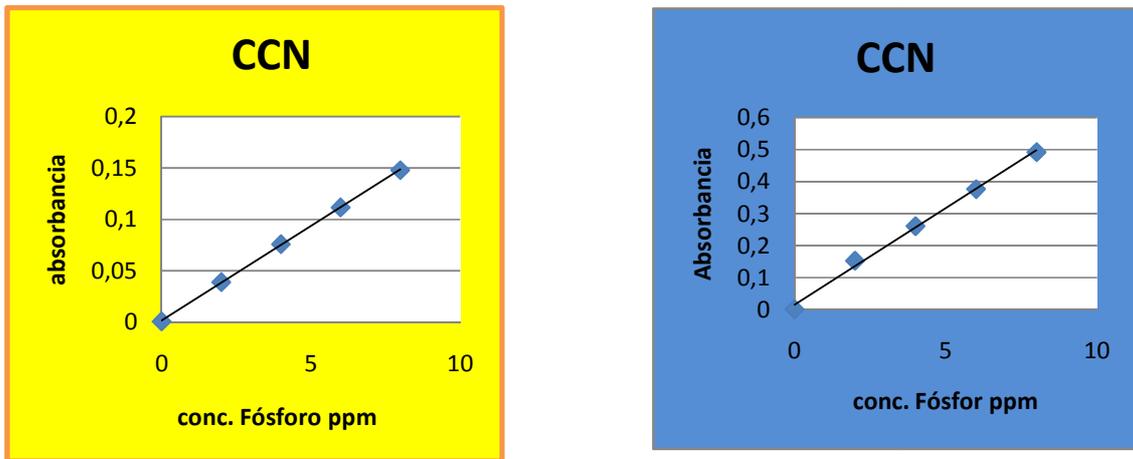


Figura VII.3 Gráfico de línea de mejor ajuste.

VII.2.2.2. PORCENTAJE DE LINEALIDAD

La prueba de porcentaje de linealidad, es otra de las formas de confirmar el comportamiento lineal entre dos variables. El estadístico del porcentaje de linealidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%Linealidad = \left(1 - \frac{S_{b_1}}{b_1}\right) \times 100$$

Dónde:

S_{b_1} : Es la desviación estándar de la pendiente

b_1 : Es la pendiente de la recta

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este caso cuanto más cercano se encuentre del 100% mayor será la linealidad de la recta. Para realizar este cálculo se utilizaron los resultados de los parámetros de regresión de cada curva de calibración. Al realizar el porcentaje de linealidad el resultado es el siguiente:

RECTA	% LINEALIDAD	RECTA	% LINEALIDAD
CCN	99.26	CCN	96.48

Tabla VII.6 Resultado del cálculo de % de Linealidad para la recta de calibración.

Tal y como se observa en la Tabla VII.6 el valor obtenido de porcentaje de linealidad es mayor al 95%, por tanto confirmamos que se observa que existe una buena linealidad en ambos métodos.

VII.2.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACION

Como ya hemos mencionado en el marco teórico, el límite de detección es la mínima concentración que proporciona una señal significativamente diferente a la de un blanco y que puede considerarse que es causada por el analito.

El límite de cuantificación se define como la mínima concentración de analito que origina medidas cuantitativas con aceptable exactitud y precisión, que puede considerarse como el límite inferior del rango lineal.

Utilizando una ecuación que toma en cuenta los efectos de la señal del blanco, la que proporciona una mayor precisión en la determinación de los límites en rangos de concentración bajos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este caso las ecuaciones de cálculo empleadas fueron:

$$LD = \frac{3.29 \times S_a \times C_E}{Y_A} \quad LC = \frac{10 \times S_a \times C_E}{Y_A}$$

Donde S_a es la desviación estándar del blanco,

CE: concentración del estándar del fósforo.

Ya: lectura del estándar menos lectura del blanco.

Los resultados de las lecturas del blanco y los valores del límite de detección y de cuantificación se presentan en la tabla VII.7

Replicas	blanco	
	Amarillo	Azul
1	0.074	0.054
2	0.076	0.053
3	0.077	0.053
4	0.072	0.053
5	0.075	0.054
yb	0.0748	0.0534
Sa	0.001923538	0.000548
CE	5	5
Ye	0.1488	0.2214
Ya	0.074	0.168
LD ppm	0.428	0.054
LC ppm	1.300	0.163

Tabla VII.7 Media de los límites de detección y cuantificación utilizando la señal del blanco.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados del límite de detección y de cuantificación fueron de 0.428 ppm y 1.300 ppm para el método amarillo y 0.054 ppm y 0.163 ppm para el método azul. Como se puede observar en ambos el límite de cuantificación es relativamente bajo y en ambos casos es menor que el primer punto de la curva de calibración normal.

VII.2.4 EXACTITUD

VII.2.5.2 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN CALCULADO A PARTIR DE LAS RECTAS DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN Y CALIBRACIÓN NORMAL.

En este caso evaluamos la exactitud como porcentaje de recuperación de las muestras, pero utilizando los valores de las pendientes de las rectas de calibración por adición patrón (bCAP) y normal (bCN), mediante la siguiente fórmula:

$$\%R \left(\frac{b_1^{RCAP}}{b_1^{RCN}} \right) \times 100$$

Los parámetros de las rectas de adición patrón y normal se muestran en la tabla VII.8 y los resultados del cálculo de los porcentajes obtenidos se muestran en la tabla VII.9.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Parámetro	CCN	CAP (AVENA)	CAP (PINOL)	CAP (CEBADA)
a	0.0015	0.2157	0.60344	0.1579
b	0.0184	0.0184	0.01276	0.0193
r ²	0.9998	0.9975	0.996	0.9964
S _b	0.00014	0.00053	0.00083	0.00067

Parámetro	CCN	RCAP (AVENA)	RCAP (PINOL)	RCAP (CEBADA)
a	0.0152	0.4047	1.0618	0.2826
b	0.0603	0.059	0.0632	0.0682
r ²	0.9963	0.9973	0.9963	0.9958
S _b	0.0021	0.0018	0.00022	0.0068

Tabla VII.8 *Parámetros de las rectas de calibración de adición patrón y normal.*

%R(Avena)	100.0 +/- 3.0	%R(AVENA)	97.8 +/- 3.1
%R(Pinol)	69.30 +/- 4.4	%R(PINOL)	104.8 +/- 0.9
%R(Cebada)	104.9 +/- 3.7	%R(CEBADA)	113.1 +/- 11.3

Tabla VII.9 *Porcentajes de recuperación de las muestras y sus incertidumbres obtenidos a partir de las pendientes de las rectas de adición patrón y normal.*

En la bibliografía se establece que, los porcentajes de recuperación deben ser entre 80 y 110%, si relacionamos estos resultados podemos decir que las muestras se encuentran en el intervalo esperado por lo que los métodos presentan buena exactitud en sus resultados. En la recuperación de fósforo en la muestra de cebada por el método azul es de 113%, este valor lo podemos aceptar debido a su intervalo pasa por el cien por ciento de recuperación.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Sin embargo en la muestra de pinol por el método del amarillo, el porcentaje de recuperación es muy bajo (69.30%) por lo que podemos afirmar que la exactitud del método no es buena cuando se trabaja con este tipo de matriz.

VII.2.5 ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ

El estudio del efecto matriz se realiza con el fin de determinar la existencia de interferencias en la matriz que pueden afectar la determinación del analito. Existen dos tipos de efecto matriz:

- **Intensificador:** si las interferencias producen aumento en la señal del analito adicionado en la matriz y la pendiente de la recta mayor que la de la recta realizada con calibración normal.
- **Depresor:** si las interferencias de la matriz producen disminución en la señal del analito adicionado en la matriz y la pendiente de la recta es menor que la de la recta realizada con calibración normal.

Para realizar el estudio del efecto matriz realizamos rectas de adición patrón preparando disoluciones de las muestras, de las que tomamos alícuotas definidas, a las que le adicionamos cantidades crecientes de un estándar de Fosforo. De esta forma obtuvimos 3 rectas de adición patrón para las muestras de avena, cebada y pinol y una recta de calibración normal. los parámetros de las 4 rectas se muestran en la tabla VII.8.

El efecto matriz fue estudiado mediante:

- Comparación directa de la pendiente de la recta de adición patrón entre la pendiente de la recta de calibración normal.
- Porcentaje de Efecto de Matriz.
- Comparación de las pendientes con sus intervalos.

VII.2.5.1 COMPARACIÓN DE LAS PENDIENTES DE LAS RECTAS DE ADICIÓN PATRÓN RESPECTO A LA PENDIENTE DE LA RECTA DE CALIBRACIÓN NORMAL.

La comparación de las rectas de adición patrón respecto a la pendiente de la recta de calibración normal, la realizamos empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto Matriz} = \frac{b1_{(RAP)}}{b1_{(RCN)}}$$

De esto podemos deducir tres posible situaciones:

1. Que, $b1_{(RAP)} = b1_{(RCN)}$, en este caso no existe efecto matriz y el resultado de la división es igual a 1. El grafico obtenido mostrará que las dos rectas se ubican paralelas entre sí.
2. Que, $b1_{(RAP)} > b1_{(RCN)}$, en este caso existe efecto matriz intensificador y el resultado de la división es mayor que 1. El grafico obtenido mostrará que la dos recta de adición patrón no son paralelas entre sí, observándose alejamiento positivo de la recta de adición patrón respecto a la recta de calibración normal.
3. Que, $b1_{(RAP)} < b1_{(RCN)}$, en este caso existe efecto matriz depresor y el resultado de la división es menor que 1. El grafico obtenido mostrará que la dos recta de adición patrón no son paralelas entre sí, observándose alejamiento negativo de la recta de adición patrón respecto a la recta de calibración normal.

Suele suceder sin embargo que, las pendientes de las rectas de calibración de adición patrón y de calibración normal son similares entre si y en este caso se suele observar en el grafico que las rectas son paralelas entre sí, en este caso existe un pequeño efecto matriz, que puede ser despreciable en función de los resultados de los análisis realizados.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este caso se suele determinar el porcentaje de efecto matriz, mediante la siguiente ecuación.

$$\% EM = \left[1 - \left(\frac{b1_{(RAP)}}{b1_{(RCN)}} \right) \right] \times 100$$

Relación	%EM	Relación	%EM
b1 _(RCN) vs b1 _(RAP AVENA)	0.0272	b1 _(RCN) vs b1 _(RAP AVENA)	2.165
b1 _(RCN) vs. b1 _(RAP PINOL)	30.4822	b1 _(RCN) vs. b1 _(RAP PINOL)	-4.861
b1 _(RCN) vs b1 _(RAP CEBADA)	-5.175	b1 _(RCN) vs b1 _(RAP CEBADA)	-12.12

Tabla VII.10 Tabla del porcentaje de efecto matriz (%EM).

Tal y como se observa en la tabla, existe un efecto matriz en la muestra pinol por el método amarillo y también un pequeño efecto depresor en las muestras de cebada por el método azul, al tomar en consideración el porcentaje del efecto de matriz.

Al graficar todas las curvas de adición patrón de las muestras de avena, pinol y cebada con respecto a la recta de la curva de calibración normal se observa una pequeña diferencia en la pendiente de la curva de adición patrón de la muestra de pinol con respecto a la curva de calibración normal por lo que podemos confirmar que en este tipo de muestra existe efecto de matriz cuando se realiza la lectura del complejo amarillo.

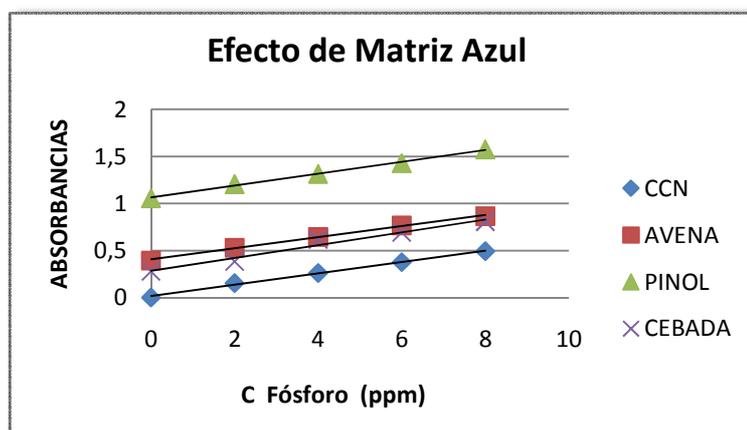
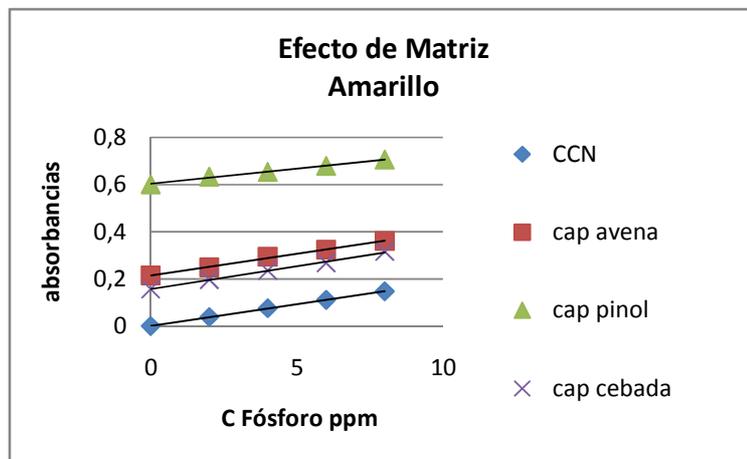


Figura VII.4 Gráficos del efecto Matriz para los métodos.

Si graficamos las curvas de adición patrón para las tres muestras respecto a la curva de calibración normal observamos que las pendientes de las rectas no varían mucho por lo que se observa que no existe efecto de matriz cuando realizamos la lectura del complejo azul en las diferentes muestras. Incluso para la curva de adición patrón de la muestra de pinol no se observa muy claramente la diferencia de la pendiente por lo que decidimos realizar el análisis con el gráfico de las pendientes con sus intervalos. Los cálculos de los intervalos se presentan en la tabla VII.11 y los gráficos en la figura VII.5.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

PARAMETROS	CCN	CAP (AVENA)	CAP (PINOL)	CAP (CEBADA)
Lbs.	0.0188	0.0199	0.0151	0.0212
b	0.0184	0.0184	0.0128	0.0193
Lib	0.018	0.0169	0.0105	0.0174

PARAMETROS	CCN	RCAP (AVENA)	RCAP (PINOL)	RCAP (CEBADA)
Lbs.	0.067	0.064	0.0638	0.0871
b	0.0603	0.059	0.0632	0.0682
Lib	0.0536	0.054	0.0626	0.0493

Tabla VII.11 Parámetros de la curva CCN vs CAP

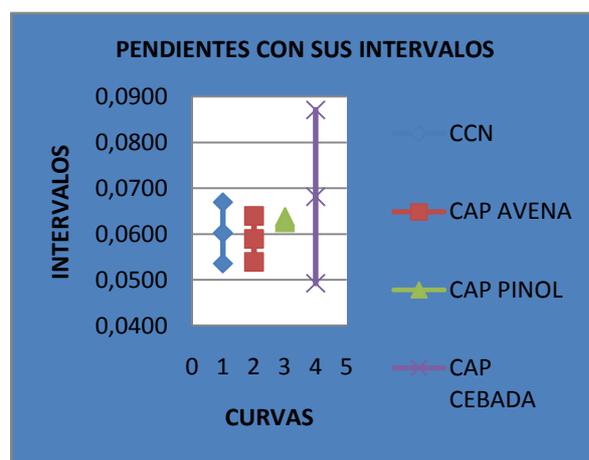
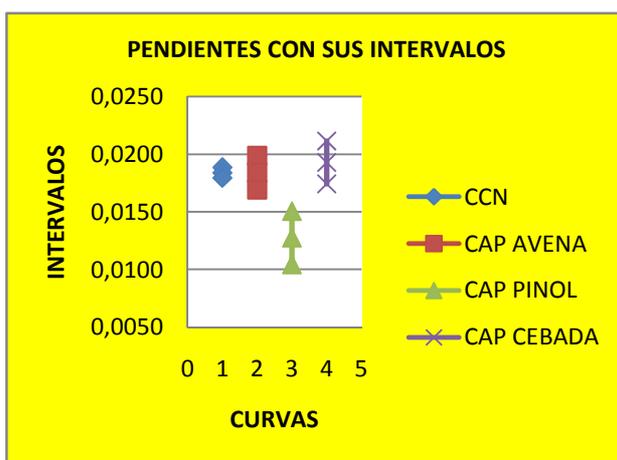


Figura VII.5 Gráficos de las pendientes y sus intervalos para los métodos.

Como se puede observar en el gráfico de los intervalos por el método amarillo la pendiente de la CAP de la muestra pinol no presenta puntos en comunes con respecto a la pendiente de la CCN por lo que podemos afirmar que existe efecto de matriz. Por el método azul todas las pendientes presentan puntos en comunes por lo que afirmamos que no existe efecto de matriz.

VII.2.6 INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS

La incertidumbre es un parámetro que está asociado al resultado de una medición analítica, que nos indica cuan dispersos están los datos y las posibles fuentes de error que pueden influir en la determinación de un analito.

Para evaluar la incertidumbre de una medición espectrofotométrica se utilizó a manera de aplicación una muestra de agua que contenía fósforo, se calculó su concentración a partir de los parámetros de la curva de calibración normal.

Primeramente se encontró el modelo matemático que se utiliza para calcular la concentración. El modelo matemático es el siguiente:

$$\% P = \frac{A_m - a}{b} * \frac{V_2 * V_0 * 100}{V_i * m * 10e - 6}$$

Donde:

A_m : Absorbancia de la muestra.

a: Intercepto

b: Pendiente

V_0 : volumen de alícuota de 100 ml.

V_i : volumen de la alícuota de 10 ml (método amarillo)

V_2 : volumen de la alícuota de 50 ml (método amarillo)

A partir del modelo matemático se identificaron las fuentes de incertidumbre para cada componente a través del diagrama causa/ efecto. Cada uno de estos componentes principales tiene otras fuentes de incertidumbre los cuales se detallan en el diagrama que se presenta en la figura VII.6.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

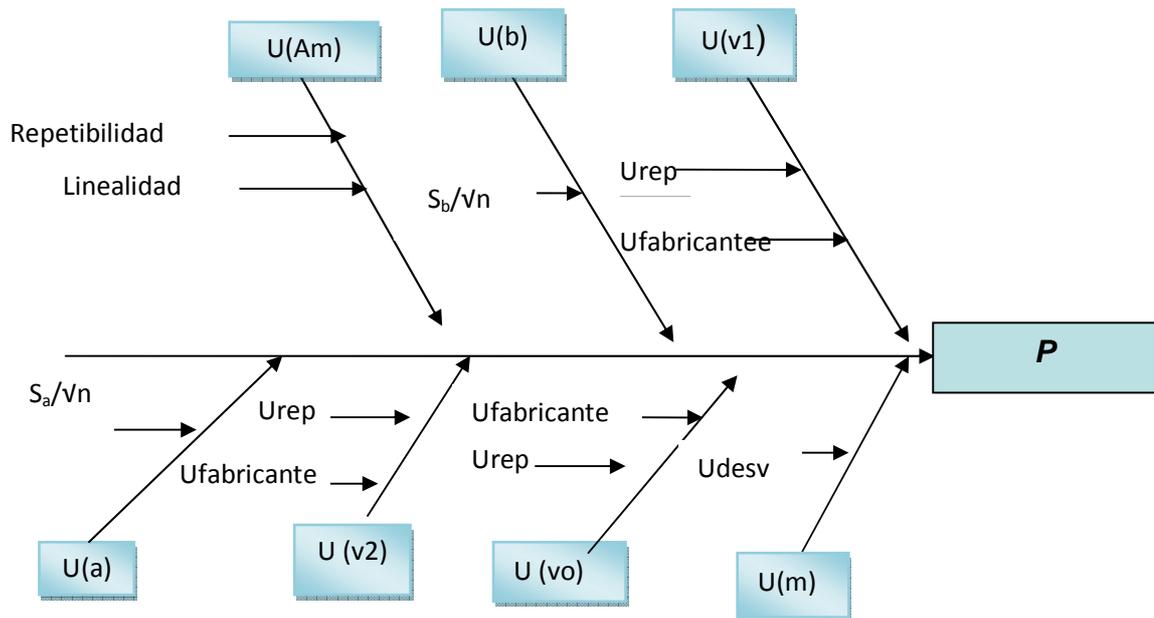


Figura VII.6 Diagrama de las principales fuentes de incertidumbres a partir de la curva calibración normal.

Existen siete componentes principales que influyen en la incertidumbre en P.

U_{Am}= Incertidumbre de la absorbancia de la muestra.

U_a= Incertidumbre del intercepto.

U_b= Incertidumbre de la pendiente.

U_{vo}= Incertidumbre del matraz de 100 ml.

μ_{v1} = Incertidumbre de la pipeta volumétrica de 10 ml. (método amarillo).

μ_{v2} = Incertidumbre del matraz de 50 ml. (método amarillo).

U_m= Incertidumbre de la masa.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Finalmente calculamos la incertidumbre mediante la siguiente ecuación:

$$U_{\%P} = \sqrt{(CAm^2 * UAm^2) + (Ca^2 * Ua^2) + (Cb^2 * Ub^2) + (CV_2^2 * UV_2^2) + (CV_0^2 * UV_0^2) + (CV_1^2 * UV_1^2) + (Cm^2 * Um^2) + (2 * Ca * Cb * Ua * Ub * r)}$$

Los resultados del contenido de Fósforo en las muestras de avena, pinol y cebada cuantificados a partir de la curva de calibración normal son las siguientes:

cereal	Complejo amarillo	Complejo azul
	Contenido de Fósforo con su incertidumbre (% P)	Contenido de Fósforo con su incertidumbre (%P)
Avena	0.721 +/- 0.004	1.070 +/- 0.023
Pinol	2.890 +/- 0.005	2.820 +/- 0.023
Cebada	1.000 +/- 0.003	0.394 +/- 0.023

Tabla VII.12 Resultado de contenido de fosforo con sus incertidumbres con respecto a la CCN.

De la misma manera se encuentra el modelo matemático para la cuantificación a partir de una curva de adición patrón. El modelo es el siguiente:

$$\% P = \frac{a}{b} * \frac{V_2 * V_0 * 100}{V_i * m * 10e - 6}$$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

A partir del modelo matemático se identificaron las fuentes de incertidumbre para cada componente a través del diagrama causa/ efecto. Cada uno de estos componentes principales tiene otras fuentes de incertidumbre los cuales se detallan el diagrama que se presenta en la figura VII.7.

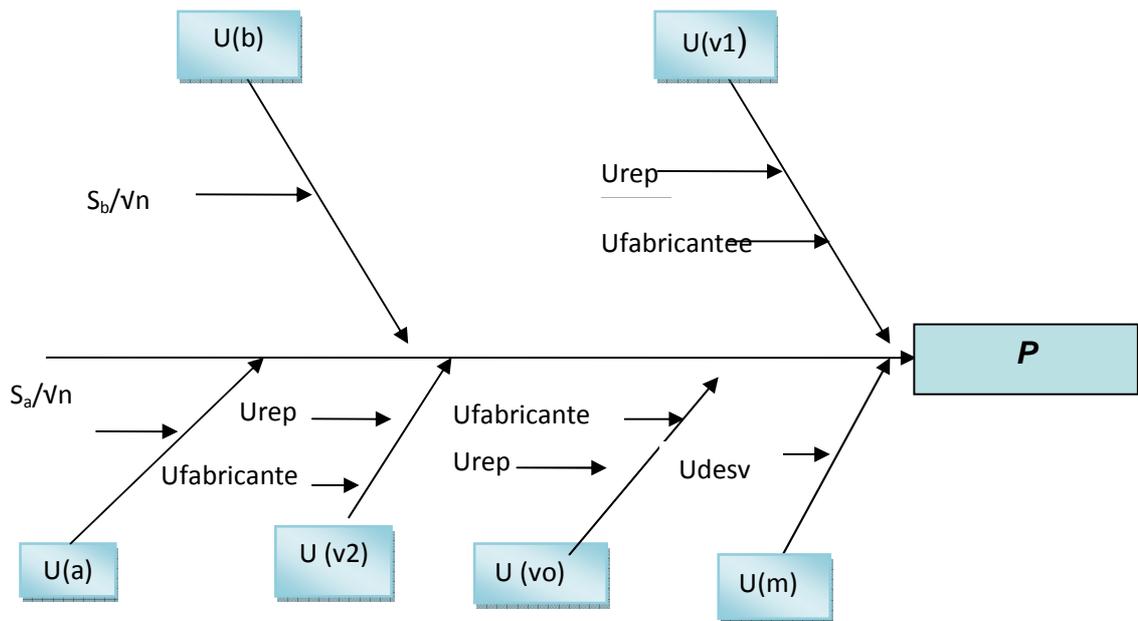


Figura VII.7 Diagrama de las principales fuentes de incertidumbres a partir de la curva adición patrón.

Y la incertidumbre combinada se calcula de la siguiente manera:

$$U_{\%P} = \sqrt{(Ca^2 * Ua^2) + (Cb^2 * Ub^2) + (CV_2^2 * UV_2^2) + (CV_0^2 * UV_0^2) + (CV_1^2 * UV_1^2) + (Cm^2 * Um^2) + (2 * Ca * Cb * Ua * Ub * r)}$$

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados del contenido de Fósforo en las muestras de avena, pinol y cebada cuantificados a partir de la curva de adición patrón son las siguientes:

cereal	Complejo amarillo	Complejo azul
	Contenido de Fósforo con su incertidumbre (% P)	Contenido de Fósforo con su incertidumbre (%P)
Avena	0.117 +/- 0.002	0.137 +/- 0.003
pinol	0.473 +/- 0.011	0.336 +/- 0.013
cebada	0.082 +/- 0.002	0.041 +/- 0.003

Tabla VII.13 Resultado de contenido de fosforo con sus incertidumbres con respecto a la CAP.

VIII. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron las muestras adecuadas según los criterios de consumo, existencia en el mercado y sobre todo el precio, obteniéndose tres muestras de cereales las cuales son: avena, pinol y cebada; estos tres cereales producidos y distribuidos por la misma empresa .
- En el presente trabajo también se evaluaron algunos parámetros de validación para ambos métodos, amarillo y el azul por lo cual podemos concluir lo siguiente:
 - En la evaluación de la precisión expresada como repetibilidad se observó que para ambos métodos se obtuvieron resultados buenos, tanto en la evaluación de la repetibilidad del equipo y la repetibilidad del método, esto se demostró con valores de coeficientes de variación menores del uno por ciento demostrándose la excelente repetibilidad de las lecturas.
 - Con respecto a la linealidad se obtuvo excelente relación lineal entre la respuesta del equipo (en absorbancia) y la concentración de los estándares de fósforo, con valores de coeficiente de regresión próximos a uno, además de un excelente porcentaje de linealidad mayores del 96 por ciento para ambos métodos.
 - Se obtuvo límites de detección de 0.428 ppm y 0.054 ppm de fósforo para el método amarillo y azul respectivamente. Por lo cual podemos afirmar que el método azul presenta mayor aplicación cuando existe menor cantidad de fósforo en las muestras.
 - También se evaluó el efecto de matriz para las tres muestras por ambos métodos obteniéndose que la muestra de pinol presenta un efecto de matriz provocando, depresor de la señal solamente para el método amarillo.

CONCLUSIONES

- De la misma manera el porcentaje de recuperación fue de 69.3 por ciento para esta misma muestra y por este mismo método.

- Se evaluó la incertidumbre para ambos métodos y también para las dos formas distintas de cuantificación, con curva de calibración normal y a partir de la curva de adición patrón, obteniéndose valores de incertidumbres menores de 0.03 con porcentajes menores del 5 por ciento de incertidumbre.

- De la misma manera se obtuvo la cantidad de fosforo en cada muestra demostrándose la aplicabilidad de cada método.

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

- Evaluar la exactitud del método utilizando una muestra de referencia.
- Aumentar el número de muestras.
- Aplicar el método a otras diferentes marcas comerciales de cereales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Miller N. James, Miller C. Jane. Estadística y Quimiometría para Química Analítica 4ta edición 2002.
- “Métodos espectroscópicos”, Maestría en Química aplicada al Análisis y Gestión de la Calidad. UNAN –LEÓN (Febrero del 2008)
- G. Delgado. Curso Validación de Métodos Analíticos. Maestría en Química Aplicada al Análisis y Gestión de la Calidad. UNAN-LEÓN (Febrero del 2008).
- ISO/IEC Guide 98:1995- Guide to the expression of uncertainty
- NORMA ISO / IEC 17025:2005.
- Lucas Hernández Hernández y Claudio Gonzales Pérez, Introducción al Análisis Instrumental.
- Douglas A. Skoog, F. James Holler y Stanley R. Crouch, Principios de Análisis Instrumental
- Schmit-Hebbel, H. “Ciencia y Tecnología de los Alimentos”. Editorial Universitaria, Santiago-Chile, 1981. Pulliainen & Walin: Journal of A.O.A.C. International Vol. 79, N° (1996)
- Monografía: Validación del Método Polarografía Clásica para la determinación de vitamina C en diferentes Cítricos. Br .María Cecilia Moreno García, Tutor: Dr. Gustavo Marcial Delgado Paniagua (2003)
- SILPA <http://amienses.blogspot.com/2010/04/parametros-de-validacion-de-metodos.html>

BIBLIOGRAFÍA

- Guillermo Ramis Ramos, María Celia García Álvarez-Coque. Quimiometría. Carlos Seoane Prado, Editorial Síntesis, S.A. (Madrid España), Año 2001 Págs 61-68. Junio 15, 2011, Monografía
- Gustavo Delgado, "Principios de estadística y técnicas de Validación". Departamento de Química, Facultad de Ciencias, UNAN-León, Nicaragua(1999)
- D.C. Harris, Análisis Químico Cuantitativo 2ª ed., Ed. Reverte. Capítulos 14 al 18
C. Baird, Química Ambiental, Ed. Reverté 2001. Capítulo 9.
- Fiske C.A.R & subarow (1925), Y.J Biol Chem Vol 66:375.
- Lowry, D.H & Lopez (1946) J.A.J Biol Chem Vol 162: 421.
- INCAP 1964 " Metodos de laboratorio Vol I Analisis de Alimentos" Instituto de Nutrición de Centro America, Guatemala G.A.



A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD