

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León
UNAN-León
Facultad de Ciencias y Tecnologías
Departamento de Química



Monografía para optar al título de licenciado en Química

“Desarrollo de un método analítico para la determinación de fósforo en medio acuoso, utilizando una aplicación móvil Android (app Photometrix). Como alternativa a métodos instrumentales de análisis convencionales”

Autores:

- **Br. Adler Valverde Velásquez.**
- **Br. Julissa Paola Obando Urey.**

Tutor:

MSc. Manuel Antonio Vanegas Carvajal.

León-Nicaragua, Agosto de 2021

“A la libertad por la universidad”



Resumen

El método desarrollado consiste en la reacción del ortofosfato con molibdato de amonio bajo condiciones ácidas, para formar un heteropoliácido, el ácido molibdofosfórico que en presencia del ion vanadato da lugar al ácido vanadomolibdofosfórico de color amarillo, cuya intensidad es proporcional a la concentración de fosfatos presentes en la muestra y es cuantificado por la app PhotoMetrix.

En el presente estudio llevó a cabo el desarrollo de un método basado en el análisis de imagen digital para la determinación de fosfatos en aguas. El fósforo contenido en las muestras se hizo reaccionar con la solución ácida de vanadato/molibdato para obtener un compuesto coloreado (color amarillo) el cual fue fotografiado desde la app PhotoMetrix para luego proceder a la obtención de los datos RGB de las imágenes digitales, los cuales permitieron la cuantificación de las concentraciones de fósforo. Primeramente, se llevó a cabo la optimización de las variables que influyen en el desarrollo del color (cantidad de reactivo y tiempo de reacción), por medio de la metodología de superficie de respuesta (RSM), en este sentido, con la ayuda del software Minitab® se realizó un diseño factorial completo para evaluar si las variables de partida presentaban la curvatura necesaria para luego proceder a la maximización de la respuesta y encontrar los valores óptimos. Posteriormente se realizó una evaluación de los parámetros: linealidad ($R = 0.99$, en el rango de 1 ppm a 19 ppm), límite de detección (LD: 0.30 mg/L), límite de cuantificación (LC: 0.91 mg/L), precisión ($CV < 0.06\%$). A continuación, se aplicó el método a diferentes muestras de aguas superficiales, los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados obtenidos por el método normalizado (4500 – P método del ácido vanadomolibdofosfórico), encontrándose que no existen diferencias significativas entre ambos. Finalmente se llevó a cabo un estudio del costo analítico del método desarrollado y se comparó con el costo del método normalizado, presentando el menor costo analítico el método desarrollado.



Abstract

The method developed consists of the reaction of the orthophosphate with ammonium molybdate under acidic conditions, to form a heteropoly acid, molybdophosphoric acid, which in the presence of the vanadate ion gives rise to the yellow vanadomolybdophosphoric acid, whose intensity is proportional to the concentration of phosphates present in the sample and it was quantified by the photometrix app.

Spectrophotometric methods have been commonly used in Nicaragua for the determination of phosphorus in waters. The present study carried out the development of a method based on digital image analysis for the determination of phosphates in water. The phosphorus contained in the samples was reacted with the acidic vanadate / molybdate solution to obtain a colored compound (yellow color) which was photographed from the photometrix app and then proceeded to obtain the RGB data from the digital images, this allowed the quantification of phosphorus concentrations. First of all, with the Minitab® software, the optimization of the variables influencing the color development (amount of reagent and reaction time) was carried out, through the response surface methodology (RSM), in this sense a full factorial design was used to evaluate if the starting variables had the necessary curvature for optimization. Subsequently, an evaluation of the following validation parameters was carried out: linearity ($R = 0.99$, ranging from 1 ppm to 19 ppm), detection limit (LD: 0.30 mg / L), quantification limit (LC: 0.91 mg / L), precision (CV <3%). After that, the method was applied to different samples of surface waters, the results obtained were compared with those obtained by the standardized method (4500 - P vanadomolybdophosphoric acid method), finding that there are no significant differences between both. Finally, a study of the analytical cost of the developed method was done and it was compared with the cost of the standardized method, with the developed method presenting the lowest analytical cost.



Índice

Resumen	i
Abstract.....	ii
1. Introducción	1
2. Antecedentes.	3
2.1. Colorimetría y telefonía móvil	3
2.2. App de análisis de color	4
2.2.1. <i>App PhotoMetrix</i>	4
2.2.2. <i>Coliremeter free - Live Color Picker</i>	4
2.2.3. <i>Colour detector</i>	5
2.2.4. <i>Color picker</i>	6
2.2.5. <i>ImageJ</i>	6
3. Planteamiento del problema	7
4. Justificación.....	8
5. Hipótesis.....	9
6. Objetivos	10
6.1. Objetivo General.....	10
6.2. Objetivos Específicos.....	10
7. Marco Teórico	11
7.1. Generalidades del fósforo	11
7.2. Imagen Digital.....	12
7.3. Color	13
7.4. Modelo RGB.....	14
7.5. Tratamiento digital	14
7.6. App Photometrix	15
7.7. Validación	17
7.7.1. Selectividad.....	18
7.7.2. Límite de Detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	18
7.7.3. Rango de trabajo	19
7.7.4. Veracidad	19
7.7.5. Precisión	20



7.7.6. Linealidad	21
8. Diseño Metodológico.....	22
8.1. Tipo de estudio.....	22
8.2. Área de estudio y localización de la investigación	22
8.3. Muestra	22
8.4. Fuente de información.....	23
8.5. Recolección de datos (Muestreo)	23
8.5.1. Generalidades del procedimiento	23
8.5.2. Selección del sitio de muestreo	24
8.5.3. Especificaciones del tipo de muestra.....	24
8.5.4. Equipo de protección personal básico	25
8.5.5. Material de muestreo	25
8.5.6. Manipulación primaria de la muestra.....	25
8.5.7. Numero de muestras	25
9. Descripción de Métodos.	27
9.1. Método de Referencia Colorimétrico del ácido Vanadomolibdofosfórico (APHA et al., 2017)	27
9.1.1. Discusión general.....	27
9.1.2. Parte Instrumental	27
9.2. Método de Análisis de Imagen Digital Desarrollado	28
9.2.1. Discusión general.....	28
9.2.2. Parte instrumental	29
10. Parte experimental	30
10.1. Materiales	30
10.2. Equipo.....	30
10.3. Reactivos	31
10.4. Preparación de soluciones	31
10.4.1. Solución acuosa de indicador de fenolftaleína.....	31
10.4.2. Solución HCl 0.5 N.....	31
10.4.3. Carbón activado.....	31
10.4.4. Reactivo vanadato-molibdato:.....	31
10.4.5. Solución patrón de fosfato:	32



10.4.6. Curva de calibrado del fosforo	32
10.5. Procedimientos	33
10.5.1. Calibración de la respuesta colorimétrica	33
10.5.2. Adquisición de imagen digital y extracción de datos RGB	33
10.5.3. Optimización y Diseño factorial completo	34
10.5.4. Procedimiento para evaluar los parámetros de validación	35
10.5.5. Procedimientos de muestreo	36
11. Resultados y Discusiones	37
11.1. Sistema de adquisición de imagen digital	37
11.2. Diseño factorial completo	37
11.2.1. Análisis de varianzas generados por el software Minitab®	39
11.3. Método de superficie de Respuesta	42
11.4. Validación del Método Analítico desarrollado	44
11.4.1. Linealidad e Intervalo de medición	44
11.4.2. Análisis de Precisión del método desarrollado	52
11.4.3. Límite de detección y Cuantificación	55
11.5. Aplicación del método y comparación con el método espectrofotométrico.	56
11.6. Costo analítico.	62
12. Conclusiones	66
13. Recomendaciones	68
14. Bibliografía	69
15. Anexos	71
15.1. Diagrama de flujo de proceso de trabajo	71
15.2. Tablas	72
15.2.1. Tabla de constantes físicas y química	72
15.3. Imágenes	73



Índice de Tablas.

<i>Tabla 1. Preparación de curva de calibrado</i>	32
<i>Tabla 2. Preparación de curva de calibrado par análisis de precisión</i>	36
<i>Tabla 3. Descripción de las variables de estudio</i>	37
<i>Tabla 4. Diseño factorial completo</i>	38
<i>Tabla 5. datos RGB concentraciones de 0.0 a 1.0ppm</i>	46
<i>Tabla 6. Linealidad del método canal RGB</i>	47
<i>Tabla 7. Linealidad del método canal R</i>	49
<i>Tabla 8. Linealidad del método canal G</i>	49
<i>Tabla 9. Linealidad del método canal B</i>	50
<i>Tabla 10. Resultados de la precisión en términos de repetitividad para de PO43 –en la determinación canal RGB</i>	53
<i>Tabla 11. Resultados de la precisión en términos de repetitividad para de PO43 –en la determinación canal R</i>	53
<i>Tabla 12. Resultados de la precisión en términos de repetitividad para de PO43 –en la determinación canal G</i>	54
<i>Tabla 13. Resultados de la precisión en términos de repetitividad para de PO43 –en la determinación canal B</i>	54
<i>Tabla 14. Resultados obtenidos de la curva de calibración normal</i>	55
<i>Tabla 15. Coordenadas y códigos de muestra</i>	57
<i>Tabla 16. Concentración de fosforo vs RGB</i>	58
<i>Tabla 17 Comparación de resultados de ambos métodos</i>	59
<i>Tabla 18. Valores de FCal y FTab</i>	60
<i>Tabla 19. Comparación de medias</i>	62
<i>Tabla 20. Comparación de costos de sistema de adquisición de imagen digital versus método normalizado</i>	63
<i>Tabla 21. Costo de soluciones utilizadas por ambos métodos</i>	63
<i>Tabla 22. Depreciación de Smartphone por uso de app PhotoMetrix</i>	64
<i>Tabla 23. Depreciación de Espectrofotómetro</i>	64
<i>Tabla 24. Constantes físicas y químicas</i>	72



1. Introducción

El fósforo se puede encontrar en forma de fosfatos y ortofosfatos, este puede llegar a alcanzar las aguas superficiales y las subterráneas como consecuencia de actividades industriales y domésticas.

Los avances en la tecnología moderna han permitido explorar y desarrollar nuevas técnicas y procedimientos en el campo de la química analítica, las técnicas instrumentales modernas permiten alcanzar límites de detección muy bajos, así mismo con la obtención de resultados confiables. Pese a esto, los instrumentos requeridos como por ejemplo un espectrofotómetro tienen un precio elevado en el mercado y mucha de esta instrumentación requiere de personal altamente capacitado. Los países en vía de desarrollo se ven afectados a la hora de adquirir este instrumental analítico principalmente por la falta de recursos, tal es el caso de las universidades y centros públicos que requieren de estos aparatos para un desempeño docente y laboral óptimo.

Uno de los métodos de análisis más empleado para la determinación de fósforo, como fosfatos, en aguas es el recomendado por los métodos estándares de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA), el fosfato es determinado colorimétricamente, realizando la medición de la absorbancia por espectrofotometría.

Recientemente los métodos analíticos basados en el análisis de imágenes digitales han sido utilizados como una alternativa para determinaciones simples en ciencias analíticas. Estos métodos emplean los datos de las imágenes digitales en los diferentes espacios del color como el rojo (R) verde (G) y azul (B) y sus derivados, como el tono y la saturación. Las imágenes digitales pueden ser capturadas por medio de diferentes dispositivos como los teléfonos inteligentes que se encuentran comúnmente disponibles en el mercado y que son utilizados diariamente por un gran número de personas. Durante la revisión bibliográfica, no se encontraron



antecedentes de trabajos realizados en nicaragua, relacionados con la determinación de fosfatos en aguas utilizando aplicaciones móviles capaces de realizar en análisis de imagen digital.

Dada la importancia de la determinación de fosfatos en aguas y la necesidad de las empresas encargadas del monitoreo y evaluación de la calidad de las aguas de contar con métodos que sean sencillos, rápidos, confiables y de bajo costo, en el presente trabajo se ha desarrollado un método analítico para la determinación de fósforo en medio acuoso, utilizando una aplicación móvil Android (app Photometrix).



2. Antecedentes.

2.1. Colorimetría y telefonía móvil

Heredando las ventajas y superando las desventajas de la colorimetría basada en análisis de imagen digital, los científicos han tratado de utilizar métodos espectroscópicos para cuantificar los cambios de color. Dado que los espectrómetros convencionales no pueden hacer un uso completo de la proximidad de la colorimetría basada en análisis de imagen digital, muchas personas han mirado como una alternativa el uso de los smartphones. Hoy en día se pueden encontrar variadas publicaciones sobre el uso de smartphones como sensores colorimétricos, debido principalmente a que los teléfonos inteligentes tienen aplicaciones que son fáciles de utilizar, en comparación con los softwares que emplean los espectrómetros, incluso una persona no entrenada puede llevar a cabo pruebas en cualquier situación con un teléfono móvil. La colorimetría basada en teléfonos inteligentes es reconocida como una tecnología innovadora, y las aplicaciones variables están en desarrollo, sin embargo, los teléfonos inteligentes solamente toman imágenes digitales a través de una cámara, por lo cual, en algunos casos, se tiene que recurrir a accesorios adicionales especialmente diseñados. Por ejemplo, los hardware opto-mecánicos que han sido diseñados para el análisis de sangre, en cuyo caso se mide la hemoglobina y otros para monitorear que se han diseñado para medir algunos productos químicos en agua (Gomez et al., 2018).

Se ha desarrollado algunas aplicaciones móviles para la detección colorimétrica, como por ejemplo las aplicaciones Colormeter® y Photometrix® utilizadas en combinación con la microfluídica. Estas aplicaciones son compatibles con las plataformas Android y Windows. Básicamente, los objetivos de la aplicación son capturar información sobre la intensidad del color y proporcionar un análisis quimiométrico. Photometrix® es una aplicación para la calibración univariante y análisis exploratorio de datos multivariados de la descomposición de las imágenes digitales adquiridas. Esta aplicación presenta una interfaz fácil de usar y se puede obtener de forma gratuita en la tienda de Google Play (Gomez et al., 2018).



2.2. App de análisis de color

2.2.1. App *PhotoMetrix*

Debido a que una imagen digital está compuesta de píxeles y puede ser definida por una función bidimensional de la intensidad de la luz reflejada o emitida por una escena, definida como una distribución de energía luminosa, en la que parte de esa energía es absorbida, otra parte es transmitida y otra parte es reflejada, éstas dos últimas partes pueden ser capturados por un dispositivo móvil.

Los recientes avances en tecnologías para la adquisición y procesamiento de imágenes digitales, así como la popularización de los equipos y aplicaciones móviles para tales fines han llamado la atención de la comunidad científica. El uso de imágenes digitales ha demostrado eficacia en aplicaciones que antes se restringían a un equipo específico tal como colorímetros o espectrofotómetros.

La aplicación, denominada *Photometrix*, emplea las técnicas de correlación lineal simple para el análisis univariante y análisis de componentes principales (PCA) para el análisis exploratorio multivariado. Los datos de imagen son capturados por la cámara principal del dispositivo y luego se extraen los datos en los canales del color rojo, verde y azul “RGB”, por sus siglas en inglés (Helfer et al., 2017)

2.2.2. *Coliremeter free - Live Color Picker*

Esta aplicación permite poner en funcionamiento la cámara al iniciarse. La zona de detección de imagen es fija, no puede interactuar con el usuario para que este elija la zona de píxeles de la que quiere obtener la medición. Al detectar la zona de imagen, hace una comparación inmediata y muestra el nombre del color elegido (rojo, azul, verde) sin dar mayor información cuantitativa del mismo. Los colores pueden ser archivados, pero no pueden ser enviados. También permite utilizar una



imagen del archivo para ser analizada. Su versión de pago aumenta el número de herramientas en la aplicación (Acemel, 2014)



Figura 1 Capturas de pantalla de la aplicación Coliremeter free

2.2.3. Colour detector

Esta app muestra de forma inmediata los valores RGB y HSV. La zona de detección de imagen es seleccionada por el usuario. Además, dispone de un panel de ajustes de la zona de píxeles que permite reajustar el tamaño, su forma y controlar algunos valores de los parámetros de la cámara (Acemel, 2014)

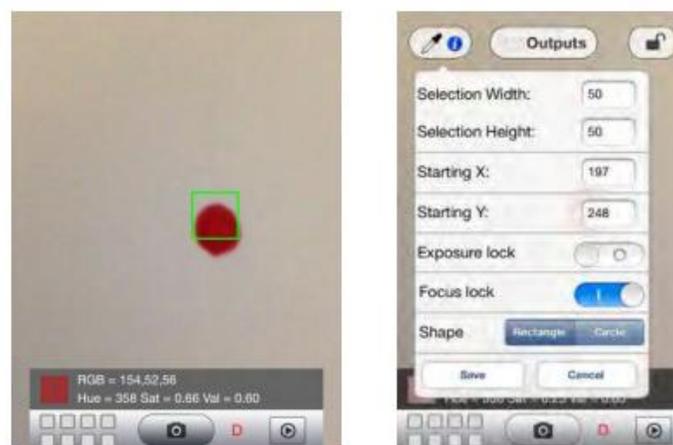


Figura 2 Capturas de pantalla de la App Colour detector



2.2.4. Color picker

Esta aplicación dispone de muchas más herramientas que las anteriores. Permite guardar las muestras analizadas, permitiendo editar el nombre y facilitando el acceso para enviarlas por e-mail. Sus mediciones tienen múltiples modos de color, aunque su uso es poco intuitivo (Acemel, 2014)

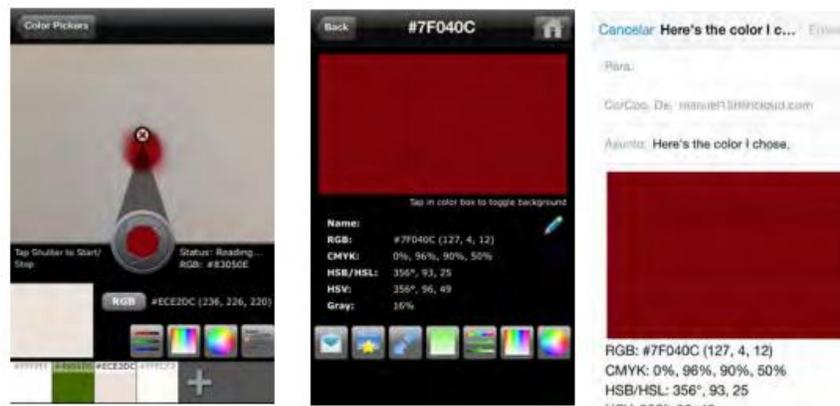


Figura 3 Capturas de pantalla aplicación Color picker

2.2.5. ImageJ

ImageJ es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health. ImageJ fue diseñado con una arquitectura abierta que proporciona extensibilidad vía plugins Java y macros (macroinstrucciones) grabables. Se pueden desarrollar plugins de escaneo personalizado, análisis y procesamiento usando el editor incluido en ImageJ y un compilador Java. Los plug-ins escritos por usuarios hacen posible resolver muchos problemas de procesado y análisis de imágenes, procesado de imágenes radiológicas, comparaciones de múltiples datos de sistema de imagen hasta sistemas automáticos de hematología. La arquitectura de plugins y entorno de desarrollo integrados de ImageJ lo han convertido en una plataforma popular para enseñar procesamiento de imagen digital. (Pasar, 2019)



3. Planteamiento del problema

El fósforo es un elemento esencial para los organismos vivos y se encuentra en el agua tanto disuelto como en partículas en suspensión (de Heredia Alonso et al., 2004). El fósforo soluble en agua natural, consiste grandemente de ortofosfatos, presentes en cuatro especies de acuerdo al pH: H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} . Otras formas de fosfato reactivo soluble incluyen los fosfatos orgánicos y polifosfatos, los cuales gradualmente son descompuestos por hidrólisis a ortofosfatos (Warwick et al., 2013). Cambios entre estas formas ocurren continuamente debido a la descomposición y síntesis de proteínas. Las diferentes especies inorgánicas se encuentran en equilibrio (de Heredia Alonso et al., 2004). En los sistemas acuáticos el fósforo puede originarse de las fuentes naturales tales como la mineralización de algas, disolución de minerales de fosfatos, fuentes de las descargas puntuales antropogénicas de aguas residuales y efluentes industriales, así como de fuentes de contaminación difusa de tierras agrícolas y de pastoreo. El interés medioambiental del fósforo proviene de su papel crítico en los procesos de eutrofización (Nollet & De Gelder, 2014). Generalmente es el nutriente limitante para el crecimiento de algas, siendo por tanto la causa principal de la eutrofización de ríos, lagos y embalses (de Heredia Alonso et al., 2004). El fósforo es un parámetro importante en los análisis de rutina de las aguas, siendo simultáneamente un macronutriente esencial y un posible contaminante, cuando su concentración es altamente anormal (Nollet & De Gelder, 2014). Las concentraciones de las diferentes fracciones de fósforo en muestras no preservadas puede ser afectada por diferentes procesos (físicos, químicos y biológicos) y se recomienda que su determinación se lleve a cabo inmediatamente después del muestreo (Nollet & De Gelder, 2014). Naturalmente las concentraciones de ortofosfatos varían en el rango de 0 a 0.01 mg/L. El método estándar para las mediciones de fosfato soluble se lleva a cabo por medio de una técnica colorimétrica desarrollada en 1960, la cual utiliza reactivos específicos los cuales requieren de una disposición segura, ésta implica un aumento de los costos (Warwick et al., 2013).



4. Justificación

Una de las necesidades primarias de la vida es el agua, ya que solamente podemos vivir pocos días sin agua. A pesar de que en la naturaleza se cuenta con abundante agua dulce de fuentes como ríos, lagos, estanques, etc. Existe escasez de agua en el mundo. Los parámetros fisicoquímicos juegan un papel importante en la evaluación de la calidad de las aguas, especialmente de los ecosistemas frágiles que mantienen varias formas de vida.

De acuerdo con Nollet & De Gelder (2014), dentro de los métodos analíticos utilizados para la determinación de fosfatos se encuentran: Colorimetría y espectrofotometría, técnicas de fotoluminiscencia, espectrometría atómica, métodos electroquímicos, método que emplean técnicas de separación, y métodos de inyección de flujo (Nollet & De Gelder, 2014). Sin embargo, estos métodos de determinación, utilizan técnicas analíticas, que requieren el empleo de grandes cantidades de reactivos, con la subsecuente generación de grandes cantidades de residuos, en la mayoría de los casos causan daños adversos sobre el medioambiente, por otro lado, estas técnicas requieren de personal que en algunos casos necesitan estar altamente entrenados, estos métodos también consumen mucho tiempo y dinero, debido a los costos de operación.

El presente trabajo propone el desarrollo de un método para la determinación de fosfatos (ortofosfatos), éste este caso utilizaremos una técnica analítica de bajo costo, la cual está basada en el empleo de una aplicación móvil con la cual se llevará a cabo el análisis de imagen digital de soluciones coloreadas conteniendo fosfatos. La intensidad del color de éstas, será directamente proporcional a la concentración de fosfatos en las muestras de aguas.



5. Hipótesis.

El Desarrollo y Monitoreo del método analítico basado en el Análisis de imágenes digitales, mediante el uso de un teléfono inteligente es apto para detectar o determinar los fosfatos presentes en muestras de agua utilizando técnicas analíticas de bajo costo operativo, sencillo y accesible.

El desarrollo de esta monografía, proporcionará un método alternativo, el cual tendrá las ventajas de: de bajo costo, posibilidad de realizar las determinaciones con sencillez (utilización de un teléfono móvil), accesibilidad global, poco consumo de reactivos, menos producción de residuos tóxicos para el medioambiente.



6. Objetivos

6.1. Objetivo General.

Desarrollar un método analítico basado en el análisis de imagen digital, utilizando una aplicación móvil Android, para la determinación de fosforo en medio acuoso.

6.2. Objetivos Específicos.

- Optimizar las variables que maximicen la respuesta analítica.
- Evaluar el buen desempeño del método, por medio de algunos parámetros de validación.
- Aplicar el método desarrollado a la determinación de fosfatos en aguas y comparar los resultados obtenidos con los obtenidos por el método normalizado 4500-P del APHA, AWWA, & WEF (2017)



7. Marco Teórico

7.1. Generalidades del fósforo

En las aguas naturales y residuales, el fósforo se presenta mayoritariamente en forma de fosfatos. Estos son clasificados en ortofosfatos, fosfatos condensados (piro, meta y otros polifosfatos) y fosfatos enlazados orgánicamente. Los fosfatos se encuentran en solución, en partículas o detritus o en cuerpos de organismos acuáticos y pueden provenir de diversas fuentes (Severiche-Sierra. et al., 2013)

Entre las fuentes de fósforo de origen natural cabe mencionar a los depósitos y rocas fosfóricas las cuales desprenden fósforo, en forma de ortofosfatos principalmente, mediante erosión. Las fuentes antropogénicas puntuales incluyen las aguas servidas domésticas e industriales; las fuentes no puntuales están asociadas con la escorrentía de áreas agrícolas y domésticas (Barreiros & Magne, 2015)

Los organismos dependen del fosforo, que es esencial para su crecimiento (y puede ser el nutriente limitador del crecimiento); la descarga de aguas residuales brutas o tratadas, drenados agrícolas o ciertos residuos industriales a ese cuerpo de agua, puede estimular el crecimiento de micro y macroorganismos acuáticos fotosintéticos en grandes cantidades, lo cual puede alterar el balance de la vida en este medio (Severiche-Sierra. et al., 2013)

El fósforo es considerado como un parámetro crítico en la calidad del agua debido a su influencia en el proceso de eutrofización, de ahí la importancia de disponer de técnicas analíticas y de muestreo adecuadas para la determinación de la concentración de las diferentes especies que pueden estar disueltas en el agua, adsorbidas sobre partículas o asociadas con organismos acuáticos (Severiche-Sierra. et al., 2013)



Una fracción del fósforo presente en los fertilizantes orgánicos e inorgánicos es adsorbida por las plantas, otra fracción es arrastrada por el agua y el resto se acumula en el suelo y sedimentos, lo cual trae como consecuencia la presencia de cantidades elevadas de este elemento en ríos y lagos. Las lluvias también contribuyen con una cantidad importante del fósforo total presente en las aguas superficiales (Acemel, 2014)

La concentración de fósforo en agua de lluvia varía con el tiempo y el espacio, reportando concentraciones más altas en zonas industriales y agrícolas durante la estación de verano (Acemel, 2014)

El aumento en la demanda de agua potable se debe al crecimiento demográfico mundial, al rápido desarrollo económico y social, a la urbanización acelerada, y a las mejoras en el nivel de vida y los ecosistemas circundantes (Nogueira et al., 2017). El control de la calidad del agua es muy importante, ya que esta es el medio de transporte de microorganismos y elementos químicos que puedan impactar la salud y el ambiente (Severiche-Sierra. et al., 2013)

El fósforo se encuentra en las aguas naturales y residuales casi exclusivamente en forma de fosfatos (ortofosfatos, polifosfatos y fosfatos orgánicamente enlazados). El fósforo total es la suma de los compuestos de las tres formas de fósforo (Baird et al., 2017)

7.2. Imagen Digital

Una imagen digital consiste en una matriz bidimensional de miles o millones de elementos discretos o píxeles (picture x element), donde cada uno tiene su propia dirección y tamaño y correspondiente representación del color. Los píxeles pueden contener tres valores representando niveles de rojo, verde y azul y un nivel de gris, alternativamente (Peterson, 2005).



La codificación de datos de píxeles de la imagen se realiza en formato binario de forma que los píxeles son portadores de información o señales según el número de bits por píxeles que describen la radiometría de la imagen. El valor del píxel (luminosidad de señal) o tonos de grises dependen del tipo de instrumento de registro y del ordenador usado. El rango de valores varía de 0 a 255 niveles de grises que exceden ampliamente las capacidades de apreciación del ojo humano. La información conteniendo los 256 valores pueden ser almacenados en registro de 8 bits o byte (2^8 combinaciones), estas codificaciones de 2^8 será suficiente para todas las aplicaciones de fotogrametría digital y es un índice importante de cada cámara digital incorporada en los Smartphone que se conoce como profundidad de píxel (bits/píxeles). La profundidad de píxeles determina la capacidad de la cámara o el sensor de imagen para separar determinados niveles de grises o tonos. A la codificación anterior hay que añadir la estructura interna de los datos que vendrán determinados por su organización secuencial o jerarquía, y por su orden de grabación, número de píxeles, por cada plano, banda o color (Peterson, 2005).

7.3. Color

El color es un efecto óptico en el que intervienen procesos fisiológicos, físicos y químicos; es una característica propia de cada objeto, que, al cambiar la fuente de luz, modifica igualmente el color de objeto. Esta sensación depende de factores como tipo de objeto, geometría, área, superficie, brillo, temperatura, entre muchos otros (Munoz & Rivas-mendoza, 2008)



7.4. Modelo RGB

La teoría del color indica que todos los colores se pueden generar en base a tres colores primarios. La combinación de estos tres colores se puede dar de forma activa, es decir a través de la combinación de luces de tres colores.

El modelo RGB (R, rojo; G, verde; B, azul) indica que todos los colores se pueden generar a través de la combinación de luces de color rojo, verde y azul de diferentes intensidades. Este modelo es utilizado para generar los colores en pantallas LED, LCD, Plasma, Smartphones, etc. Además, los sistemas de captura de imágenes también usan este modelo para codificar la imagen en una matriz de datos digitales.

Los valores de la intensidad de luz de los colores RGB crean un espacio matemático llamado espacio de color. Los valores de intensidad van desde 0% hasta 100%, sin embargo, dependiendo del software o aplicación usado para controlar los colores del monitor estos valores pueden ser representados por un número entre 0 y 1 o un número entero entre 0 y 225 (Barreiros & Magne, 2015)

7.5. Tratamiento digital

El análisis de imágenes involucra la investigación de los datos que esta puede proporcionar de acuerdo con la aplicación específica; se debe determinar el método para extraer dicha información. Este proceso requiere del uso de herramientas para lograr la segmentación de la imagen además de la transformación y extracción de la información. Este último paso es el proceso que permite la adquisición de la mayor información de la imagen, como la forma o el color de la misma. (Orozco, 2018)



7.6. App Photometrix

La aplicación Photometrix ha sido desarrollado para las plataformas Windows Phone y Android usando lenguajes de programación C # y Java, respectivamente, de acuerdo con el diseño estándar de software conocido como Model-View-ViewModel (MVVM). En general, se utilizó la mejor práctica de código de desarrollo, tales como el uso de métodos estáticos para la conversión entre sistemas de color y las operaciones en vectores y matrices. Con el objetivo de utilizar esta aplicación en otros países, se ha adoptado el inglés como el lenguaje estándar de información dentro de las interfaces y mensajes con el usuario. Para validar los resultados de salida de esta aplicación, se implementó el reensayo con otros softwares. Para validar los análisis univariantes, se utilizó Microsoft Excel 2013, mientras que para validar el análisis de componentes principales se utilizó el programa ChemoStat versión 1.0 (Helfer et al., 2017).

La interfaz principal de la aplicación incluye opciones univariantes de análisis, análisis multivariante, la configuración y la información de aplicación (figura 4A). En el módulo de configuración (figura 4B), el usuario define el número de muestras, y este valor también se puede ajustar antes de seleccionar el tamaño de la región de interés (ROI) a analizar, se puede seleccionar 32 x 32, 48 x 48, 64 x 64 o 96 x 96 píxeles, el uso opcional de flash, y la dirección de correo electrónico para recibir los datos de los análisis (Helfer et al., 2017).

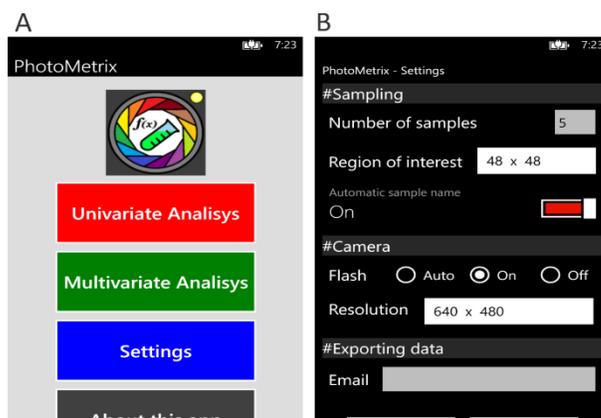


Figura 1. Interfaz gráfico (A) principal de aplicación Photometrix; (B) interfaz de configuración



El módulo de análisis univariado permite al usuario realizar la calibración, el muestreo (o predicción), la búsqueda de un análisis previamente guardada, o acceso a videos de tutoriales y de ayuda (Figura 5A). La aplicación realiza tanto la calibración como la predicción a partir de la imagen de la cámara que ha capturado, donde solo se utiliza solamente una ROI (Figura 5B). Luego se calculan los coeficientes: angular, lineal y de regresión. Después del muestreo, el resultado se predice de acuerdo con la calibración que se seleccionará de acuerdo con la ecuación de línea recta para cada canal o componente de color ("canal"), ver Figura 5C (Helfer et al., 2017).

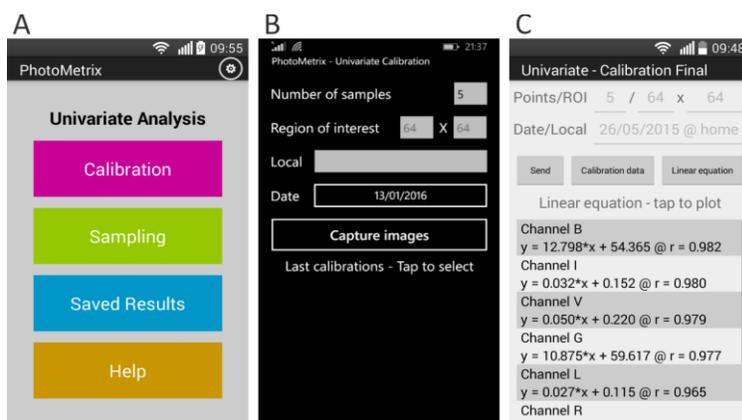


Figura 2.(A) interfaz principal del módulo de análisis univariado de aplicación PhotoMetrix; (B) interfaz de configuración para el número de muestras y la selección de ROI; (C) interfaz de resultado del análisis invariado

El módulo de análisis multivariado permite el muestreo, el procesamiento de un análisis previo (por ejemplo, usando diferentes configuraciones de las variables o canales de color), la búsqueda de un análisis previamente guardado, o incluso acceder a videos de tutoriales y ayuda (Figura 6A). Las imágenes, que también se obtienen mediante la cámara, pueden ser analizados a través de sus histogramas o incluso la combinación de canales de color seleccionados individualmente, teniendo la auto escala y concentración promedio como opciones de pretratamiento (Figura 6B). Luego, se realiza la descomposición del valor singular de la matriz de



datos, generando una variación de los resultados de los componentes principales además de los gráficos de puntaje y carga, ver figura 6C (Helfer et al., 2017).

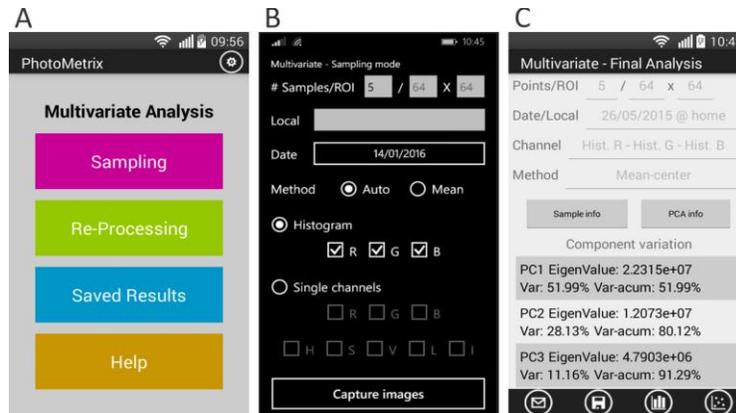


Figura 3. (A) Interfaz principal PhotoMetrix en el módulo de análisis multivariante; (B) interfaz de configuración de análisis multivariante; (C) interfaz de resultados de análisis multivariantes.

7.7. Validación

La Norma Internacional ISO/IEC 17025, establece en el ítem 7.2.2.1, que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificado de otra forma. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados. Además, indica que las características de desempeño pueden incluir, pero no se limitan a, el rango de medición, la exactitud, la incertidumbre de medición de los resultados, el límite de detección, el límite de cuantificación, la selectividad del método, la linealidad, la repetibilidad o la reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo y el sesgo. (ISO/IEC, 2017).



7.7.1. Selectividad

La selectividad analítica se relaciona con "la extensión en la cual método puede usarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar " (Eurachem, 2014)

7.7.2. Límite de Detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Donde las mediciones se realizan a baja concentraciones, hay tres conceptos generales a considerar. Primero, puede ser necesario establecer un valor del resultado que se considere que indica un nivel de analito que es significativamente diferente de cero. A menudo se requiere alguna acción a este nivel, como declarar un material contaminado. Este nivel se conoce como "valor crítico", "límite de decisión". En segundo lugar, es importante conocer la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel específico de confianza. Es decir, a qué concentración verdadera superaremos con confianza el valor crítico descrito. Para este concepto se utilizan términos como "límite de detección" (LD), "valor mínimo detectable". En tercer lugar, también es importante establecer el nivel más bajo en el que el rendimiento sea aceptable para una aplicación típica. Este tercer concepto generalmente se conoce como el límite de cuantificación (LC) (Eurachem, 2014).

También es necesario distinguir entre el límite de detección del instrumento y el límite de detección del método. El límite de detección del instrumento puede basarse en el análisis de una muestra, frecuentemente un blanco de reactivo, leído directamente en el instrumento (es decir, omitiendo cualquier paso de preparación de la muestra). Para obtener el límite de detección del método, el LD debe basarse en el análisis de muestras que han sido tratadas por medio de todo el procedimiento de medición utilizando resultados calculados con la misma ecuación que para las muestras de ensayo. El límite de detección del método es el más útil para la validación del método (Eurachem, 2014).



7.7.3. Rango de trabajo

El "rango de trabajo" es el intervalo durante el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El límite inferior del rango de trabajo está limitado por el límite de cuantificación LC. El extremo superior del rango de trabajo se define por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica (Eurachem, 2014).

7.7.4. Veracidad

La medición de "veracidad" es una expresión de cuán cerca está la media de un número infinito de resultados (producidos por el método) a un valor de referencia. Como no es posible tomar un número infinito de mediciones, no se puede medir la veracidad. Sin embargo, podemos hacer una evaluación práctica de la veracidad. Esta evaluación normalmente se expresa cuantitativamente en términos de "sesgo".

Una determinación práctica de sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados (X) del método candidato con un valor de referencia adecuado (X_{ref}). Hay tres enfoques generales disponibles: a) análisis de materiales de referencia, b) experimentos de recuperación utilizando muestras enriquecidas, y c) comparación con los resultados obtenidos con otro método. Los estudios de sesgo deben cubrir el alcance del método y, por lo tanto, pueden requerir el análisis de diferentes tipos de muestras y / o diferentes niveles de analitos (Eurachem, 2014).



7.7.5. Precisión

La precisión (precisión de medición) es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la dispersión de los resultados, generalmente la desviación estándar (o la desviación estándar relativa), calculada a partir de los resultados obtenidos al realizar mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas. Decidir las "condiciones especificadas" es un aspecto importante de la evaluación de la precisión de la medición: las condiciones determinan el tipo de estimación de precisión obtenida. La "repetitividad de la medición" y la "reproducibilidad de la medición" representan las dos medidas extremas de precisión que se pueden obtener. La documentación de los métodos estandarizados (por ejemplo, de ISO) normalmente incluirá tanto datos de repetitividad como de reproducibilidad cuando corresponda.

La repetitividad, que se espera que dé la menor variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición es realizada por un analista único que utiliza el mismo equipo en un corto período de tiempo.

La reproducibilidad, que se espera que proporcione la mayor variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios.

Entre estos dos extremos, la "precisión intermedia (medición)" proporciona una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetitividad. Las condiciones exactas utilizadas deben indicarse en cada caso. El objetivo es obtener una estimación de precisión que refleje todas las fuentes de variación que ocurrirán en un solo laboratorio en condiciones de rutina (diferentes analistas, escala de tiempo extendida, diferentes equipos, etc.) (Eurachem, 2014).



7.7.6. Linealidad

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionado con la aplicación del método, como criterio de aceptación de la linealidad a partir de la curva de calibración se considera $r^2 > 0.980$ (Castillo & González, 1996).



8. Diseño Metodológico

8.1. Tipo de estudio

La presente investigación se basa sistemáticamente en un estudio experimental, el cual conlleva el desarrollo de un método analítico y el análisis de muestras para la obtención de resultados de su aplicación en áreas donde existen altas posibilidades que existan contaminantes de este tipo y que de acuerdo con revisión bibliográfica realizada aún no se han realizado ningún tipo de estudio en el país.

8.2. Área de estudio y localización de la investigación

Rio Tamarindo es una corriente (class H - Hidrográfica) en (León), Nicaragua. Sus coordenadas son 12°11'47" N y 86°46'1" W en formato DMS (grados, minutos, segundos) o 12.1964 y -86.7669 (en grados decimales). Según Google earth.

El desarrollo del presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo en los Laboratorios de química de la Facultad de Ciencias y tecnología de la bicentenario UNAN-León donde se realizarán los análisis físicos químicos y demás pruebas relacionadas a la presente investigación.

8.3. Muestra

Aguas superficiales del rio tamarindo.



8.4. Fuente de información

En la presente investigación se ha tenido como fuente de información las bases de datos del sistema de bibliotecas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León y otras investigaciones publicadas en las diferentes plataformas digitales de acceso público.

8.5. Recolección de datos (Muestreo)

8.5.1. Generalidades del procedimiento

Para la recolección de muestras de aguas para análisis es importante a considerar previo al análisis, los aspectos principales en la toma de muestras que son:

Recipientes y volumen de la muestra

- Polietileno
- Lavado con HCl 1N y H₂O destilada

Las muestras deben recogerse de forma representativas en frascos limpios de plástico químicamente resistente. La porción máxima de muestra necesaria son 1000 ml. No se precisan conservantes especiales cuando hubiera que almacenar la muestra.

El tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis ha de ser el mínimo posible. Un método general de conservación es mantener la muestra a 4°C en la oscuridad.



8.5.2. Selección del sitio de muestreo

Los puntos estratégicos para muestreo que tienen importancia en los proyectos de estudios ambientales guiados, en cuencas hidrográficas, son los siguientes:

- Naciente - curso medio - desembocadura.
- Antes y después de los afluentes.
- En caso de muestras para análisis de consumo humano, el punto de muestreo será en el lugar exacto de la captación de agua.

8.5.3. Especificaciones del tipo de muestra

La identificación de la muestra, debe hacerse con cinta de embalaje y con marcador, debe contener por lo menos la siguiente información:

- Código de la muestra
- Fecha y hora de recolección
- Tipo de agua
- Procedencia
- Lugar de recolección
- Nombre del recolector
- Preservación realizada



8.5.4. Equipo de protección personal básico

- Guantes de nitrilo
- Mascarilla

8.5.5. Material de muestreo

- Ice pack
- Preservantes (Si aplica)
- Frascos de vidrio transparente y/o ámbar.
- Frascos de plásticos.

8.5.6. Manipulación primaria de la muestra

- Rotular los frascos, colocar el código, fecha y la hora exacta en que se está tomando la muestra.
- Colocarse los guantes de látex y mascarilla de ser necesario.
- Preservar las muestras en caso que lo requiera.
- Colocar los frascos tapados en el ice pack o hielo en la sombra mientras dura el muestreo y transporte al laboratorio.

8.5.7. Numero de muestras

Teniendo en cuenta las variaciones aleatorias, tanto en los procedimientos analíticos como en la presencia de componentes en el lugar de la toma de la



UNAN-León: Facultad de Ciencias y Tecnología, Dpto. de Química

muestra, una sola de ellas puede resultar insuficiente para alcanzar el nivel de certidumbre deseado.

Se tomará el número de muestras necesarias para la realización de réplicas necesarias en cada uno de los análisis o pruebas requeridas se prevé recolectar 1000 ml de muestra.



9. Descripción de Métodos.

9.1. Método de Referencia Colorimétrico del ácido Vanadomolibdofosfórico (APHA et al., 2017)

9.1.1. Discusión general

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

b) Interferencia: Sílice y arsenato interfieren positivamente sólo cuando se calienta la muestra. Arseniato, fluoruro, torio, bismuto, sulfuro, tiosulfato, tiocianato o exceso de molibdato producen interferencias negativas. El hierro ferroso produce un color azul, pero no afecta a los resultados si su concentración es inferior a 100 mg/l. La interferencia del sulfuro se puede eliminar por oxidación con agua de bromo. Los siguientes iones no interfieren en concentraciones de hasta 1.000 mg/l: Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^+ , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , U^{4+} , Zr^{4+} , AsO_3^- , Br^- , Co_3^{2-} , ClO_4^- , CN^- , IO_3^- pirofosfato, molibdato, tetraborato, selenato, benzoato, citrato, oxalato, lactato, tartrato, formato y salicilato. Si se usa HNO_3 en la prueba, Cl^- interfiere a 75 mg/l.

c) Concentración mínima detectable: La concentración mínima detectable es de 200 $\mu\text{g P/l}$ en cubetas de espectrofotómetro de 1 cm.

9.1.2. Parte Instrumental

a) Equipo colorimétrico: Se requiere uno de los siguientes:



- Espectrofotómetro, para uso a 400- 490 nm.

b) Material de vidrio lavado al ácido: Para determinar concentraciones bajas de fósforo, úsese material de vidrio lavado con ácido. La contaminación de fosfato es frecuente por su absorción en las superficies de vidrio. Evítese el uso de detergentes comerciales que contengan fosfato. Lávese todo el material de vidrio con HCl diluido caliente y aclárese bien con agua destilada. Es preferible reservar el material de vidrio sólo para la determinación de fosfato y después de usarlo se lavará y mantendrá lleno de agua hasta que se vuelva a necesitar. Si se hace así, el tratamiento de ácido sólo será necesario ocasionalmente.

9.2. Método de Análisis de Imagen Digital Desarrollado

9.2.1. Discusión general

Principio: Este nuevo método experimental describe el uso de un teléfono inteligente para la determinación de presencia de fósforo o fosfatos en agua mediante una reacción colorimétrica la cual supone un color amarillo en la misma; La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato. La intensidad de color es capturado utilizando un teléfono inteligente y se analiza a través de un App libre de nombre Photometrix. Antes de los análisis se tiene que calibrar la intensidad del color frente a concentraciones de soluciones estándar de referencia.

Interferencia: las concentraciones pueden o no variar según la temperatura del agua, además hay que tener en cuenta la cantidad de sólidos disueltos y suspendidos en el agua y la cantidad de materia orgánica presente en el agua.



9.2.2. Parte instrumental

Equipo de análisis colorimétrico: la detección colorimétrica se realiza mediante teléfonos inteligentes con la aplicación Photometrix que básicamente captura información sobre la intensidad del color desarrollado por medio de la reacción del analito contenido en la muestra y los reactivos adecuados para ello.

El material de lavado para equipo previo al muestreo: Para determinar concentraciones bajas de fósforo, es el mismo recomendado en el método desarrollado mencionado en el **inciso b** de la sección 9.1.2. Parte instrumental del método de Referencia del (APHA et al., 2017).



10. Parte experimental

10.1. Materiales

- Celda espectrofotométrica
- Pipeta volumétrica 1ml \pm 0.02 ml Fisherbrand™
- Pipeta graduada 5ml y 10ml \pm 0.015 ml Brand™
- Balón aforado Blaubrand™: 10ml \pm 0.06 ml, 25ml \pm 0.06 ml, 50ml \pm 0.09 ml y 100ml \pm 0.15 ml
- Matraz de lavado (Pizeta) 250 ml Thermo Scientific™
- Probeta 10ml y 50ml Thermo Scientific™
- Botellas de polietileno 500ml Velp Scientifica™
- Espátula Bochem™
- Beaker 250ml
- Varilla agitadora
- Erlenmeyer 250ml
- Parafilm
- Papel filtro whatman No. 40

10.2. Equipo

- Balanza analítica Sartorius GMBH gottingen (AC210S), $d=0.001g$.
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10s UV-Vis
- Smartphone RAM: 4.00GB, Android 9, Procesador: Sbpdragon 665, con app Photometrix instalada (version 1.1.16, última actualización: junio 14 de 2020).
- Computador portátil (Sistema operativo de 64 bits, procesador: Intel® Celeron® CPU N3060 @ 1.60GHZ , memoria RAM: 4.00GB)
- Cocina



10.3. Reactivos

- HCl Fisher scientific 37.5%
- H₂SO₄ Fisher scientific 95%
- HClO₄ Fisher scientific 70%
- HNO₃ Fisher scientific 86%
- (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O Merck
- KH₂PO₄ Fisher scientific
- NH₄VO₃ Fisher scientific 99.5%
- H₂O ENACAL
- Carbón activado Merck

10.4. Preparación de soluciones

10.4.1. Solución acuosa de indicador de fenolftaleína.

10.4.2. Solución HCl 0.5 N

En un balón aforado de 100 ml agregar 50 ml de agua destilada, adicionar 4.2 ml de HCl concentrado, aforar a 100ml con agua destilada.

10.4.3. Carbón activado

Elimínese las partículas finas por lavado con Agua destilada.

10.4.4. Reactivo vanadato-molibdato:

- Solución A: Disuélvase 8.28 g de molibdato amónico, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, en 100 ml de agua destilada.



- Solución B: Disuélvase 0.43 g de metavanadato de amonio, NH_4VO_3 , calentando hasta ebullición en 100 ml de agua destilada. Enfríese y añádanse 110 ml de HCl conc. Enfríese la solución B a temperatura ambiente, viértase la solución A sobre la B, mézclese y Dilúyase de 1 a 1.

10.4.5. Solución patrón de fosfato:

Disuélvase 219.5 mg de KH_2PO_4 anhidro en agua destilada y Dilúyase a 1000 ml; 1,00 ml = 50.0 mg de PO_4^{3-} - P.

10.4.6. Curva de calibrado del fosforo

A una serie de matraces aforados de 25ml se transfieren alícuotas de 0, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y 9.5 ml de la disolución patrón de fosfatos. Se agregan 5.0 ml de reactivo vanado-molibdato y se diluye a 25.0 ml con agua destilada para preparar patrones en el rango de concentraciones de 1 a 19.0 mg/l como se muestra en la **Tabla 1** a continuación.

Tabla 1. Preparación de curva de calibrado

Estándar	Solución estándar 50 mg/L	Vol. Reactivo vanadato- molibdato	Vol. Final
Blanco	0ml	5 ml	25 ml
1 ppm	0.5 ml	5 ml	25 ml
3 ppm	1.5 ml	5 ml	25 ml
5 ppm	2.5 ml	5 ml	25 ml
7 ppm	3.5 ml	5 ml	25 ml
9 ppm	4.5 ml	5 ml	25 ml
11 ppm	5.5 ml	5 ml	25 ml
13 ppm	6.5 ml	5 ml	25 ml
15 ppm	7.5 ml	5 ml	25 ml
17 ppm	8.5 ml	5 ml	25 ml
19 ppm	9.5 ml	5 ml	25 ml



- Dejar desarrollar el color durante 10 minutos.
- Capturar imagen con Smartphone utilizando la app photometrix
- Realizar gráficos de la curva de calibrado teniendo los datos RGB, R, G y B de los protones vs concentración de fosforo en los mismos

10.5. Procedimientos

10.5.1. Calibración de la respuesta colorimétrica

Antes de proceder a las determinaciones de concentración de fosforo en placas de porcelana se evalúa la respuesta colorimétrica de cada valor de concentración para establecer un patrón como referencia. La respuesta analítica se obtiene mediante el uso de información de color de los canales RGB. Este canal mide la saturación de color (es decir, la cantidad de color que está presente en los datos obtenidos serán linealmente equipados y presentan un coeficiente de determinación igual a 0.99.

La fiabilidad de la respuesta colorimétrica captada sobre las cavidades de la placa de porcelana se compara con los valores obtenidos usando el método de referencia donde se preparan soluciones de forma secuencial. Luego de la preparación de los patrones con goteros se vierten sobre la placa para esperar la respuesta colorimétrica sobre este, cuando esta respuesta sea obtenida se captura imágenes con la aplicación Photometrix para obtener datos similares a los de una curva de calibrado.(Nogueira et al., 2017)

10.5.2. Adquisición de imagen digital y extracción de datos RGB.

Las imágenes son capturadas con un Smartphone modelo Moto G8 Plus, equipado con una cámara principal de resolución de 48MP, las imágenes son capturadas a través de la App Photometrix, disponible para su descarga gratuita en la tienda de



Google Play. Todas las imágenes son capturadas con la luz de ambiente, manteniendo el teléfono inteligente a una distancia de 10 cm desde el dispositivo hasta la placa de porcelana de 12 cavidades. La región de interés es descompuesta en los siguientes canales de color: Rojo(R), Verde (G), Azul (B) mediante la misma app. Las imágenes digitales son codificadas según el orden experimental. (Helfer et al., 2017)

10.5.3. Optimización y Diseño factorial completo

Se realizó la optimización del método analítico para la cuantificación de fosfatos en agua, para poder definir las concentraciones se realizaron distintas pruebas modificando las siguientes variables:

- Iluminación del área de trabajo
- Tiempo de reacción / desarrollo del color (10 minutos exactos)
- Distancia focal del Smartphone a 10 centímetros entre la lente de la cámara y la muestra.
- Tiempo de espera inmediato para captar las imágenes una vez se haya desarrollado bien el color.

Para el diseño factorial completo se utilizó el software *Minitab*® 17.1.0 de la siguiente manera:

- Seleccionar en la barra de herramientas las opciones: Estadísticas/DOE/Factorial/Crear diseño factorial.
- Seleccionar el tipo de diseño: Factorial de 2 niveles
- Número de factores: 3
- Diseño: Factorial Completo (Corridas 9, Resolución Completo, 2^3)
- Número de puntos centrales por bloque: 5
- Número de réplicas por puntos factoriales: 1



- Número de bloques: 1
- En factores: introducir los nombres de los factores, tipo numérico, introducir los valores de las variables naturales en las variables codificadas como +1 y -1.
- En opciones desactivar la casilla: aleatorizar corridas y dejar todo lo demás como está marcado por defecto.
- Presionar el botón aceptar.

Los resultados obtenidos para cada experimento fueron ingresados en una nueva columna en la hoja de trabajo de *Minitab*® 17.1.0 como respuesta del espacio R, G, B de manera individual y RGB como promedio de los tres colores.

10.5.4. Procedimiento para evaluar los parámetros de validación

10.5.4.1. Procedimiento de linealidad e intervalo de medición

Para realizar el procedimiento de linealidad e intervalo de medición se confecciona una curva de calibrado en concentraciones que van desde 1 mg/L a los 19 mg/L como se detalla en la **sección 10.4.6**.

10.5.4.2. Procedimiento de precisión

A una serie de matraces aforados de 25ml se transfieren alícuotas de 0, 2, 10, y 18 ml de la disolución patrón de fosfatos. Se agregan 5.0 ml de reactivo vanadomolibdato y se diluye a 25.0 ml con agua destilada para preparar patrones en el rango de concentraciones a como se muestra en la **Tabla 2** a continuación.



Tabla 2. Preparación de curva de calibrado par análisis de precisión

Estándar	Solución estándar 50 mg/L	Vol. Reactivo vanadato- molibdato	Vol. Final
Blanco	0ml	5 ml	25 ml
2 ppm	1 ml	5 ml	25 ml
10 ppm	5 ml	5 ml	25 ml
18ppm	9 ml	5 ml	25 ml

- Dejar desarrollar el color durante 10 minutos.
- Capturar imagen con Smartphone utilizando la app photometrix
- Realizar gráficos de la curva de calibrado teniendo los datos RGB, R, G y B de los protones vs concentración de fosforo en los mismos

10.5.5. Procedimientos de muestreo

En la **sección 8.5**. Se tratan generalidades de la recolección de datos, es decir: Muestreo. Teniendo en cuenta todas esas indicaciones se puede proceder a la recolección, preservación y almacenamiento de muestras:

- Tomar un mínimo de 500 mL de muestra en envases de plástico.
- Si la muestra solamente es analizada para determinar la forma de fósforo disuelto, filtrar la muestra inmediatamente después de la colecta a través de un papel filtro whatman 40.
- Conservar en refrigeración a 4°C.
- El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 28 días.

(NMX-AA-029-SCFI et al., 2001)



11. Resultados y Discusiones

11.1. Sistema de adquisición de imagen digital

Las imágenes digitales fueron capturadas con un Smartphone modelo Moto G8 Plus, equipado con una cámara de resolución de 48MP, las imágenes fueron capturadas a través de la App Photometrix, que encontramos y descargamos de forma gratuita en la tienda de Google Play. Todas las imágenes fueron capturadas con la luz del flash del teléfono inteligente, manteniéndolo a una distancia de 10 cm desde el dispositivo hasta la muestra. El modo de captura de la cámara utilizada fue enfoque manual, las imágenes tienen un formato de salida .jpg

11.2. Diseño factorial completo

Este diseño factorial sirve para determinar si el sistema está cerca del valor óptimo en las condiciones de trabajo actuales, en este caso el sistema debe presentar curvatura.

Con la ayuda del software Minitab®, se desarrolló un diseño factorial completo. Las variables estudiadas son las descritas en la **sección 10.5.3**. Proporciono 9 corridas (experimentos) para este propósito. Estas corridas son combinaciones de las variables estudiadas a como se muestran en la **Tabla 4**. Todas estas pruebas se llevan a cabo en el laboratorio a través de experimentos, y las respuestas se ingresan como parte de la hoja de trabajo de Minitab como se muestra en la siguiente tabla. Después de ingresar todas las respuestas del experimento, puede usar Minitab para realizar análisis de diseño factorial. Las variables estudiadas se muestran a continuación en la **Tabla 3**:

Tabla 3. Descripción de las variables de estudio

Factor	Nombre	Nivel bajo	Nivel alto
A	Volumen de reactivo	3	7
B	Tiempo de reacción	5	15



Tabla 4. Diseño factorial completo

Orden de Corrida	Vol. Reactivo	Tiempo de reacción	Respuestas de los Canales			
			RGB	R	G	B
1	5	10	55.7580	113.98	126.71	170.376
2	3	5	53.1503	91.047	95.287	144.303
3	3	15	58.7775	83.129	88.065	134.699
4	7	5	57.4782	87.897	93.844	137.328
5	3	15	54.1721	98.014	101.71	143.133
6	7	15	51.2638	99.278	102.44	130.081
7	3	5	54.2305	96.264	101.79	146.602
8	7	15	56.1805	98.994	102.20	130.029
9	7	5	43.4970	90.766	94.698	130.320

Una vez que se han introducido todas las respuestas de las corridas, se realizó el análisis del diseño factorial con el Minitab, en este apartado se muestran las respuestas para los canales RGB, R, G y B.



11.2.1. Análisis de varianzas generados por el software Minitab®

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	40.112	10.0281	0.33	0.845
Lineal	2	35.848	17.9238	0.59	0.595
V- Reactivo	1	17.734	17.7337	0.59	0.487
T- Reaccion	1	18.114	18.1139	0.60	0.482
Interacciones de 2 términos	1	0.101	0.1013	0.00	0.957
V- Reactivo*T- Reaccion	1	0.101	0.1013	0.00	0.957
Curvatura	1	4.164	4.1636	0.14	0.009
Error	4	121.012	30.2531		
Total	8	161.125			

Figura 4 Análisis de varianza, canales RGB

Regresión factorial: Rd vs. V- Reactivo, T- Reaccion, PtCentral					
Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	499.395	124.849	3.88	0.109
Lineal	2	31.574	15.787	0.49	0.645
V- Reactivo	1	8.992	8.992	0.28	0.625
T- Reaccion	1	22.582	22.582	0.70	0.449
Interacciones de 2 términos	1	83.060	83.060	2.58	0.183
V- Reactivo*T- Reaccion	1	83.060	83.060	2.58	0.183
Curvatura	1	384.761	384.761	11.97	0.026
Error	4	128.553	32.138		
Total	8	627.948			

Figura 5 Análisis de varianza, canal R.



Regresión factorial: Gn vs. V- Reactivo, T- Reaccion, PtCentral

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	841.200	210.300	7.34	0.040
Lineal	2	14.705	7.352	0.26	0.786
V- Reactivo	1	5.015	5.015	0.17	0.697
T- Reaccion	1	9.689	9.689	0.34	0.592
Interacciones de 2 términos	1	68.444	68.444	2.39	0.197
V- Reactivo*T- Reaccion	1	68.444	68.444	2.39	0.197
Curvatura	1	758.051	758.051	26.45	0.007
Error	4	114.648	28.662		
Total	8	955.848			

Figura 6 . Análisis de varianza, canal G

Regresión factorial: Bu vs. V- Reactivo, T- Reaccion, PtCentral

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	1253.36	313.340	19.97	0.007
Lineal	2	263.00	131.501	8.38	0.037
V- Reactivo	1	209.91	209.907	13.38	0.022
T- Reaccion	1	53.10	53.096	3.38	0.140
Interacciones de 2 términos	1	3.83	3.830	0.24	0.647
V- Reactivo*T- Reaccion	1	3.83	3.830	0.24	0.647
Curvatura	1	986.53	986.526	62.86	0.001
Error	4	62.77	15.693		
Total	8	1316.13			

Figura 7 Análisis de varianza, canal B

Se puede ver en las respuestas del análisis de varianza obtenidos de los canales RGB, R, G, y B la curvatura tiene un Valor-p igual a 0.009, 0.026, 0.007, 0.001



respectivamente, de acuerdo al criterio de que si el Valor-p < 0.05 entonces la curvatura de los canales RGB, R, G y B son significativas.

En otras palabras, el sistema está en el área óptima, por lo que luego podemos continuar aplicando el modelo de segundo orden para encontrar el punto óptimo.

De manera gráfica se logró comprobar el efecto de los factores variables y de sus interacciones por medio de un diagrama de Pareto (ver la **Figura 8**) llegando a la conclusión que solamente las variables del canal blue (B) son significativas.

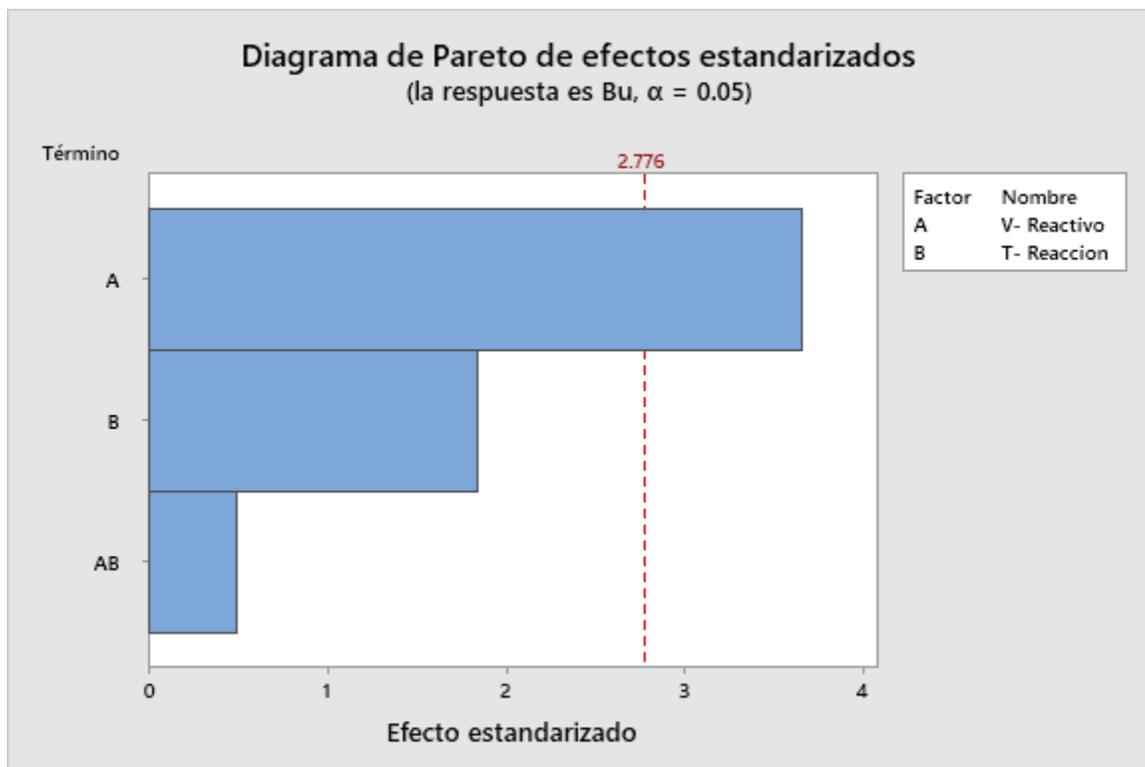


Figura 8 Diagrama de Pareto de los efectos para la respuesta B

Como puede verse en el diagrama anterior, solo el factor A (volumen de reactivo) en función de la variable tiene un impacto significativo en el modelo de respuesta. El factor "tiempo de reacción" y la interacción de otros factores no son importantes.



11.3. Método de superficie de Respuesta

En la siguiente grafica se muestra la respuesta al variar los factores, como se puede apreciar la **Figura 9** tiene forma al estilo montaña, esta indica que la respuesta presenta un máximo el cual es candidato a punto óptimo.

En el presente acápite se presentan los resultados del canal blue por ser estos los que presentaron mejores resultados.

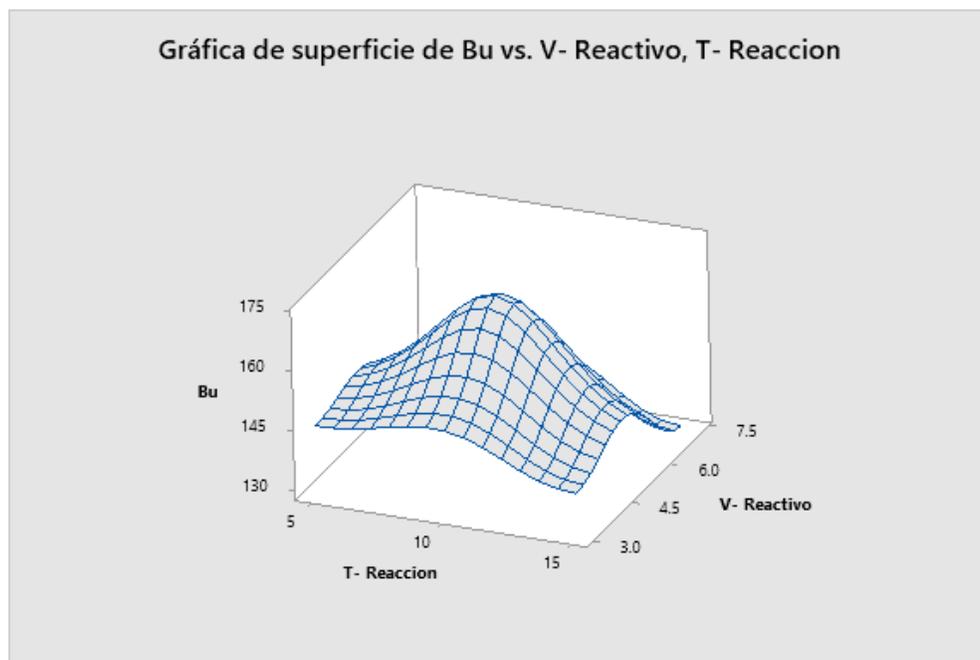


Figura 9 superficie de respuesta correspondiente al canal Blue B

La **Figura 10**, grafica de contorno de la superficie de respuesta se muestra a continuación se puede observar como la respuesta va aumentando al alcanzar el valor óptimo calculado

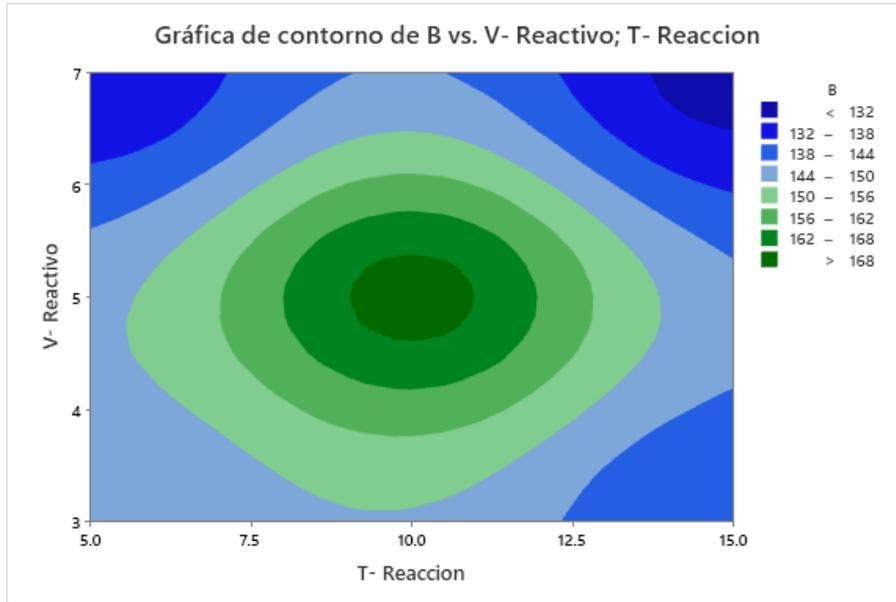


Figura 10 Gráfico contorno correspondiente al canal Blue B

Posteriormente, se realizó la optimización de la superficie de respuesta usando el Minitab®, en la **Figura 11** se pueden apreciar los valores de los factores optimizados, los cuales equivalen a las variables volumen de reactivo (vanadomolibdofosforico) y tiempo de reacción. Como resultado obtuvimos 5 mililitros y 10 minutos respectivamente.

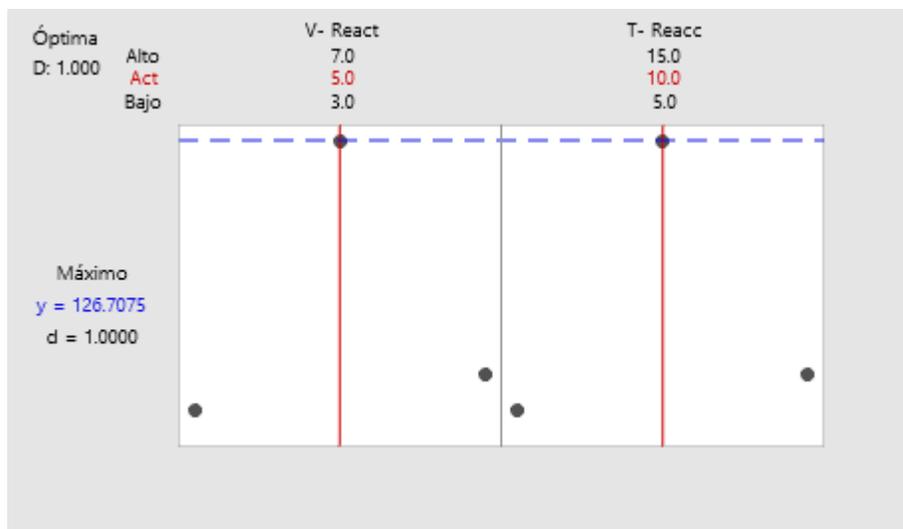


Figura 11 Grafica de optimización



11.4. Validación del Método Analítico desarrollado

Como parte de la validación, se evaluaron algunos parámetros que definen el buen desempeño del método analítico desarrollado, tales como: Linealidad, Limite de detección, Limite de cuantificación, Precisión, Selectividad, Repetividad y Exactitud a continuación se detallan cada uno de ellos.

11.4.1. Linealidad e Intervalo de medición

Para llevar a cabo el estudio de linealidad y el rango lineal se prepararon una serie de estándares de KH_2PO_4 , estas disoluciones estándares fueron fotografiadas para luego extraer los datos RGB de cada una de las imágenes. La Linealidad se evaluó por separado para cada uno de los canales rojo(R), verde (G) y azul (B), así como utilizando el promedio de estos tres canales RGB. En la siguiente figura se puede observar la imagen digital de las disoluciones estándares en el rango de 1 ppm a 19 ppm y el blanco analítico (corresponde a 0 ppm).



Figura 12 disoluciones estándar' de fosforo en un rango de 1ppm a 19ppm de derecha a izquierda respectivamente



Figura 13 disoluciones estándar de fosforo en un rango de 1ppm a 19ppm

Como se indicó anteriormente los datos RGB de cada una de las imágenes se extrajeron utilizando la app PhotoMetrix, posteriormente se obtuvo la intensidad de cada canal del espacio RGB.

De manera independiente se prepararon otra serie de estándares de fosforo en el rango de 0.1mg/L a 1.0 mg/L. Aquí también se preparó un blanco analítico. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Tabla 5**.



Tabla 5. datos RGB concentraciones de 0.0 a 1.0ppm

concentración	Datos RGB
0.1	3.6449
0.2	5.7837
0.3	7.9223
0.4	10.061
0.5	12.200
0.6	14.338
0.7	16.370
0.8	18.616
0.9	20.754
1.0	22.786
R ²	0.9969

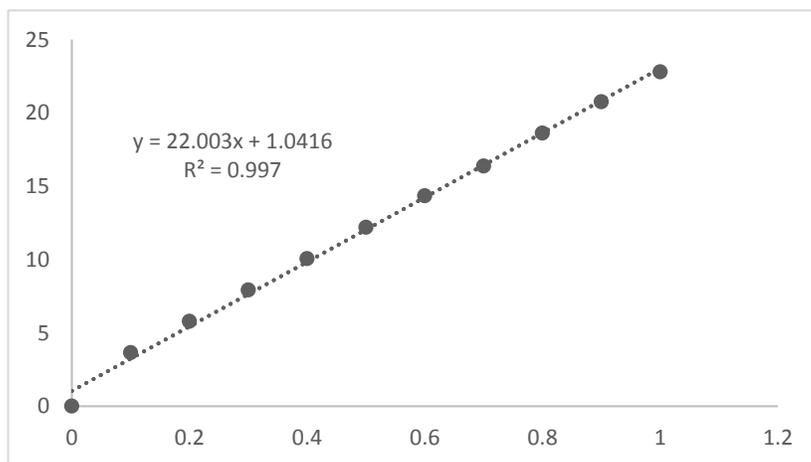


Figura 14 Grafico de datos RGB concentraciones de 0.1 a 1.0ppm

En las siguientes tablas se indican los valores experimentales de concentración e intensidad de datos de canales RGB, R, G y B que corresponden a las curvas de calibración obtenidas en los días 1, 2 y 3 para la concentración de fosfatos en el intervalo de 1.0 a 19.0 ppm.

En las **Tablas 6, 7, 8 y 9** se indican los valores experimentales de los datos RGB, R, G Y B respectivamente y la concentración que corresponden a la curva de calibración obtenida para la concentración de fosfato en el intervalo de 1 a 19 mg/L, con los cuales se realiza el test de linealidad. Como se puede observar en las tablas mencionadas el coeficiente de correlación lineal es significativo (cercano a uno).



Tabla 6. Linealidad del método canal RGB

Concentración / mg/L	Intensidad		
	Día 1	Día 2	Día 3
1	20.9990	21.1367	21.0108
3	33.4866	33.6919	33.6661
5	46.2602	46.9919	47.0197
7	58.6735	57.9981	58.1973
9	69.8978	69.9909	69.3714
11	83.0001	82.9444	82.6987
13	94.0891	93.9958	93.7445
15	106.5253	105.9907	105.9762
17	118.5741	119.3895	119.9933
19	131.2113	131.1994	130.97614
R ²	0.990226	0.990008	0.990082

A continuación, se muestran las curvas de calibración de fosfato (concentración versus intensidad de señal) obtenidas. Donde “Y” se refiere al valor de la intensidad RGB y “X” es la concentración (PO_4^{3-}) expresada en mg/L.

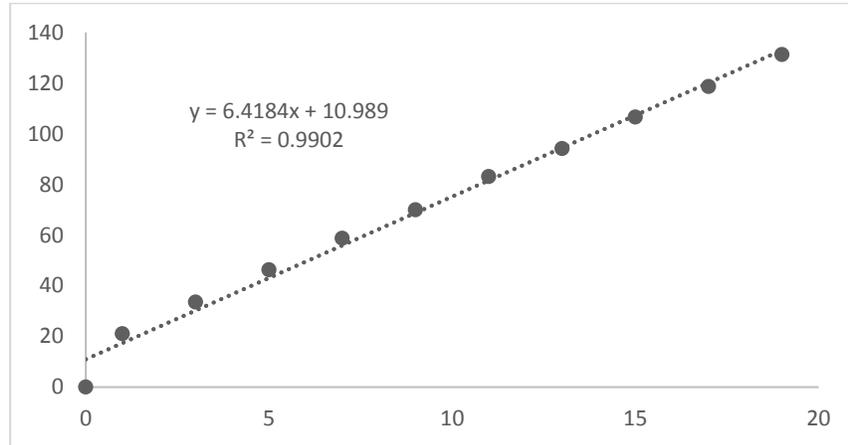


Figura 15 Curva calibrado canal RGB día 1

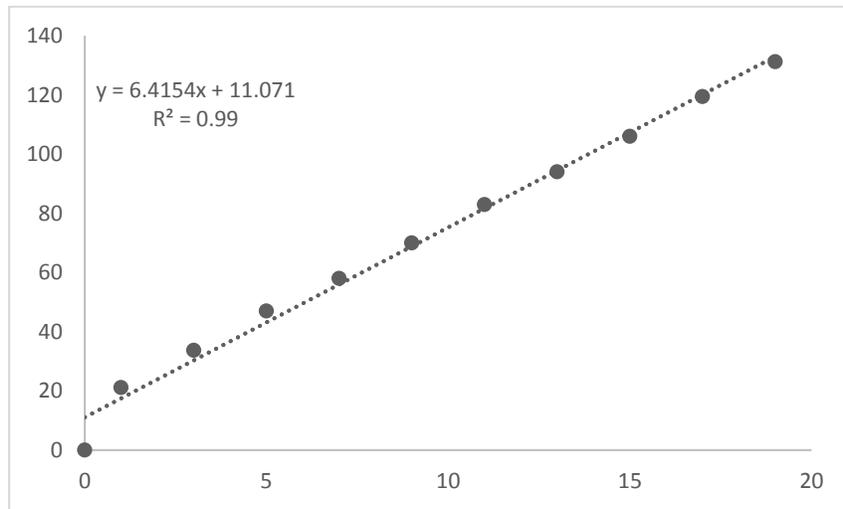


Figura 16 Curva calibrado canal RGB día 2

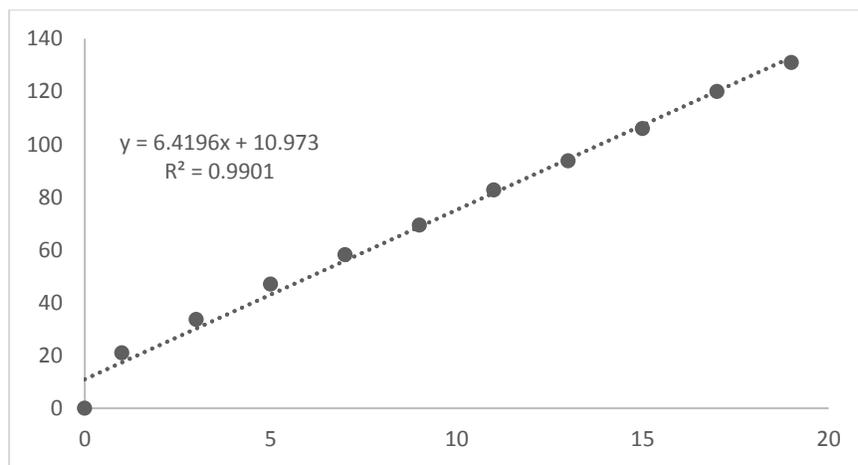


Figura 17 Curva calibrado canal RGB día 3



Tabla 7. Linealidad del método canal R

Concentración / mg/L	Intensidad Canal R		
	Día 1*	Día 2**	Día 3**
1	100.7986	99.0297	99.9121
3	100.9114	99.1892	100.0232
5	101.0241	99.3486	100.2287
7	101.1396	99.5081	100.4321
9	101.2496	99.6675	100.5789
11	101.3426	99.8271	100.7185
13	101.4752	99.8665	100.9984
15	101.5879	100.1459	101.0023
17	101.7007	100.3053	101.1984
19	101.8134	100.3851	101.4543
R ²	0.999648	0.992595	0.992334

**datos extraídos con photometrix. **datos extraídos con imageJ*

Tabla 8. Linealidad del método canal G

Concentración mg/L	Intensidad Canal G		
	Día 1	Día 2	Día 3
0	108.927	110.1388	105.9123
1	109.4251	110.561	107.04001
3	110.4213	110.4057	109.2954
5	111.4175	112.2503	111.5509
7	112.4136	113.0949	113.8063
9	113.4098	113.9396	116.0617
11	114.4060	114.7842	118.3171
13	115.4022	115.6288	120.5726
15	116.3983	116.4735	122.82804
17	117.3945	117.3181	125.0835
19	118.3906	118.1627	127.3389
R ²	1	0.988556	1



Tabla 9. Linealidad del método canal B

Concentración / mg/L	Intensidad Canal B		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
0	120.1668	122.4919	117.6891
1	126.1613	126.6691	123.6169
3	133.1502	135.0233	132.5033
5	141.1391	143.3777	141.1973
7	149.9912	151.7319	149.1397
9	159.1169	160.0861	159.4241
11	167.1058	168.444	166.4558
13	177.0947	176.7947	175.2743
15	183.0837	185.1489	181.1682
17	193.0726	193.5032	190.4679
19	200.0615	201.8575	198.8435
R ²	0.9989327	0.99999	0.998325

Como se puede observar en las **Tablas 7, 8 y 9** los canales Rojo (R), Verde(G) y Azul(B) presentan buena linealidad ($R^2 = 0.999$), sin embargo, a medida que aumentamos la concentración la intensidad en la señal de estos colores se mantiene casi de manera constante, exceptuando el canal azul(B).

De acuerdo con la información obtenida el canal que nos podría ser útil para realizar la determinación de fosforo en aguas por medio del análisis de imagen digital es el canal (RGB), ya que éste presenta un mejor valor del coeficiente de determinación



y muestra una correlación aceptable entre la respuesta (Intensidad) y la concentración de fosfatos.

La linealidad de la curva de calibración normal se evaluó por medio de tres pruebas:

A. Prueba de coeficiente de determinación (R^2), tomando como criterio de aceptación que el coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.990 es aceptable.

B. Test de correlación

Como se puede observar en la **Tabla 6, 7, 8 y 9** y en las **Gráficas 4, 5 y 6** el coeficiente de correlación lineal R es aceptable pues cumple con el criterio de aceptación (Coeficiente de correlación $R \geq 0.990$) así de igual forma el coeficiente de determinación R^2 es aceptable cumpliendo también con su criterio de aceptación (Coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.995$)

Para el test de correlación planteamos dos hipótesis para su evaluación:

Hipótesis nula: $H_0: t_{cal} > t_{(0.05, 10)}$ existe correlación lineal entre las variables.

Hipótesis alternativa: $H_a: t_{cal} < t_{(0.05, 10)}$ no existe correlación lineal entre las variables.

El valor de t_{cal} fue calculado a partir de la ecuación $t_r = r\sqrt{n-2}/\sqrt{1-r^2}$, como valor de t_{cal} obtenido fue de 11.5061 y es mayor que el valor de t de tabla **2.262**, entonces podemos afirmar que existe correlación lineal entre las variables con un nivel de confianza del 95%

Para realizar el Test de covarianza usamos la ecuación: $Cov = \frac{\sum_1^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n}$

tomamos como criterio que el coeficiente de confianza debe ser mayor que cero, ($COV > 0$) como el valor obtenido fue de 0.043 y es mayor que cero, podemos afirmar que existe correlación lineal entre las variables.



11.4.2. Análisis de Precisión del método desarrollado

Para determinar la precisión se evaluó como precisión intermedia se prepararon, a partir de la solución patrón de fosfato de 50,00 mg/L, muestras patrones de concentraciones 2.0 mg/L; 10.0 mg/L y 18.0 mg/L que corresponden con un valor bajo, medio y alto, respectivamente, luego se procede según el método seleccionado para el desarrollo del color. A cada una de ellas se le realiza tres réplicas bajo las mismas condiciones y se determina así la precisión en términos de repetibilidad. Para evaluar la precisión en condiciones de reproducibilidad se prepararon las muestras patrones de 2.0 mg/L; 6.0 mg/L y 18.0 mg/L a partir de la solución patrón de fosfato (50,00 mg/L) y se procedió según el método seleccionado para desarrollar color, se realizaron tres réplicas en tres días diferentes. Con los resultados obtenidos se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV). Los resultados de los estudios se expresan en términos de CV, cuyo criterio de aceptación definido para los métodos espectrofotométricos por las normas es $CV \leq 3$. (NMX-AA-029-SCFI et al., 2001)

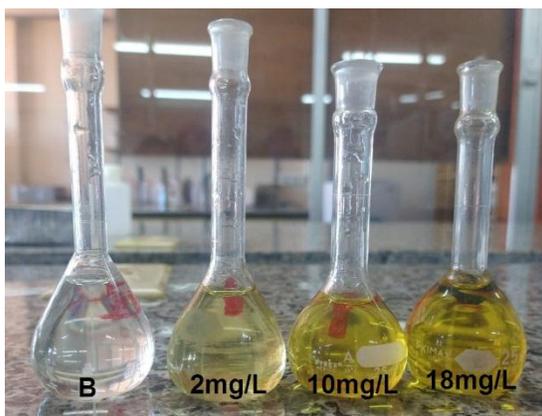


Figura 18 disoluciones estándar de Blanco analítico, 2mg/L, 10mg/L y 18mg/L



Figura 19 disoluciones estándar de Blanco analítico, 2mg/L, 10mg/L y 18mg/L



En las siguientes **Tablas 10, 11, 12 y 13** se muestran los resultados de la precisión del método obtenidos del estudio de la repetitividad para los canales RGB, R, G y B donde, se prepararon muestras patrones de concentraciones 0.0 mg/L, 2.0 mg/L, 10.0 mg/L y 18.0 mg/L y a cada una de ellas se realizaron tres réplicas bajo las mismas condiciones.

Tabla 10. Resultados de la precisión en términos de repetitividad para de PO_4^{3-} en la determinación canal RGB

C (mg/l)	0	2	10	18
día 1	0	24.7682	76.2041	115.0399
día 2	0	24.1989	73.1333	102.1277
día 3	0	23.6529	69.2968	108.9406
media	0	24.2066	72.8781	108.7027
varianza	0	0.31102	11.9765	41.72366
desv est	0	0.55769	3.46071	6.459385
CV	0	0.02304	0.04748	0.059422

Tabla 11. Resultados de la precisión en términos de repetitividad para de PO_4^{3-} en la determinación canal R

C (mg/l)	0	2	10	18
día 1	111.0004	111.0366	111.1814	111.3261
día 2	107.8463	107.6418	106.8241	106.0063
día 3	112.6740	112.6141	112.3748	112.1354
media	110.5069	110.4308	110.1268	109.8226
varianza	6.009328	6.456156	8.536756	11.08685
desv est	2.451393	2.540896	2.921773	3.329692
CV	0.022183	0.023008	0.026531	0.030319



Tabla 12. Resultados de la precisión en términos de repetitividad para de PO_4^{3-} en la determinación canal G

C (mg/l)	0	2	10	18
día 1	112.4498	113.306	116.7313	120.1564
día 2	108.4579	109.2921	112.6286	115.9652
día 3	113.2017	113.9709	117.0479	120.1249
media	111.3698	112.1897	115.4693	118.7488
varianza	6.500709	6.407442	6.077099	5.811709
desv est	2.549649	2.531293	2.465177	2.410749
CV	0.022894	0.022563	0.0213492	0.020301

Tabla 13. Resultados de la precisión en términos de repetitividad para de PO_4^{3-} en la determinación canal B

C (mg/l)	0	2	10	18
día 1	120.7281	126.7594	150.8841	175.009
día 2	113.0306	122.3563	147.3079	172.2596
día 3	121.2243	127.5264	152.7348	177.9432
media	118.3276	125.5473	150.3089	175.0706
varianza	21.10574	7.784252	7.610923	8.078673
desv est	4.594098	2.790027	2.758790	2.842300
CV	0.038825	0.022222	0.018354	0.016235

Como se puede observar en las *tablas* los coeficientes de variación (CV) de la repetitividad del método son inferiores a 0.06 lo cual está muy por debajo del criterio de aceptación adoptado de 3, lo cual está acorde con el criterio de aceptación definido para los métodos espectrofotométricos, por lo que el método es preciso en el intervalo estudiado.



11.4.3. Límite de detección y Cuantificación

Para determinar el límite de detección y de cuantificación del método empleado se realizaron las determinaciones de la regresión lineal y se calculó a partir de todos los datos tomados para la confección de las curvas de calibración que van en rangos de 0.1mg/L a 1.0mg/L y de 1.0mg/L a 19.0mg/L.

El límite de detección del método desarrollado fue calculado a partir de la curva de calibración normal utilizando la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3Sa}{b} \quad \text{Ecuación 01}$$

Para la determinación del límite de cuantificación se utilizó la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10Sa}{b} \quad \text{Ecuación 02}$$

Donde:

LD: es el límite de detección

LC: es el límite de cuantificación

Sa: es la desviación del intercepto de la curva de calibración

b: es la pendiente de la curva de calibración

En la **Tabla 14**, se muestran los resultados obtenidos del intercepto (a), la pendiente (b) y la desviación estándar del intercepto (Sa) de las curvas de calibración normal, donde la “**curva A**” es la curva comprendida en el rango de 0.1mg/L a 1.0 mg/L y la “**curva B**” es la que va de 1.0mg/L a 19 mg/L:

Tabla 14. Resultados obtenidos de la curva de calibración normal

Datos	Resultados de “curva A”	Resultados de “curva B”
a	1.04	18.36
b	22.0	5.040
Sa	1.3795	0.4582



Sustituyendo los valores de la **Tabla 14** en las ecuaciones 01 y 02 para la **curva A**, se obtuvieron los valores de 0.21 mg/L y 0.63 mg/L para el límite de detección y límite de cuantificación y para la **curva B** los valores obtenidos fueron 0.30 mg/L para límite de detección y 0.91 mg/L para límite de cuantificación.

El método desarrollado posee un rango de trabajo de 0.63 a 1.0 mg/L en la curva A y de 0.91 a 19.0 mg/L en la curva B.

11.5. Aplicación del método y comparación con el método espectrofotométrico.

Con el objetivo de llevar a cabo la aplicación del método se realizó la toma de muestras de aguas superficiales, el tipo de muestreo fue por conveniencia. Todas las muestras fueron tomadas en el río Tamarindo y de manera inmediata transportadas en condiciones especificadas por el método de Referencia Colorimétrico del ácido Vanadomolibdofosfórico (APHA et al., 2017) al laboratorio de métodos instrumentales de análisis del departamento de química de la UNAN-León en donde fueron analizadas rápidamente el mismo día de la toma de muestra.

En total se tomaron 4 muestras de diferentes sitios en el recorrido del río los cuales se pueden observar en las siguientes imágenes.

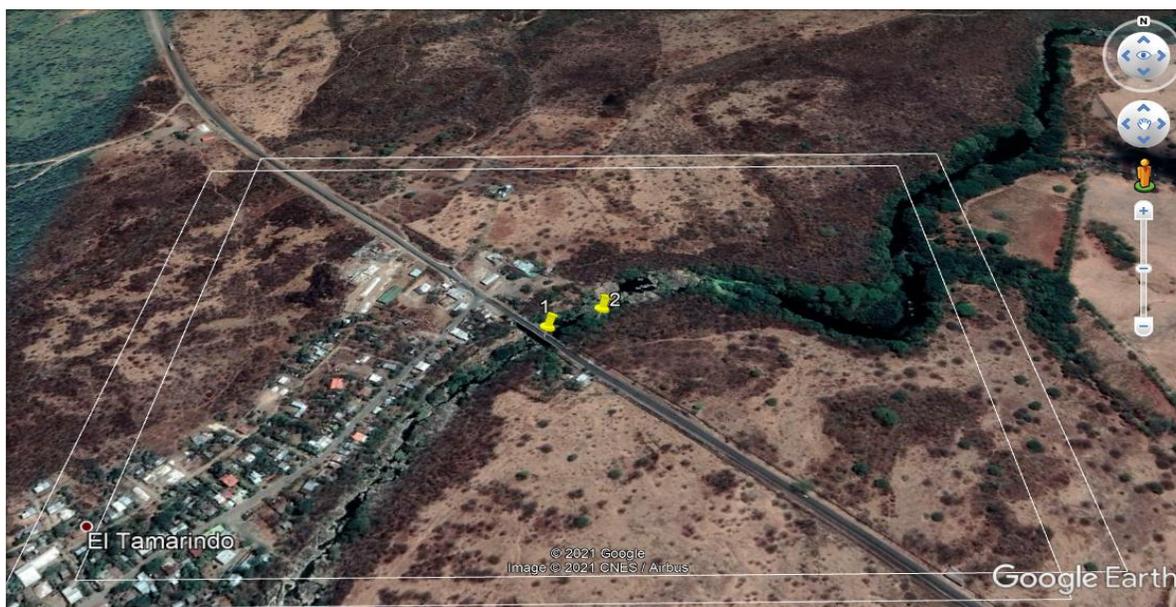


Figura 20 Zona 1 de muestreo

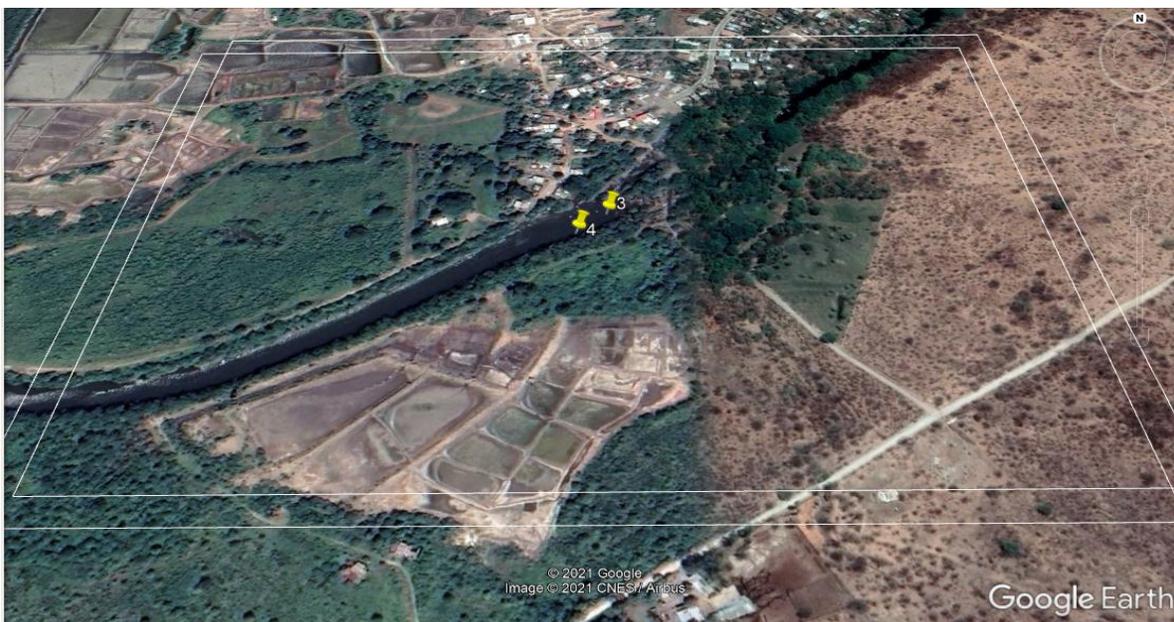


Figura 21 Zona 2 de muestreo

Tanto las coordenadas como los códigos de las muestras se muestran en la **tabla 15**:

Tabla 15. Coordenadas y códigos de muestra

N°	Coordenadas	Código
1	12°14'34"N, 86°42'57"W	001-P
2	12°14'35"N, 86°42'55"W	002-N
3	12°14'04"N, 86°43'21"W	003-C
4	12°14'03"N, 86°43'22"W	004-S

A los datos de la curva de calibración normal que se muestran en la **Tabla 16** se le calcularon los parámetros de regresión del modelo lineal, observándose que el coeficiente de determinación tiene un valor de 0.99, el cual es un criterio de aceptación ($r^2 > 0.99$) por lo cual podemos decir que el método normalizado presenta



buena linealidad en el rango de concentración de 0 mg/L a 9.0 mg/L y el método desarrollado presenta una linealidad en el rango de concentración de 0 mg/L a 19.0 mg/L, en nuestras condiciones de trabajo.

Tabla 16. Concentración de fosforo vs RGB

Conc. mg/L	RGB
0	0
1	21.092083
3	33.102584
5	46.113085
7	58.123586
9	70.134087
11	82.144588
13	94.155089
15	106.16559
17	118.17609
19	130.18659
R	0.990200095
R ²	0.995087984

A continuación, se muestra la gráfica , donde Y se refiere al valor de los datos RGB y X sería la concentración PO_4^{3-} expresada en mg/L.

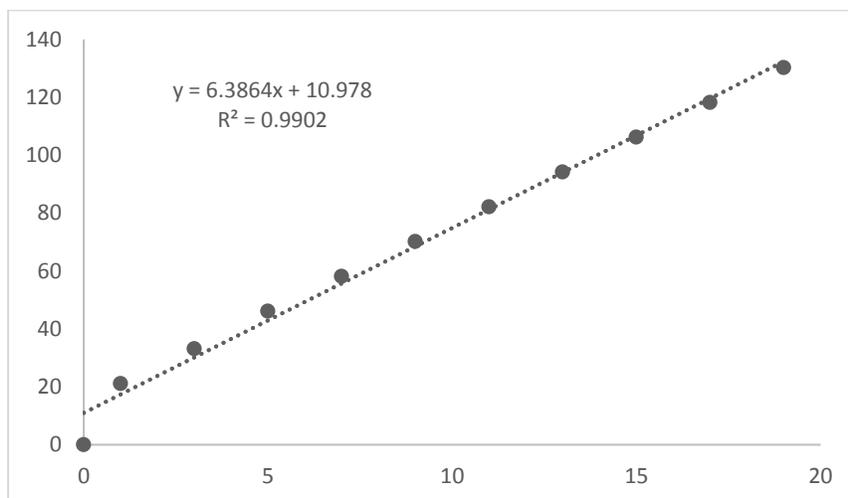


Figura 22 Curva de calibración para el PO_4^{3-} obtenida por el método desarrollado

Por medio del método colorimétrico del ácido Vanadomolibdofosfórico (APHA et al., 2017) el cual utiliza la técnica espectrofotométrica pudimos determinar la concentración de fósforo en las muestras de agua.

Con la finalidad de evaluar la confiabilidad de los resultados de las concentraciones obtenidas con el método desarrollado (Basado en el análisis de imagen digital), se compararon con los resultados de concentración obtenidos por medio del método normalizado del ácido Vanadomolibdofosfórico (APHA et al., 2017). La comparación de los resultados se realizó por medio de un test de comparación de medias de las muestras que fueron detectables por ambos métodos (**Tabla 17**).

Comparación de resultados de ambos métodos:

Tabla 17 Comparación de resultados de ambos métodos

Réplicas	Método Normalizado muestras (mg/L)				método desarrollado Muestras (mg/L)			
	001-P	002-N	003-C	004-S	001-P	002-N	003-C	004-S
1	27.26	38.35	37.55	11.36	26.96	38.33	37.62	11.16
2	28.98	29.51	38.04	12.35	27.54	29.54	37.99	12.15
Promedio	28.12	33.93	37.795	11.855	27.25	33.935	37.805	11.655
varianza	1.4792	39.0728	0.12005	0.49005	1.1682	38.6321	0.06845	0.49005



Primeramente, se realizó la comparación de las varianzas de los resultados obtenidos por los dos métodos, para ello se aplicó la prueba de F de Fisher, nos planteamos la siguiente hipótesis.

Ho: las varianzas de las concentraciones de fosfatos encontrados en ambos métodos no presentan diferencias significativas.

Ha: Las varianzas de las concentraciones de fosfatos encontradas en ambos métodos presentan diferencia significativa.

El criterio de aceptación es $F_{cal} < F_{tab}(0.05, n_2-1, n_1-1)$ se admite la Ho, en caso contrario se acepta Ha. El valor de F se calcula con la ecuación $F = S_2^2/S_1^2$, el valor de F_{tab} es 00, los valores de F_{cal} se muestran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Valores de F_{Cal} y F_{Tab}

Muestras	F_{Cal}	F_{Tab}
001	8.794	19.00
002	1.011	19.00
003	1.754	19.00
004	1.000	19.00

Criterio de aceptación $F_{Cal} < F_{Tab}$

Como se detalla en la **Tabla 18**, todos los valores de F_{cal} son menor que el valor de F_{tab} por lo tanto se acepta la hipótesis nula, es decir que las varianzas de las concentraciones de fosfatos encontradas en ambos métodos no presentan diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%.



Tras haber realizado la prueba de fisher se procedió a aplicar el test de student, tomando en cuenta que las varianzas son iguales. Para esta prueba nos planteamos las siguientes hipótesis:

- Ho: las medias no difieren significativamente.
- Ha: las medias difieren significativamente.

El criterio de aceptación es que si $t_{cal} < t_{tab}$ (0.05, $n_1 + n_2 - 2$) se acepta la Ho, en caso contrario se acepta Ha.

En esta ocasión es necesario calcular una varianza promedio para lo cual utilizamos la **Ecuación 03 y 04**

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Ecuación 03}$$

Seguidamente calculamos el valor de t por medio de la **Ecuación**. El valor de $t_{tab} = 2.776$.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S^2 \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 04}$$



Los resultados obtenidos se encuentran en la **Tabla 19**

Tabla 19. Comparación de medias

Muestras	S ²	T _{cal}	T _{tab}
001	0.81317280	1.364403514	2.776
002	6.23314628	-0.00283225	2.776
003	0.30405592	-0.0256471	2.776
004	0.70003571	0.338053078	2.776

Criterio de aceptación: $T_{cal} < T_{tab}$

Debido a que todos los valores de t_{cal} son menores que el valor de t_{tab} , aceptamos la H_0 , es decir no existe diferencia significativa entre las medias de los resultados de ambos métodos, a un nivel de confianza del 95%.

Por las razones antes expuestas podemos concluir que el método desarrollado basado en el análisis de imagen digital para la determinación de fosfatos en aguas proporciona resultados confiables y comparables a los obtenidos por el método normalizado 4500-P método del ácido Vanadomolibdofosfórico (APHA et al., 2017). El uso de un Smartphone con la app photometrix como equipo de medición permite obtener resultados comparables a los obtenidos por un espectrofotómetro moderno.

11.6. Costo analítico.

Para evidenciar que el método desarrollado presenta la ventaja del bajo costo analítico, se comparó desde el punto de vista económico con el método normalizado 4500-P método del ácido Vanadomolibdofosfórico (APHA et al., 2017), el cual, por utilizar un espectrofotómetro como instrumento de medición del fosfato resulta costoso.



Como se mencionó antes, el método desarrollado basado en el análisis de imagen digital, utiliza un sistema de adquisición de imagen digital usando un Smartphone con la app PhotoMetrix, por otro lado, el método normalizado utiliza un espectrofotómetro para la determinación de fosfatos, en nuestro caso utilizamos el espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis.

En la **Tabla 20** se muestra una comparación de los costos del sistema de adquisición de imagen digital y del equipo espectrofotométrico.

Tabla 20. Comparación de costos de sistema de adquisición de imagen digital versus método normalizado

Método desarrollado		Método Normalizado	
Descripción	Precio (US \$)	Descripción	Precio (US \$)
Smartphone Moto G8	182.89	Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV- Vis	5870.93
Trípode	5.67		
Sub total	188.56	Sub total	5870.93

En cuanto a los reactivos, ambos métodos utilizan los mismos reactivos, los costos de cada frasco de reactivos utilizados en el método normalizado y desarrollado se muestran en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Costo de soluciones utilizadas por ambos métodos

Cantidad	Descripción	Precio US \$
0.1142 L	HCl	7.81
8.28 gr	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.88
0.2195 gr	KH_2PO_4	0.06
0.43 gr	NH_4VO_3	0.89
Sub total		14.63



Para estimar de una forma más exacta se calculó el costo analítico requerido por análisis por cada método. Para ello iniciamos calculando la depreciación por día de los instrumentos de determinación de fosfatos (Smartphone y espectrofotómetro) utilizando la **Ecuación 05**. Para la vida útil de cada instrumento se tomó un valor de 5 años.

$$depreciacion = \frac{\text{costo del instrumento US \$}}{\text{vida util (años)} \times 365 \text{ dias}} \quad \text{Ecuación 05}$$

El costo analítico para determinar fosfatos en agua, empleando el método desarrollado, incluyendo la depreciación del equipo y los precios de los reactivos utilizados para la construcción de la curva de calibración normal con 6 niveles se detalla en la **Tabla 22**

Tabla 22. Depreciación de Smartphone por uso de app PhotoMetrix

Descripción	Costo/ US \$
Depreciación de Smartphone	0.01
Curva de calibración normal	0.01
Análisis de la muestra	0.01
Costo analítico	0.03

El costo del análisis para determinar fosfatos en agua, empleando el método normalizado se detalla en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Depreciación de Espectrofotómetro

Descripción	Costo/ US \$
Depreciación del espectrofotómetro	3.22
Curva de calibración normal	0.071
Análisis de la muestra	0.013
Costo analítico	3.30



Como se puede ver hay una diferencia muy notable en cuanto a la depreciación por día de los equipos o instrumentos de medición lo cual es debido a la gran diferencia en los precios de estos equipos. El método desarrollado posee la ventaja de su bajo costo analítico sobre el método normalizado.



12. Conclusiones

Las condiciones de trabajo utilizadas para en la determinación de fosfatos en aguas por el método desarrollado son con las cuales se obtuvieron resultados satisfactorios que fueron optimizados con la ayuda del software Minitab® teniendo como valores óptimos de las variables tiempo de reacción (10 minutos) y cantidad del reactivo vanadomolibdofosforico (5 ml) además, logrando un buen desarrollo de trabajo a temperatura ambiente y garantizando una buena iluminación.

La linealidad se evaluó por medio de 2 curvas de calibración:

- (a) Rango de concentración de 0.1 mg/L a 1.0 mg/L, obteniéndose límites de detección y cuantificación de: 0.21 mg/L y 0.63 mg/L, respectivamente.
- (b) Rango de concentración de 1.0 mg/L a 19 mg/L, obteniéndose límites de detección y cuantificación de: 0.30 mg/L y 0.91 mg/L, respectivamente.

De acuerdo con los resultados de los parámetros de validación evaluados, el método desarrollado es apto para la determinación de fosfatos en muestras de agua en el rango de medición: 0.63 mg/L a 1.0 mg/L y de 0.91 mg/L a 19.0 mg/L. lo cual nos permite que el método tenga aplicación tanto para aguas naturales como para aguas residuales.

El método desarrollado presentó buena precisión, evaluada como repetibilidad, para lo cual se obtuvieron valores de CV% inferiores de 0.06, los cuales están muy por debajo del criterio de aceptación adoptado de 3.

El método normalizado es un método exacto para el análisis, pero este conlleva un costo analítico mayor en comparación con el método desarrollado ya que se requiere de un espectrofotómetro. La utilización de un Smartphone con la app PhotoMetrix para el análisis de fosfatos resultó satisfactorio, ya que fue posible determinar la cantidad de fosfatos con poca diferencia con el método normalizado (APA AWWA 2017), resultando ser una herramienta rápida y accesible.



De acuerdo con los resultados obtenidos durante la ejecución del presente trabajo monográfico se ha demostrado que el método desarrollado permite realizar la determinación de fosfatos en aguas de forma económica, sencilla y rápida, puesto que cumple con todos los parámetros de validación estudiados, garantizando obtener resultados confiables, por lo cual podemos afirmar que es apto para la cuantificación del ion fosfato en muestras de aguas.

Los análisis basados en el espectro de luz se han explorado durante mucho tiempo, pero el uso de teléfonos inteligentes con detectores es muy reciente, especialmente si se compara con el uso del espectrofotómetro, por ejemplo los teléfonos inteligentes son cada vez más explorados como herramientas analíticas, y en este sentido, este trabajo mostró diferentes formas de explorar este campo, y destacó la relevancia de desarrollar herramientas que permitan no solo la adquisición de datos sino también procesar y generar el resultado en el propio dispositivo. De acuerdo a lo aquí presentado, está claro que la aplicación PhotoMetrix encaja muy bien en esos aspectos.



13. Recomendaciones

Teniendo en consideración los resultados que se obtuvieron en el desarrollo del presente trabajo monográfico, así como las conclusiones de este trabajo, pueden considerar las siguientes recomendaciones.

- Aplicar el método desarrollado para de determinación de Fosfatos en otros tipos de matrices.
- Dar seguimiento al presente estudio, realizando nuevos análisis para evaluar el comportamiento de la concentración de fosfatos en lo puntos muestreados.



14. Bibliografía

- Acemel, A. (2014). *Aplicación Android en dispositivos móviles para la determinación de sulfuro de hidrógeno en medios acuosos*. 72. <https://doi.org/10.2478/s11814-009-0200-0>.
- APHA, AWWA, & WEF. (2017). 3120 B. Inductively Coupled Plasma (ICP) Method. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association*, 1–5.
- Baird, R., Eaton, A. D., Rice, E. W., Bridgewater, L., American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Vol. 23rd).
- Barreiros, J., & Magne, N. (2015). *Diseño E Implementacion De Un Sistema Controlable De Imagen Ndvi Adaptable Auna Plataforma Aérea Remota*.
- Castillo, B., & González, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1), 0–0. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- de Heredia Alonso, J. B., Torregrosa Antón, J., González Montero, T., & Domínguez Vargas, J. R. (2004). *Análisis químico de aguas residuales* (F. Hermoso Ruiz (ed.); 1ra ed.). Universidad de Extremadura (I.C.E.); Editorial @becedario.
- Eurachem. (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A laboratory guide to method validation and related topics. In B. Magnusson & U. Ornemark (Eds.), *Eurachem Guide, ISBN: 0-94948926-12-0* (2nd ed., p. 70). <https://doi.org/978-91-87461-59-0>
- Firdaus, M. L., Alwi, W., Trinoveldi, F., Rahayu, I., Rahmidar, L., & Warsito, K. (2014). Determination of Chromium and Iron Using Digital Image-based Colorimetry. *Procedia Environmental Sciences*, 20, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2014.03.037>
- Gomez, I. J., Arnaiz, B., Cacioppo, M., Arcudi, F., & Prato, M. (2018). Nitrogen-doped Carbon Nanodots for bioimaging and delivery of paclitaxel. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(35). <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>
- Helfer, G. A., Magnus, V. S., Böck, F. C., Teichmann, A., Ferrão, M. F., & Da Costa, A. B. (2017). PhotoMetrix: An application for univariate calibration and principal components analysis using colorimetry on mobile devices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(2), 328–335. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160182>
- ISO/IEC. (2017). *NTN ISO/IEC 17025. Norma tecnica nicaraguense, Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración* (p. 44).
- Miller, J. C., Miller, J. N., Hornillos, R. I., & Jimenez, C. M. (1993). Estadística para química analítica.
- Munoz, A., & Rivas-mendoza, A. (2008). *Prueba Colorimétrica de Absorción Usando Imágenes Digitales*. November.
- NMX-AA-029-SCFI, Clave O, Norma, T. D. E. L. A., Fosforo, A. D. E. A. D. E., En,

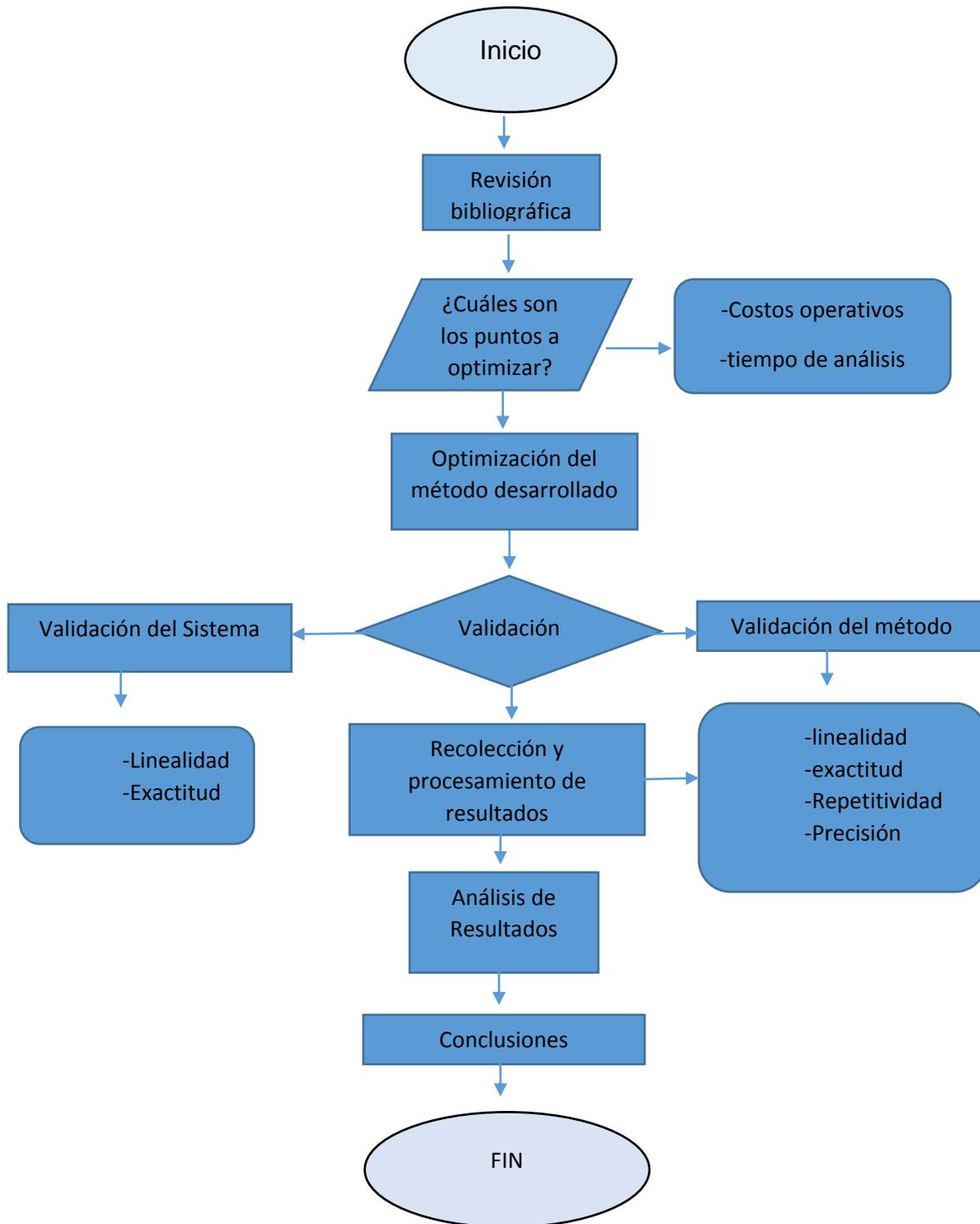


- T., & Prueba, R. Y. R. T. D. E. (2001). *NMX-AA-029-SCFI-2001-Fósforo*. <http://www.economia.gob.mx/normas>.
- Nogueira, S. A., Sousa, L. R., Silva, N. K. L., Rodrigues, P. H. F., & Coltro, W. K. T. (2017). Monitoring acid-base titrations on wax printed paper microzones using a smartphone. *Micromachines*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/mi8050139>
- Nollet, L. m. L., & De Gelder, L. S. P. (2014). *Handbook of Water Analysis* (3rd ed.). Tylor & Francis Group.
- Orozco, F. (2018). *Desarrollo de un método colorimétrico basado en el análisis de imagen digital para la determinación de nitritos en aguas*. UNAN-Leon.
- Pasar, H. (2019). *ImageJ* (p. 94). <https://imagej.net/>
- Peterson, K. A. (2005). *Introduction to Basic Measures of a Digital Image for Pictorial Collections* (Issue June, pp. 1–8). Prints & Photographs Division, Library of Congress.
- Severiche-Sierra., C. A., Luna-Jara, J. Y., & Gonzalez García, H. (2013). Evaluación analítica para la determinación de fósforo total en aguas por el método del ácido ascórbico. *Ingenium*, 7(17), 37. <https://doi.org/10.21774/ing.v7i17.316>
- Warwick, C., Guerreiro, A., & Soares, A. (2013). Sensing and analysis of soluble phosphates in environmental samples: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 41(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.012>



15. Anexos

15.1. Diagrama de flujo de proceso de trabajo





15.2. Tablas.

15.2.1. Tabla de constantes físicas y química Tabla consultada para la preparación de soluciones.

Tabla 24. Constantes físicas y químicas

Reactivo	Peso molecular en g/mol	Densidad (g/cm ³)	Pto Fusión (°C)	Pto Ebullición (°C)	Solubilidad	NFPA
HCl	36.46	1.12	-26	48	Miscible en H ₂ O	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1235.71	2.34	90	190	En agua: 226 g/100ml (20°C)	
KH ₂ PO ₄	136.01	2.34	253	400	En agua a 0°C 22 g / 100mL	
NH ₄ VO ₃	116.98	2.33	200	-	Poco soluble en agua. La sustancia se hunde en agua	
H ₂ O	18	0.99	0	100	Solvente	



15.3. Imágenes



Figura 23 Placa de porcelana



Figura 24 Smartphone



Figura 25 espectrofotómetro genesys 10s uv-vis



Figura 26 Trípode para Smartphone