

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-León



**FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO DISPONIBLE EN
MUESTRAS DE SUELO”**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OPTAR
AL TÍTULO DE MAESTRÍA EN ANÁLISIS QUÍMICO
Y GESTIÓN DE LA CALIDAD**

PRESENTADA POR: Lic. CLAUDIA ELENA ALVARADO DELGADILLO

**CATEDRÁTICO GUÍA: MSc. FABIO JOSÉ PALLAVICCINI NARVÁEZ
MSc. ANNABELL MARTINEZ VADO**

LEÓN, NICARAGUA, MARZO DEL 2010



INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. OBJETIVOS.....	3
III.1 Objetivo General.....	3
III.2 Objetivos Específicos.....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
IV.1 Generalidades del fósforo.....	4
IV.1.1. El fósforo y la tabla periódica.....	4
IV.1.2. Propiedades físicas y químicas del fósforo.....	4
IV.1.3. Origen del fósforo.....	5
IV.1.4. Uso agrícola del análisis de fósforo asimilable y fósforo absorbido.....	7
IV.1.5. Disponibilidad del fósforo orgánico y nutrición de cultivo.....	7
IV.1.6. Fósforo total en el suelo.....	7
IV.1.7. Ciclo del fósforo.....	9
IV.1.8. Importancia del fósforo en el suelo.....	10
IV.1.9. Dinámica del fósforo en el suelo.....	12
IV.1.10. Ciclo geoquímica del fósforo.....	12
IV.2. Principales métodos recomendados para el análisis de fósforo en suelo.....	13
IV.2.1. Principios de los métodos analíticos.....	14
IV.2.1.1. Fusión de carbonato de sodio, método e truog y Meyer.....	14
IV.2.1.2. Método de azul de molibdeno de Fiske y Subbarow.....	15
IV.2.1.3. Método de amarillo de vanadato – molibdato.....	15
IV.2.1.4. Método de azul de molibdeno de Dickman y Bray.....	16
IV.2.1.5. Método de Bray I.....	16
IV.2.1.6. Método de Bray II.....	16
IV.2.1.7. Método de Hunter (Olsen Modificado).....	17
IV.2.1.8. Método de Troug.....	17
IV.3. Fundamentos de la espectrofotometría UV-Visible.....	18
IV.3.1. Pincipio de la espectrofotometría.....	18
IV.3.2. Aplicaciones.....	20



IV.3.3. Ley de Lambert – Beer.....	21
IV.4. Validación de métodos analíticos.....	23
IV.4.1. Jerarquía de la metodología.....	24
IV.4.2. Proceso de validación.....	26
IV.4.3. Validación general.....	26
IV.4.4. Validación para uso específico.....	28
IV.4.5. Proceso general por la metodología.....	28
IV.4.6. El método de adición patrón.....	30
IV.4.6.1. Adición patrón.....	30
IV.4.7. Criterios de eficiencia.....	31
IV.4.7.1. Precisión.....	31
IV.4.7.2. Exactitud o Bias (sesgo).....	31
IV.4.7.3. Límite de detección.....	31
IV.4.7.4. Límite de cuantificación.....	33
IV.4.7.5. Linealidad.....	33
IV.4.7.6. Rango.....	33
IV.4.7.7. Selectividad.....	33
IV.4.7.9. Sensibilidad.....	34
IV.5. Aproximación ISO para el cálculo de la incertidumbre.....	34
V. PARTE EXPERIMENTAL.....	36
V.1. Equipos y materiales.....	36
V.2. Reactivos.....	37
V.3. Procedimientos.....	37
V.3.1. Preparación de soluciones.....	37
V.3.2. Estudio de los parámetros de validación.....	38
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
VI.1. Estudio de la linealidad de la curva de calibración normal.....	41
VI.2. Repetibilidad del método.....	43
VI.3. Precisión del método.....	45
VI.4. Exactitud del método.....	46
VI.5. Límite de detección y límite de cuantificación.....	48



VI.6. Repetibilidad de la curva de calibración normal.....	50
VI.7. Aplicación del método y estimación de la incertidumbre asociada a la cuantificación de fósforo en muestras de suelo.....	52
VII. CONCLUSIONES.....	58
VIII. RECOMENDACIONES.....	59
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	60
X. ANEXOS.....	63
X.1. matriz de datos y cálculos para estimar la incertidumbre en la cuantificación de fósforo en muestras de suelo.....	63
X.2. Flujoograma del procedimiento analítico.....	64
X.3. Deducción de la ecuación para estimar la incertidumbre asociada a la determinación de fósforo en muestras de suelo.....	65



I. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Agua del departamento de Química de la Facultad de Ciencias. Con el propósito de optimizar los métodos analíticos del laboratorio y que proporcionen resultados fiables y adecuados para su finalidad o diseño perseguido ya que muchas de las decisiones están basadas en la información que estos resultados proporcionan para asegurar la calidad de los mismos y brindar un mejor servicio al cliente.

Con el propósito de realizar la validación de esta metodología primeramente se evaluaron los parámetros de validación como: Linealidad del método para los cuales se obtuvieron valores del coeficiente de determinación cercanos a la unidad $r^2 = 0.999$, Precisión del método obteniéndose valores de $\%RSD < 1\%$ es decir tiene muy buena precisión. La exactitud del método se evaluó por medio del porcentaje de recuperación ($\%R$), el cual fue de 100.9 para la determinación de fósforo en muestras de suelo, es decir el método es exacto, luego se determinaron el límite de detección obteniéndose valores de 0.389 mg de fósforo / 100 g de suelo y 1.197 mg de fósforo / 100 g del límite de cuantificación, para la determinación de fósforo en muestras de suelo, seguidamente se evaluó la repetibilidad de calidad de la curva de calibración normal.

Posteriormente se estimó la incertidumbre asociada a la cuantificación de fósforo en muestras de suelo, y finalmente se realizó la aplicación del método.



II. INTRODUCCIÓN

El fósforo es un elemento esencial para la vida. Las plantas lo necesitan para crecer y desarrollar su potencial genético. El fósforo no es abundante en el suelo. La disponibilidad de este elemento depende del tipo de suelo, una pequeña o gran parte del fósforo total puede estar “fijado” (no disponible) en los minerales del suelo. Esto significa que la planta no puede absorberlo. En la naturaleza, el fósforo forma parte de las rocas y los minerales del suelo. Las fuentes de fósforo como nutriente para las plantas son los fertilizantes minerales y los fertilizantes orgánicos.^[1]

El Fósforo es importante en procesos metabólicos de respiración y fotosíntesis, almacenamiento y transferencia de energía, división y crecimiento celular. En el suelo es fijado por compuestos de Al, Fe y Mn en suelos ácidos y Ca en suelos alcalinos lo cual afecta su biodisponibilidad para la producción vegetal.^[2]

El fósforo es muchas veces uno de los factores limitantes principales en el crecimiento y rendimientos de cultivos^[3]. Como se puede observar el fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas por lo que resulta de suma importancia la evaluación de los parámetros que definen el buen desempeño del método para asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

Pese a la gran importancia que tiene el contenido de fósforo en los suelos, no se encuentran antecedentes de estudios de este tipo.

En el presente trabajo se llevo a cabo la validación del método espectrofotométrico utilizado en el Laboratorio de Suelo de la UNAN-León para la determinación de fósforo disponible en suelo.



III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo General

- ◆ Validar el método Espectrofotométrico para la determinación de fósforo disponible en muestras de suelo.

III.2. Objetivos Específicos

- ◆ Evaluar la linealidad del método Espectrofotométrico.
- ◆ Realizar un estudio de la precisión del sistema Espectrofotométrico.
- ◆ Evaluar la exactitud del método.
- ◆ Determinar el límite de detección y el límite de cuantificación.
- ◆ Evaluar la repetibilidad de calidad de la curva de calibración normal.
- ◆ Aplicar el método y estimar la incertidumbre asociada a la cuantificación.



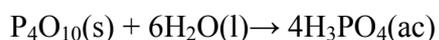
IV. MARCO TEÓRICO

IV.1. Generalidades del Fósforo

IV.1.1. El Fósforo y la tabla periódica.

Los elementos representativos (llamados también elementos del grupo principal) son los elementos 1A a 7A, todos los cuales tienen incompletos los subniveles S ó P del máximo número cuantitativo principal. El fósforo se encuentra ubicado en el grupo 5A y en el tercer periodo en la tabla periódica. Para los elementos representativos, la carga nuclear efectiva aumenta de izquierda a derecha a lo largo de un periodo y de abajo hacia arriba en un grupo. ^[1]

El fósforo existe como moléculas de P₄. Forma dos óxidos sólidos de fórmulas de P₄O₆ y P₄O₁₀. Los oxiácidos importantes, HNO₃ y H₃PO₄, se forman cuando los siguientes óxidos reaccionan con agua ^[1]:



IV. 1.2. Propiedades Físicas y Químicas del Fósforo

El fósforo fue descubierto en 1669 por el alquimista Hennig Brand de Hamburgo, el primer hombre conocido que descubre un elemento. Buscando la piedra filosofal BRAND destiló una mezcla de arena y orina evaporada, y obtuvo un cuerpo que tenía la propiedad de lucir en la oscuridad. Se le llamó «fósforo de Brand», para distinguirlo de otros materiales luminosos denominados también fósforo. ^[2]

En condiciones normales el fósforo se presenta en estado sólido y ofrece tres formas alotrópicas, que son la blanca, la roja (o violeta) y la negra.

El fósforo es un elemento químico que pertenece a los no metales, cuyo símbolo es la letra “P”.



IV.1.3. Origen del Fósforo

El Fósforo, se encuentra en forma natural en las rocas y en el suelo terrestre, y es liberado al suelo por acción de la erosión.

En la naturaleza la disponibilidad de fósforo se produce por la descomposición de rocas, que contienen fosfatos, y mediante la erosión natural llegan a los suelos y a las aguas (ríos, lagos y mares). En las zonas de erupciones volcánicas, pasadas o presentes, los compuestos de fósforo son depositados por las cenizas. Por esta razón los suelos de origen volcánico son ricos en compuestos de fósforo.

El Fósforo es introducido en el ciclo como ión fosfato (PO_4^{-3}). Los fosfatos son lavados durante la meteorización de la roca madre, quedando entonces a disposición de las plantas, o bien son extraídos de las explotaciones mineras. Muchos fosfatos son poco solubles y se ven extraídos del ciclo por sedimentación.

Las mayores reservas de fósforo del mundo se encuentran en la roca denominada fosforita. A medida que esta roca se descompone por medio del ciclo hidrogeológico, se lavan grandes cantidades de fosfato a las aguas costeras, mientras que una parte se queda en el suelo.

La mayor reserva de fósforo está en la corteza terrestre y en los depósitos de rocas marina.

El fósforo es un componente esencial de los vegetales, cuya riqueza media en P_2O_5 es del orden del 0,5 al 1 % de la materia seca. Se encuentra, en parte, en estado mineral, pero principalmente formando complejos orgánicos fosforados con lípidos, proteínas y glúcidos, como la lecitina, las nucleoproteínas (componentes del núcleo celular) y la fitina (órganos de reproducción).

El fósforo interviene activamente en la mayor parte de las reacciones bioquímicas complejas de la planta que son la base de la vida: respiración, síntesis y descomposición de glúcidos. [2]

El papel fundamental del fósforo en las transferencias de energía ha sido bien comprobado. Los iones fosfóricos son capaces de recibir energía luminosa captada por la clorofila y



transportarla a través de la planta. También tiene una gran importancia en el metabolismo de diversas sustancias bioquímicas.

El ácido fosfórico es uno de los elementos fertilizantes más importantes para el agricultor. Como el nitrógeno, el ácido fosfórico es un factor de crecimiento muy importante, debiendo señalarse la fuerte interacción que existe entre este elemento y el nitrógeno, sobre todo durante la primera fase del crecimiento. El desarrollo radicular, en particular, se ve favorecido por una buena alimentación de fósforo al principio del ciclo vegetativo (interesa localizar una pequeña cantidad de P_2O_5 , con la semilla, especialmente en suelos pobres).

El ácido fosfórico es un factor de precocidad, ya que activa el desarrollo inicial y tiende a acortar el ciclo vegetativo, favoreciendo la maduración. Resulta, pues, importante para los cultivos tempranos y los que se hallan en el límite septentrional de su área geográfica (maíz). Aumenta la resistencia de la planta al frío y a las enfermedades, al igual que la potasa.

En términos generales, puede decirse que es un elemento regulador de la vegetación y, por tanto, un factor de calidad. Favorece precisamente los periodos de vegetación que son críticos para el rendimiento del cultivo: fecundación, maduración y movimiento de las reservas.

Una alimentación insuficiente en fósforo se manifestará en el análisis de la planta por un contenido menor de fósforo en los órganos verdes y en el grano. Para el agricultor supondrá un retraso del crecimiento, fecundación defectuosa, movimiento anormal de las reservas y retraso de la maduración, lo que determina en conjunto una reducción más o menos pronunciada de la cosecha y menor calidad de la misma.

Las carencias de P_2O_5 se ponen de manifiesto por un follaje de color verde oscuro, casi azulado, y por el amarillamiento y secado de la punta de las hojas. Estas presentan una ondulación característica, mostrando, a veces, manchas púrpuras. ^[3]

El fósforo es un elemento muy reactivo, no se encuentra libre en la naturaleza, se oxida con el aire, emitiendo luz (fenómeno llamado fosforescencia) y formando pentóxido de fósforo. En estado puro es incoloro y es insoluble en agua por lo que se almacena en él. Existen varias formas alotrópicas, siendo las más usuales el fósforo blanco y el rojo (cerillas).



El negro presenta una estructura similar al grafito y es conductor de la electricidad. El fósforo es empleado en la agricultura como fertilizantes, es un no metal, semiconductor pero no se emplea como tal. ^[4]

IV.1.4. Uso agrícola del análisis de fósforo asimilable y fósforo absorbido

El ciclo del fósforo (P) en el suelo es un sistema dinámico y complejo que involucra la acumulación del elemento en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas. El P en el suelo puede ser particionado en compartimentos que varían en su disponibilidad para las plantas y microorganismos. Una fracción pequeña se encuentra en forma soluble, la cual está en equilibrio con la fracción lábil que comprende el P orgánico fácilmente mineralizable y los fosfatos débilmente adsorbidos a las arcillas coloidales. La mayor parte está en formas insolubles o fijadas, principalmente como minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de Ca, Fe y Al, y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados. ^[5]

IV.1.5. Disponibilidad del fósforo orgánico y nutrición de cultivos

Estimar la cantidad de P orgánico que se hace disponible mediante la mineralización puede ser importante en suelos con bajo niveles de P nativo, en suelos ácidos que presentan una actividad alta de Fe y Al, y en tropicales donde gran parte del P se encuentra en forma orgánica. ^[5]

IV.1.6. Fósforo total en el Suelo

El contenido total de fósforo en los suelos varía de 0.01% a 0.20%.

En todos los suelos el contenido de fósforo es mayor en la capa superficial que en los horizontes inferiores, lo que nos demuestra que el fósforo es un elemento de procedencia biológica. ^[5]

Casi la mitad del fósforo contenido en el suelo, se encuentra combinado con la Materia orgánica.



En los suelos ácidos y pobres en materia orgánica (humus), el fósforo se encuentra principalmente en combinaciones con el hierro y el aluminio, formando generalmente fosfatos de dichos metales (PO_4Fe , PO_4Al) o también sustancias orgánicas o inorgánicas con los coloides del suelo; los cuales contienen un exceso de Fe y Al. ^[5]

El fósforo asimilable en suelos ácidos y neutros se extrae con soluciones débilmente ácidas consideradas con un poder de adsorción aproximadamente igual a las sustancias segregadas por las raíces.

Para extraer el fósforo en suelos ácidos, se utilizan soluciones ácidas, y en los suelos básicos, soluciones alcalina.

En los suelos neutros y alcalinos, el complejo iónico esta saturado de bases, y el fósforo se encuentra principalmente en combinaciones con el calcio, formando los fosfatos de calcio (mono, di y tribásicos). ^[5]

El fósforo es un elemento que estimula el desarrollo del sistema radicular y el establecimiento temprano de las plantas. Es muy importante en la función reproductiva, por lo que es abundante en flores y frutos.

Las plantas deben contar con este elemento para completar su ciclo normal de producción ya que no existe otro nutriente que pueda sustituirlo.

El fósforo actúa en la fotosíntesis, respiración, almacenamiento y transferencia de energía, división celular, alargamiento celular y muchos otros procesos de la planta viviente, promoviendo la formación temprana y el crecimiento de las raíces. ^[5]

Es el nutriente vital para la formación de semillas y, además, permite a las plantas soportar inviernos rigurosos.

Cuando los suelos tienen deficiencia de fósforo disponible, la aplicación del fertilizante adecuado promueve la maduración temprana de algunos cultivos (especialmente cereales) y mejora la calidad del producto final.

Su falta es difícil de detectar en los cereales, sin embargo, en ciertas etapas del desarrollo del cultivo puede darle un color verde oscuro con tonos morados. ^[5]



IV.1.7. Ciclo del Fósforo

El ciclo del fósforo incluye la captación de fósforo por parte de los organismos. El fósforo se encuentra en el medioambiente principalmente en las rocas. Sin embargo, la exposición natural a las condiciones del tiempo desintegra la roca y hace que el fósforo se encuentre disponible para los sistemas biológicos. [6]

Tras la descomposición de residuos biológicos, puede acumularse en grandes cantidades en suelos y sedimentos.

Los humanos emplean el fósforo como fertilizante en las tierras de cultivo así como en los detergentes. Su uso excesivo puede conducir a la eutrofización. [6]

El ciclo del fósforo se efectúa únicamente entre la litosfera y la hidrosfera, debido a que el elemento no es transportado por la atmósfera.

El fósforo es transferido a los organismos consumidores en forma orgánica y es devuelto al suelo por las excreciones de fosfatos animales y por la acción de los degradadores de detritus. [6]

El humus y las partículas del suelo fijan fosfatos, y el reciclamiento tiende a localizarse en los ecosistemas.

Sin embargo, el fósforo se infiltra en las aguas subterráneas gradualmente drenando de los ecosistemas terrestres al mar; la erosión severa puede acelerar este proceso.

El fosfato que llega al océano gradualmente se sedimenta y se incorpora en las rocas, y después de mucho tiempo vuelve a los ecosistemas terrestres. [5]

El fosfato que llega al litoral, se introduce en la cadena trófica marina mediante el fitoplancton y se convierte en fósforo orgánico. Una vez estos organismos mueren, caen con rapidez al fondo oceánico y con ellos el fósforo. Una pequeña parte del mismo (Que

será recuperado por el ecosistema marino) queda en la superficie, y el resto llega hasta las zonas profundas y se sedimenta pasando al ciclo geológico sedimentario. [6]

Por lo tanto, como puede observarse, ocurren dos ciclos del fósforo: uno terrestre y otro acuático.

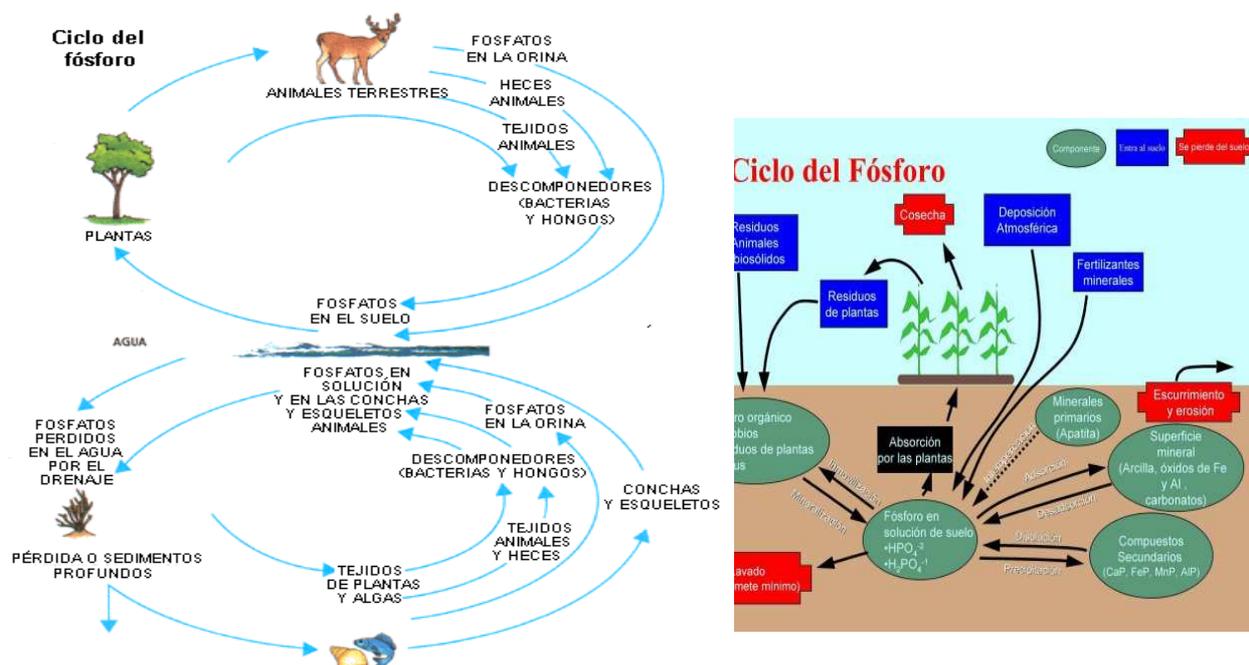


Figura No. 1. Ciclo del fósforo

IV.1.8. Importancia del Fosforo en el suelo

El fósforo es un elemento esencial para los seres vivos, y los procesos de la fotosíntesis de las plantas, como otros procesos químicos de los seres vivos, los cuales no se pueden realizar sin ciertos compuestos en base a fósforo. [6]

En la naturaleza se encuentra formando parte de los minerales o de los componentes orgánicos de los tejidos vivos como huesos y dientes



Sin la intervención del fósforo no es posible que un ser vivo pueda sobrevivir.

El fósforo es un elemento que se puede encontrar en las estructuras del ADN de los organismos.

El fósforo es uno de los elementos más importantes para los sistemas biológicos ya que forma parte de moléculas tan importantes como los ácidos nucleicos (AND, ARN), el ATP y otros compuestos fosforados.

Además juega un papel especial en el metabolismo energético de los seres vivos, pues al transferirse un ión fosfato a una molécula de ADP se origina una molécula de ATP, rica en energía fácilmente transportable. [5]

Hay grandes cantidades de fósforo contenido en el organismo, sobre todo en los ácidos nucleicos ARN y AND, y en la membrana en forma de fosfolípidos.

La biosfera ofrece varias opciones de energía para el desarrollo y vida de organismos. Es ahí donde aparece el fósforo.

Es necesario en la biosfera porque aunque no es un constituyente de las proteínas, éstas no pueden formarse sin él, ya que requieren del enlace de fosfato de alta energía en forma de ATP.

Además este elemento tiene una gran importancia ecológica por ser probablemente el elemento limitante o regulador de la productividad de los ecosistemas.

El fósforo es el principal factor limitante del crecimiento para los ecosistemas, porque el ciclo del fósforo está principalmente relacionado con el movimiento del fósforo entre los continentes y los océanos. Al contrario que en el ciclo del nitrógeno, en el del fósforo no hay fase gaseosa en el aire.

La proporción de fósforo en la materia viva es relativamente pequeña, el papel que desempeña es vital. [5]



Es componente de los ácidos nucleicos como el ADN, muchas sustancias intermedias en la fotosíntesis y en la respiración celular están combinadas con el fósforo, y los átomos de fósforo proporcionan la base para la formación de los enlaces de alto contenido de energía del ATP, se encuentra también en los huesos y los dientes de animales, incluyendo al ser humano.

IV.1.9. Dinámica del fósforo en el Suelo

La dinámica del P en el suelo es compleja y el equilibrio entre los diferentes compuestos en los que se lo puede encontrar es función de las características químicas, físicas y biológicas edáficas. La transformación de las formas orgánicas (Po) e inorgánicas (Pi) del P están estrechamente relacionadas; si bien las plantas absorben Pi, existen numerosos trabajos que indican la importancia del Po como un reservorio de P disponible para las plantas.^[7]

IV.1.10. Ciclo Geoquímico del Fosforo

La figura inferior muestra el ciclo del fósforo en la naturaleza y la intervención del hombre en el mismo. Se puede observar que se pierde fósforo por: escurrimiento, erosión, lavado y extracción en la cosecha. Por otro lado se regresa fósforo al suelo por medio de adición de fertilizantes minerales (que es la más importante y significativa), retorno de residuos de animales y plantas y por deposición atmosférica.^[8]

Las plantas absorben únicamente el fósforo que esta en la solución del suelo en forma de HPO_4^{-2} (ión fosfato monoácido) y $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ (ión fosfato diácido). Cualquier fertilizante ya sea de origen orgánico o mineral debe de transformarse primero en esas especies (formas químicas) antes de ser utilizado por el cultivo. Las diferencias entre los residuos orgánicos y los fertilizantes minerales son principalmente dos: 1) velocidad de disponibilidad para el cultivo (los residuos orgánicos tienen que ser primero descompuestos por los microbios, mientras que los abonos minerales ya tienen los compuestos en la forma que la planta los utiliza) y 2) concentración (los residuos orgánicos tienen concentraciones más bajas de fósforo que los compuestos minerales).^[8]



IV.2. Principales Métodos recomendados para el análisis de fósforo en suelos

Existen varias formas de métodos analíticos para la determinación de Fósforo en el suelo.

La determinación de fósforo en los suelos se facilito extraordinariamente por el desarrollo de métodos colorimétricos sensibles.^[9]

Los principales métodos de extracción del P_2O_5 asimilable para suelos ácidos y neutros son los siguientes:^[9]

Método de O. Arrhenius

Método de A. Kirsanov

Método de Bray y Kurz

Método de E. Troug

Método de F. Chirikov

Método de F. Burriel y V. Hernando.

Fusión de carbonato de sodio, Método de Truog y Meyer

Método de azul de Molibdeno de Fiske y Subbarow

Método de amarillo de Vanadato – Molibdato

Método de Azul de Molibdeno de Dickman y Bray.^[10]

El método de Osmond, que se basa en el color azul del producto de reducción del ácido molibdofosfórico, se ha extendido extraordinariamente. Describiéndose cuatro modificaciones que son de uso general:

I: El método de color azul del producto de reducción del ácido molibdofosfórico, obtenido mediante cloruro estañoso en medio ácido sulfúrico.

Este método tiene la máxima sensibilidad por unidad de fósforo presente y presenta un intervalo de trabajo de 0.02 a 0.6 ppm de fósforo.^[11]



II: El método de color azul del producto de reducción del ácido molibdofosfórico, obtenido mediante cloruro estañoso en un medio acidificado con ácido clorhídrico.

El método II tiene, aproximadamente, solo la mitad de la sensibilidad que posee el método I en presencia de ácido sulfúrico, y un intervalo de trabajo entre 0.05 a 1 ppm de fósforo.^[11]

III: El método de color azul del producto de reducción del ácido molibdofosfórico, obtenido mediante molibdeno, en un medio ácido con ácido sulfúrico.^[11]

Este método tiene la sensibilidad que es aproximadamente un tercio de la que tiene el método I. y requiere 30 minutos para el desarrollo del color. El color, una vez desarrollado, permanece inalterado durante 24 horas. Interfieren cantidades superiores a 2, 25, 100 y 25 ppm de hierro, arseniato, arsenito y silicato respectivamente.^[11]

IV: El método de color azul del producto de reducción del ácido molibdofosfórico, obtenido mediante el ácido 1, 2,4-aminonaftolsulfónico, en un medio perclórico o sulfúrico.

El método IV es único por el hecho de que el ácido perclórico se añade separadamente a la disolución que se ensaya cerca del final de la determinación, habiendo añadido, precedentemente, el reductor y el sulfito para la eliminación del arseniato. Finalmente se añade el molibdato para que se desarrolle el color. Esto permite realizar un ajuste de la acidez final en disoluciones que contengan una acidez residual apreciable.^[11]

Cada uno de estos métodos presenta sus respectivas ventajas de sensibilidad, tolerancia varios niveles de sustancias que interfieren, velocidad o estabilidad del color.

IV.2.1. Principios de los métodos analíticos

IV.2.1.1. Fusión de carbonato de sodio, Método de Truog y Meyer:

En una solución ácida, los ortofosfatos solubles se combinan con molibdatos para formar sales dobles.^[10]

Aunque la cantidad de fosfomolibdatos presentes puede ser insuficiente para formar un precipitado, al reducirse se forma un complejo soluble de color azul y la profundidad de la



coloración es proporcional a la cantidad de fosfato presente. Para la determinación cuantitativa es necesario que la solución final se ajuste a una acidez definida, puesto que demasiado ácido impide o reduce la rapidez del desarrollo del color del fosfomolibdato, y una cantidad demasiado pequeña de ácido permite la reducción del molibdato, que produce también un color azul. ^[10]

En general para cualquier concentración dada de molibdato, se requiere una concentración definida del ácido.

IV.2.1.2. Método de azul de Molibdeno de Fiske y Subbarow:

Los principios para este método son los mismos que para el de Troug y Meyer. El agente reductor utilizado en este procedimiento hace que el método sea menos sensible y no adecuado para la determinación de pequeñas cantidades de fósforo que se encuentra en extracto de suelos; pero es muy apropiado para la determinación de fósforo en los materiales de plantas o del fósforo total en los suelos. ^[10]

La sensibilidad menor hace posible que se utilicen mayores muestras o alícuotas de soluciones, reduciendo los errores debidos a las pequeñas de las muestras o alícuotas.

IV.2.1.3. Método de amarillo de Vanadato – Molibdato:

Los vanadatos, los molibdatos y los ortofosfatos reaccionan para dar un complejo amarillo en soluciones ácidas. En soluciones de ácido nítrico, el color no se desarrolla si la acidez es menor de 0.2N, y se desarrolla lentamente si es mayor de 1.6 N. ^[10]

Este método es menos sensible que el Truog y Meyer o el de Fiske Y subbarow.

Este método es menos sensible para la determinación del fósforo en extractos de suelos; pero puede ser útil para el análisis del contenido de fosforo en las plantas.

El color se desarrolla en varios minutos y permanece estable durante dos meses con concentraciones elevadas de fósforo; pero en las concentraciones de fosforo de 5 ppm, es estable solo durante dos semanas. ^[10]



IV.2.1.4. Método de Azul de Molibdeno de Dickman y Bray:

Este es otro método basado en la producción de complejo azul de molibdato y ortofosfatos, en una solución ácida. El método es muy sensible y puede utilizarse en el análisis de extractos de suelos, así como también para determinar el contenido total de fósforo en suelos y plantas. La gama habitual de concentraciones va de 0 a 50 mg en una solución final de 50 ml. ^[10]

IV.2.1.5. Método de Bray I:

En 1945, Bray y Kurtz proponen un método rápido para estimar las formas de fósforo disponible para las plantas. En resumen, el método conocido como Bray I se trata de una extracción con una solución mezcla de NH_4F 0,03N y HCl 0,025N, que se basa en el efecto solubilizador del H^+ sobre el P del suelo y la capacidad del ión F^- de bajar la actividad del Al^{+3} , evitando la readsorción de los fosfatos en el sistema de extracción (Soil and Plant Analysis Council, 1992; Kuo, 1996). Ellos plantearon trabajar con 1 gramo de suelo y 7 ml de solución extractiva, agitando vigorosamente por un minuto, para luego determinar el P en el extracto. ^[12]

Este método conserva el mismo fundamento químico descrito para Bray II, puesto que utiliza también una solución ácida de fluoruro de amonio en igual concentración de NH_4F y solo se modifica en la concentración del ácido utilizado, el cual es 4 veces más diluido que el Bray II. ^[12]

IV.2.1.6. Método de Bray II:

Este método usa como extractora una mezcla de fluoruro de amonio (NH_4F) 0.03N y ácido clorhídrico (HCl) 0.1N. Se utiliza Ácido clorhídrico 0.1N con el fin de incluir una mayor cantidad de fósforo proveniente de la apatita del suelo. El ión (F^-) puede solubilizar los fosfatos de hierro y aluminio por su propiedad de formar complejos con estos cationes en solución ácida, con la consecuente liberación del fósforo retenido en el suelo por esos iones trivalentes. ^[12]



Por su parte el desarrollo del color, algunos investigadores han propuestos el uso de un reactivo simple para determinar fósforo, el cual contiene ácido sulfúrico, molibdato de amonio, ácido ascórbico, tartrato de antimonio y potasio en una solución simple la cual reacciona con el, ortofosfato para producir un color estable en 10 minutos. Estos investigadores encontraron que el antimonio (como tartrato de antimonio y potasio) aceleraba el desarrollo del color y este permanecía estable durante 24 horas.^[12]

IV.2.1.7. Método de Hunter (Olsen Modificado)

Este procedimiento emplea una solución extractante modificada de NaHCO_3 que según Hunter (1977) es adecuada para indicar el estado de disponibilidad de “P” para una amplia gama de condiciones de pH del suelo y puede usarse para determinar además K, Cu, Mn y Zn.^[12]

IV.2.1.8. Método Troug

Este método se basa en la extracción con ácido sulfúrico 0.002N.

El fosfato soluble en ácidos diluidos puede constituir un medida útil de la disponibilidad de fosforo en suelos ácidos y neutros. El ácido sulfúrico amortiguado a pH 3.0 da buen resultado y proporciona un extracto en el que el fosfato puede determinarse directamente sin ningún tratamiento previo.^[13]



IV.3. Fundamentos de la espectrofotometría UV VISIBLE

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

IV.3.1. Principio de la Espectrofotometría

La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química. ^[14]

Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida. ^[14]

El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbidas. ^[14]

La espectrofotometría ultravioleta-visible usa haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm y en el de la luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro. ^[14]

Al campo de luz uv de 200 a 400 nm se le conoce también como rango de uv cercano, la espectrofotometría visible solamente usa el rango del campo electromagnético de la luz visible, de 400 a 800 nm. ^[14]

Además, no esta de menos mencionar el hecho de que la absorción y transmitancia de luz depende tanto de la cantidad de la concentración y de la distancia recorrida. ^[14]

La Ley de Beer declara que la cantidad de luz absorbida por un cuerpo depende de la concentración en la solución.



En la Ley de Lambert se dice que la cantidad de luz absorbida por un objeto depende de la distancia recorrida por la luz.

Al hacer pasar una cantidad de fotones o de radiaciones, por las leyes mencionadas anteriormente, hay una pérdida que se expresa con la ecuación:

$$I_t/I_o = T^{kdc}$$

Donde I_t , es la intensidad de luz que sale de la cubeta y que va a llegar a la celda fotoeléctrica (llamada **radiación o intensidad transmitida**); y I_o que es la que intensidad con la que sale al atravesar la celda (**radiación intensidad incidente**) y la relación entre ambas (T) es la transmitancia. [14]

En el exponente, el signo negativo se debe a que la energía radiante decrece a medida que el recorrido aumenta. Donde k es la capacidad de la muestra para la captación del haz del campo electromagnético, d es la longitud de la cubeta de espectrofotometría que recorre la radiación, y c es la concentración del soluto en la muestra ya ubicada en la cubeta. [14]

La ecuación simplificada de la ley de Beer-Lambert

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c$$

Comprende a la *mínima* ecuación que relaciona la concentración (c), la absorbancia de la muestra (A), el espesor recorrido por la radiación (d) y el factor de calibración (ϵ). El factor de calibración relaciona la concentración y la absorbancia de los estándares. [14]

La absorción (o absorbancia) es igual a A , la es el logaritmo del recíproco de la transmitancia:

$$A = \log 1/T$$

Lo que es igual a:

$$A = -\log T$$

Las ecuaciones mencionadas de las leyes son válidas solo y solo si



- La radiación incidente es monocromática.
- Las especies actúan independientemente unas de otras durante la absorción.
- La absorción ocurre en un volumen de sección transversal uniforme

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano. En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas. ^[14]

IV.3.2. Aplicaciones

La espectrometría UV/Vis se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados.

Las soluciones de iones metálicos de transición pueden ser coloreadas (es decir, absorben la luz visible) debido a que los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por la presencia de otras especies, como algunos aniones o ligandos. Por ejemplo, el color de una solución diluida de sulfato de cobre es muy azul; agregando amoníaco se intensifica el color y cambia la longitud de onda de absorción máxima.

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. Es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias (las tablas de coeficientes de extinción molar) o, con más exactitud, determinándolo a partir de una curva de calibración. ^[14]



IV.3.3. Ley de LAMBERT - BEER

La espectrometría UV-Vis se utiliza con mayor frecuencia en forma cuantitativa para determinar las concentraciones de especies absorbentes en solución, usando la Ley de Lambert – Beer:

$$A = -\log_{10}(I/I_0) = \epsilon \cdot c \cdot L$$

donde A es la absorbancia medida, I₀ es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda, I es la intensidad de transmisión, L la longitud de ruta a través de la muestra, y c la concentración de las especies absorbentes. Para cada especie y longitud de onda, ε es una constante conocida como absorptividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular, y tiene como unidades $l/M \cdot cm$ o, a menudo, $U/M \cdot cm$. La absorbancia y extinción ε a veces son definidas en términos de logaritmo natural en lugar de logaritmo de base 10. ^[15]

La ley de Lambert - Beer es útil para la caracterización de muchos compuestos, pero no sirve como relación universal para la concentración y absorción de todas las sustancias. En moléculas complejas de gran tamaño, como los tintes orgánicos (Xylenol Naranja o Rojo Neutro, por ejemplo), a veces se encuentra una relación polinómica de segundo orden entre la absorción y la concentración.

El instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible se llama espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I₀). La relación I / I₀ se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T). La absorbancia (A) se basa en la transmisión: ^[15]

$$A = -\log(\%T)$$

Las partes básicas de un espectrofotómetro son una fuente de luz (a menudo una bombilla



incandescente para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz, y un detector. El detector suele ser un fotodiodo o un CCD. Los fotodiodos se usan con monocromadores, que filtran la luz de modo que una sola longitud de onda alcanza el detector. Las rejillas de difracción se utilizan con CCDs, que recogen la luz de diferentes longitudes de onda en píxeles.

Un espectrofotómetro puede ser único o de doble haz. En un instrumento de un solo haz (como el Spectronic 20), toda la luz pasa a través de la célula muestra. La I₀ debe medirse retirando la muestra. Este fue el primer diseño, y todavía está en uso en la enseñanza y Laboratorios industriales.^[15]

En un instrumento de doble haz, la luz se divide en dos haces antes de llegar a la muestra. Un haz se utiliza como referencia, y el otro haz de luz pasa a través de la muestra. Algunos instrumentos de doble haz tienen dos detectores (fotodiodos), y el haz de referencia y el de la muestra se miden al mismo tiempo. En otros instrumentos, los dos haces pasan a través de un bloqueador que impide el paso de un haz. El detector alterna entre la medida del haz de muestra y la del haz de referencia.^[15]

Las muestras para espectrofotometría UV-Vis suelen ser líquidas, aunque la absorbancia de los gases e incluso de los sólidos también puede medirse. Las muestras suelen ser colocadas en una célula transparente, conocida como cubeta. Las cubetas suelen ser rectangulares, con una anchura interior de 1 cm. Esta anchura se convierte en la longitud de ruta, L, en la Ley de Lambert- Beer. También se pueden usar tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. Las mejores cubetas están hechas con cuarzo de alta calidad, aunque son comunes las de vidrio o plástico. El cristal y la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles.^[15]

Un espectro ultravioleta-visible es esencialmente un gráfico de absorbancia de luz frente a una longitud de onda en el rango del ultravioleta o la luz visible. Este espectro puede ser producido directamente con los espectrofotómetros más sofisticados, o bien pueden registrarse los datos de una sola longitud de onda con los instrumentos más simples. La longitud de onda se representa con el símbolo λ . Del mismo modo, para una determinada



sustancia, puede hacerse un gráfico estándar del coeficiente de extinción (ϵ) frente a la longitud de onda (λ). Este gráfico estándar sería efectivamente "la concentración corregida" y, por tanto, independiente de la concentración. Para una sustancia determinada, la longitud de onda en la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro se llama λ_{\max} , y se pronuncia "lambda-max".^[15]

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Vis no es, sin embargo, una prueba específica para ningún compuesto determinado. La naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos, así como las variaciones en la anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro.

IV.4. Validación de los métodos analíticos

La validación de los métodos analíticos es un tema de considerable interés. Documentos tales como "Directrices ACS para la adquisición de datos y evaluación de la calidad de los datos" (1), recomendó el uso de métodos validados. La promulgación de regulaciones federales al medio ambiente requiere la inclusión de métodos de referencia validados. Las organizaciones que redactan estándares invierten considerable tiempo en métodos de pruebas colaborativas que ellos preparan validándolos en aplicaciones típicas y determinando sus características de resolución. Sin embargo, frecuentemente surgen preguntas acerca de la convivencia de los métodos y la validez de su uso en situaciones específicas. Algunas de esas preguntas pueden ser debido a la diferencia en entender tanto qué significa el proceso de validación.^[16]

La validación del método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. Validación del método es el "proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones del método y la identificación de los aspectos influyentes que puedan cambiar estas características así como hasta que punto se puede cambiar".

La validación de un método es un proceso basado en la confirmación del desempeño o de que el mismo es consistente con los requerimientos de su aplicación. El laboratorio de



servicio y su personal tiene una clara responsabilidad, la confianza del cliente, proporcionado la respuesta correcta a la parte analítica del problema en otras palabras debe demostrarse que los resultados son “adecuados para el propósito” para esto será suficiente que cualquier decisión que se tome basada en el sea confiable.

De manera que, el desempeño del método debe ser valido, y de igual manera, deberá estimarse la incertidumbre del resultado y analizar las muestras adecuadas. ^[16]

IV.4.1 Jerarquía de la metodología

La jerarquía de la metodología procede de lo general a lo específico, puede considerarse como sigue:

Técnica → método → procedimiento → protocolo.

Una técnica es principio científico que se ha encontrado utilidad para proporcionar información composicional; la espectrofotometría es un ejemplo.

Un método es una adaptación distinta de una técnica para un propósito de medición seleccionado.

Un procedimiento consiste en una guía escrita necesaria para utilizar el método.

Los métodos estándares desarrollados por la ASTM y la AOAC, en realidad son procedimientos estandarizados. Por tanto algún nivel de sofisticación es supuesto para el usuario de todo el procedimiento publicado; si es muy sofisticado, el usuario solo contemplara aquel mínimo detalle necesario o viceversa. Sin embargo se debe de notar que cualquier omisión en la descripción del paso crítico es una fuente potencial de variación o tendencia (desviación) aún en las manos de un analista muy experto y hábil. Debido a la flexibilidad intencionada o no intencionada proporcionada al analista, o debido a las diferencia en las interpretación que es justo decir que las menores /mayores diferencias de la aplicación se dan aún en los procedimientos definidos con mas precisión. Tales diferencias frecuentemente ocurren para la variabilidad de Inter.- laboratorio observada en muchas pruebas de laboratorio colaborativas.



Además en algún punto de desviación del procedimiento publicado resulta un nuevo método que puede necesitar su propia validación.

El término protocolo es el nombre más específico para un método. Un protocolo es un conjunto de guías definitivas que deben ser seguidas sin excepción si los resultados analíticos son aceptados para un propósito dado. Los protocolos pueden consistir de procedimientos o métodos ya existentes o modificaciones de los mismos o ellos pueden ser desarrollados para propósitos específicos.

Una cantidad de métodos, procedimientos, y protocolos basados en el mismo principio de medición puede surgir para una determinación analítica dada. Usualmente ellos son diferentemente redactados y pueden contener sutilezas o mayores diferencias en los detalles técnicos.^[17]

Tabla No 1. Ejemplo de la Jerarquía de la metodología.

Técnica.	Principio científico útil para proporcionar información de las composiciones específicas	Espectrofotometría
Método.	Adaptación diferente de una técnica para un propósito de mediciones seleccionado.	Método Bray II para la determinación de Fósforo en muestras de Suelo.
Procedimiento.	Guía escrita necesaria para seleccionar el método.	Método de prueba estándar para la determinación de Fósforo en muestras de Suelo.
Protocolo.	Conjunto de guías definitivas que deben ser seguidas sin excepción si los resultados son aceptados para un propósito dado.	Método de referencia de los métodos estandarizados de la USP para la determinación de Fósforo.



IV.4.2 Proceso de validación

El proceso de validación verifica que la metodología este basada sobre principios técnicos firmes y que han sido reducidos a la práctica para propósito de medición prácticas. Tanto la necesidad de validar la metodología como el procedimiento a seguir son materia de juicio profesional. La validación puede ser general o específica.^[17]

IV.4.3 Validación general

La validación de las técnicas de medición depende de la elucidación de los principios científicos sobre los cuales ellos están basados. Tales resultados de validación para la investigación de la comunidad científica y su solidez es evaluada por revisión. La mejor comprensión de los principios de medición puede extender su alcance y mejorar la calidad de su uso.

Los métodos surgen como resultado de una investigación aplicada, típicamente por individuos que frecuentemente involucran tanto el entendimiento comprensible de las técnicas de medición como el alto grado de ingenuidad e innovación en su aplicación. La comprobación de los métodos en situaciones prácticas típicas juega un papel clave, tanto en el proceso de desarrollo como en el de la validación.

Los procedimientos son desarrollados para el uso final de los métodos en situaciones analíticas prácticas. El usuario de laboratorio comúnmente necesita más detalle experimental que están contenidos en reportes de investigación publicados de un método para utilizarlos en aplicaciones prácticas. Frecuentemente cuando un método gana un uso extensivo el usuario puede decidir que este necesite ser estandarizado.

Un proceso de revisión completo incluye pruebas colaborativas en los cuales los materiales de prueba estable típicos son analizados para verificar la utilidad del procedimiento y para identificar tanto la debilidad técnica como editoriales.

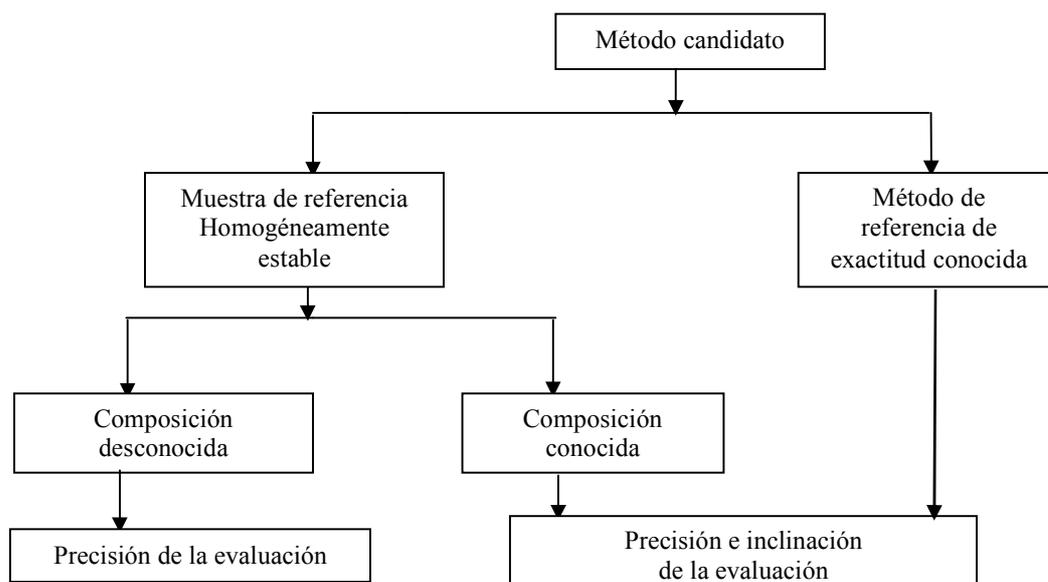


Figura No. 2. Prueba colaborativa.

Si la composición de la muestra de referencia es conocida, su precisión y su desviación tanto a nivel intra o inter laboratorio pueden ser evaluadas. Si un método de exactitud conocida está disponible, el ensayo colaborativo puede consistir de su comparación con el método propuesto en cualquier caso tanto la precisión como la desviación pueden ser evaluadas. Un protocolo es prescrito por Fiat de una organización que requiere un tipo específico de medición. Presumiblemente resulta de una decisión inteligente basado en el proceso de validación de la organización o de otros. Esto puede consistir de un ensayo colaborativo extenso o la publicación de protocolo propuesto para comentario público.

Desafortunadamente el juicio científico ha estado invalidado ante la ausencia de protocolos defectuosos e invalidados. Los protocolos que han sido especificados en un arreglo contractual pueden escoger arbitrariamente o a través de un proceso de selección bien concebido. La verificación de su validez para su uso específico debe ser de primera consideración. ^[17]

IV.4.4 Validación para uso específico

El uso final de la metodología analítica es producir información composicional acerca de las muestras específicas necesarias para la solución de un problema. El proceso de validación clásica se ilustra en la figura siguiente.

IV.4.5 Proceso general para la metodología

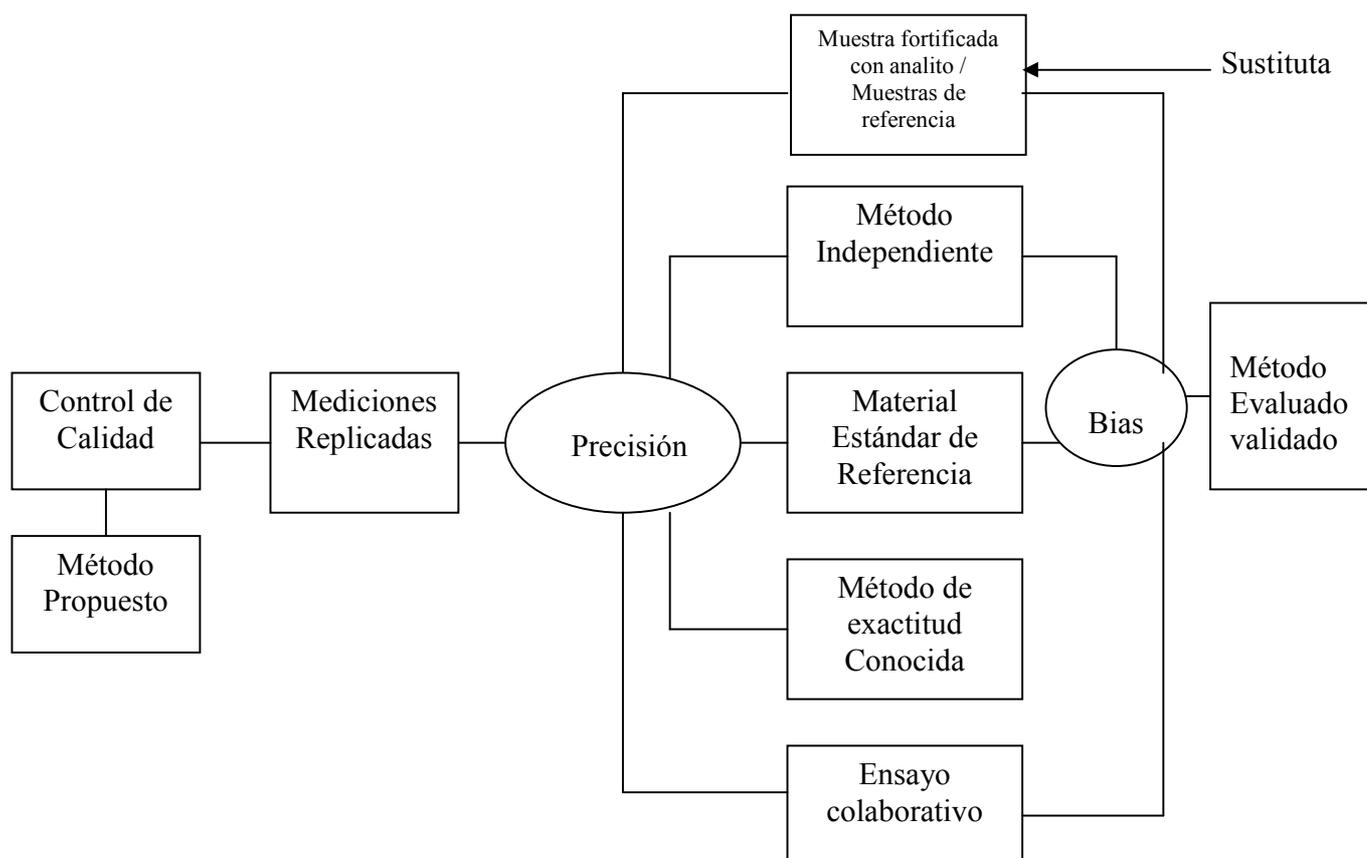


Figura No 3. Evaluación / validación

Cuando las muestras de referencia están disponibles y es similar en todos los aspectos a las muestras de prueba el proceso es muy simple: consiste en el análisis de un número significativo de muestras de referencia y comparando los resultados que se esperan o valores certificados. Antes o durante la práctica, el analista debe demostrar la habilidad del estado del control estadístico del sistemas de medición para que los resultados puedan ser realizados sobre otros, representativos a aquellos esperados cuando se utiliza en la



metodología de un sistema de medición. Cuando no se dispone de un material de referencia apropiado se pueden usar otras técnicas. Una de ellas consiste de la comparación de los resultados del método propuesto con aquellos de otros métodos conocidos sean aplicables y confiables pero no útil en la situación real debido al costo, indisponibilidad del personal o equipo u otras razones.

Las muestras llamadas “spiked” (fortificada con el analito) y “surrogated” pueden ser usadas como muestras de referencia. Esta técnica es menos deseable y menos satisfactoria debido a la dificultad en la preparación confiable de las muestras y debido a la artificialidad añadida de materiales tales como “spikes” y “surrogates” que pueden exhibir diferentes efectos de matrices a aquellas de las muestras naturales. La división de las muestras reales de ensayos puede ser utilizada para evaluar la precisión de un método o procedimiento, pero ellas no proporcionan información acerca de la presencia o magnitud de cualquier “bias” (inclinación) de la medición.

Otra técnica es inferir la metodología apropiada de las mediciones sobre análogo, pero diferentes orígenes. Se necesita un análisis crítico del analista para decidir la validez de la interferencia.

En todos los casos las pruebas suficientes se pueden hacer para evaluar la metodología para una variedad de matrices y rangos de composición esperada dentro del proceso de medición, comúnmente debería incluir tres niveles de concentración, es decir, los extremos y el rango medio de composición esperada. Las consideraciones estadísticas sugieren que al menos seis grados de libertad (ordinariamente siete mediciones) deberían estar involucrados en cada punto de medición. ^[17]



IV.4.6 El método de adición patrón

Uno de los principales problemas en las determinaciones de los analitos en las muestras es el efecto de matriz, la cual se define como las interferencias de los diferentes componentes de la muestra en la determinación del componente principal. Esto significa que la señal detectada será una respuesta no solamente del componente principal (o analito) sino debido a otros componentes de la matriz. El efecto de matriz puede aumentar o disminuir la señal verdadera, lo que trae como consecuencia un error sistemático en la determinación analítica. Para minimizar las interferencias de la matriz, se ha implementado la curva de calibración por el método de adición estándar.^[16]

IV.4.6.1 Adición Patrón

Para ganar seguridad en la utilización de las rectas de calibrado, o sea, de la correcta similitud en el comportamiento de patrones y problemas, es aconsejable el método de la adición estándar.

Las dudas suelen plantearse en los sistemas analíticos complejos o para las muestras con matrices difícilmente reproducibles en los patrones, el caso de alimentos, muestras biológicas o del medio ambiente, y evidentemente cuando concurren las dos circunstancias. La duda surge al no disponer de muestras de la misma matriz pero sin contaminación del metal, para utilizarla en la preparación de los patrones de calibración. Una solución es preparar los patrones con la misma muestra. Para ello se toman varios volúmenes iguales de la disolución a analizar, añadiendo a algunas de ellas cantidades perfectamente conocidas de la especie química a determinar y todas las alícuotas se enrazan al mismo volumen. Con ello se dispone de una serie de preparaciones que contienen, además de la cantidad problema (no conocida), las cantidades adicionadas, incluyendo la adición cero y valores que cubren el margen de linealidad. El método de las adiciones se apoya en dos premisas no siempre válidas; una es suponer que en el sistema analítico los patrones adicionados se comportan de la misma forma que lo hace la sustancia contenida en la muestra, pues no



podemos asegurar que correspondan a la misma especie o combinación química (estado de oxidación o de complejación, etc.). Otra suposición es que la relación señal-concentración mantiene la misma función lineal (concretamente la misma pendiente) fuera del margen calibrado, pues se deduce la concentración por extrapolación. Si con el método de la adición patrón se detecta interferencia, se recomienda modificar las condiciones experimentales o utilizar modificaciones de matriz para eliminar o reducir al mínimo la interferencia. ^[18]

IV.4.7 Criterios de eficiencia

Los criterios de eficiencia pueden clasificarse en primarios y secundarios. Los criterios primarios son:

IV.4.7.1 Precisión

Es una medida de que tan cerca están los resultados entre sí y usualmente se expresa por medio del valor de la desviación estándar, que describe la dispersión, o sea que, describe la magnitud de los errores aleatorios. ^[18]

IV.4.7.2 Exactitud o Bias (sesgo)

Que mide la magnitud de los errores sistemáticos.

IV.4.7.3 Límite de detección

Que mide la cantidad mínima que puede diferenciarse de la señal de ruido de fondo. Es la concentración del analito que produce una señal que es tres desviaciones estándar mayor que la del blanco.

$$L.D = 3.29 S b_0 / b_1 \quad \text{Ec. (1)}$$



Uno de los puntos característicos de la recta de calibrado es la señal para la concentración cero, que puede tener diferente significado si corresponde a la medida realizada sobre los reactivos sin la muestra (prueba en blanco de los reactivos). O bien, se realiza sobre la muestra sin alguno de los reactivos esenciales (prueba en blanco de la matriz de la muestra). Las explicaciones que puedan darse a la desviación desde cero hacia valores positivos o negativos de la señal para las pruebas en blanco, constituyen un buen índice del grado de conocimiento que el científico posee del procedimiento analítico.^[18]

Ambas señales de las pruebas en blanco suelen acumularse sobre las de la muestra, aunque de manera diferente a las señales de los patrones, por lo que es más prudente mantener estos valores en la representación de la recta de calibrado, y sustraer al resultado de concentración del correspondiente a la prueba en blanco. La señal de la prueba en blanco también presenta errores experimentales y, por lo tanto, una dispersión de valores que afectan al límite de detección del procedimiento.

Así como la pendiente de la recta de calibrado es un índice de la sensibilidad del procedimiento analítico, la precisión de esta pendiente y la de la ordenada en el origen establecen el límite de detección, o sea la cantidad mínima de sustancia detectable cuantitativamente. El valor del límite de detección se establece con criterios de probabilidad de cometer error por asignar un valor a la señal de un blanco, o bien por asignar el valor del blanco (no detectable) cuando en realidad la muestra contiene cantidad significativa de sustancia. También aquí la estadística proporciona diversos modelos para establecer estos límites, según el grado de seguridad que se desee alcanzar. En algunas técnicas instrumentales se llama "ruido de fondo" a la dispersión de la señal del blanco, estableciéndose como límite de detección la concentración que da una señal doble o triple respecto a la señal de fondo.

Es incorrecto utilizar expresiones como "no detectable", "ausencia" o "0", como resultado correspondiente a señales iguales a la prueba en blanco, siendo correcto decir que el resultado de una señal no diferenciable de la prueba en blanco es "inferior al límite de detección", cuyo valor se ha determinado previamente.^[18]



Los criterios secundarios son los que tienen influencia en los primarios; estos son:

IV.4.7.4 Límite de cuantificación

Es la más baja concentración del analito que puede ser cuantificada con suficiente precisión y exactitud. También es definido, convencionalmente, como la concentración de analito que corresponde al blanco de la muestra, más 5, 6 ó 10 desvíos estándar de la media (del blanco), también se le conoce como “límite de determinación”.

$$L.C = 10 S_{b_0} / b_1 \quad \text{Ec. (2)}$$

IV.4.7.5 Linealidad

Que describe el comportamiento entre la respuesta y la concentración a través del modelo de calibración (una desviación del modelo representa un bias).

IV.4.7.6 Rango

Representa el intervalo (niveles inferior y superior del analito) en el cual la relación lineal u otro modelo de calibración utilizado es correcta. ^[18]

IV.4.7.7 Selectividad

Este parámetro asegura que la señal medida no es influenciada por otras sustancias presentes en la muestra y en caso contrario, garantiza la remoción de las mismas, otro aspecto importante de la selectividad es si el analito puede existir en la muestra de una forma, tal como enlazado o libre, inorgánico u órgano - metálico, o en diferentes estados de oxidación. ^[18]



IV.4.7.8 Sensibilidad

Es el parámetro que mide la magnitud del cambio en la función de respuesta (o señal) con la concentración y corresponde a la pendiente de la curva de respuesta.^[18]

IV.5. Aproximación ISO para el cálculo de la Incertidumbre

Para llevar a cabo el cálculo de la incertidumbre comúnmente se divide el proceso de medida químico en sus partes fundamentales, cada una de estas partes fundamentales se subdivide a la vez en contribuciones más pequeñas, etc. Posteriormente, se calcula la incertidumbre de cada una de las partes y se combinan para obtener la incertidumbre global del proceso de medida química.^{[19]; [20]; [21]}

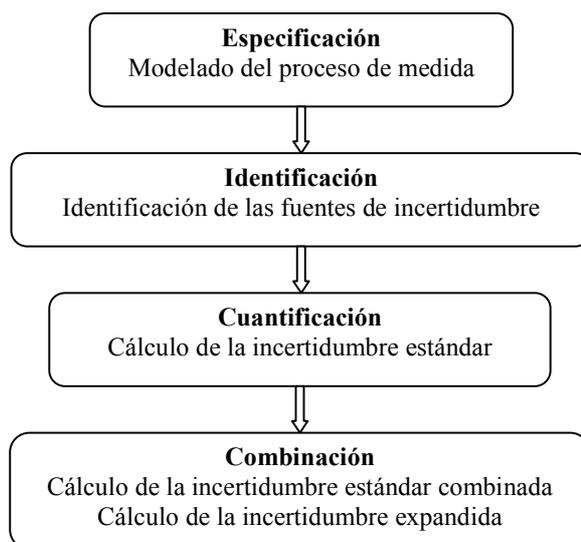


Figura No.4, Flujograma para el cálculo de la incertidumbre de un procedimiento según la aproximación ISO.

Especificación

Aquí debe modelarse el proceso de medida. Es decir, debe establecerse cual es la relación que existe entre el resultado analítico y los parámetros de los cuales depende.^{[10]; [13]; [14]}



Identificación

Una vez modelado el proceso de medida, deben identificarse todas las fuentes de incertidumbre independientemente de la importancia que pueda tener cada una de ellas en la incertidumbre final de los resultados. [19]; [20]; [21]

Combinación

Los componentes de incertidumbre individuales deben combinarse siguiendo la ley de propagación del error. De esta forma, se obtiene la incertidumbre total estándar. [10]; [13]; [14]

$$U_{(c)} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial c}{\partial X_i} U(X_i) \right)^2 + 2 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{\partial c}{\partial X_i} \frac{\partial c}{\partial X_j} \text{cov}(X_{ij})} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde “c” es el resultado obtenido con el procedimiento analítico, X_i es el parámetro “i” del que depende el resultado, $U(X_i)$ es la incertidumbre estándar de X_i y $\text{cov}(X_{ij})$ es la covarianza que hay entre los parámetros X_i y X_j .

Finalmente el cálculo de la incertidumbre expandida, $U(c)$, proporciona un intervalo de confianza donde se encuentra el valor verdadero con una determinada probabilidad. Esta incertidumbre se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar por un factor de cobertura “k”. [19]; [20]; [21]

$$U(c) = k \cdot u(c) \quad \text{Ec. (4)}$$

El factor de cobertura “k” depende de la probabilidad con la que queremos que se encuentre el valor verdadero dentro del intervalo $c \pm U(c)$ así como de la distribución y de los grados de libertad asociados a $U(c)$. Normalmente, se utiliza el valor de $k = 2$. Este valor asume una distribución normal y una probabilidad aproximada del 95.45 % de contener el valor de “t” tabulado de dos colas para el nivel de significación escogido y los grados de libertad efectivos, v_{eff} , calculados con la aproximación de Welch-Satterthwaite. [19]; [20]; [21]

$$v_{\text{eff}} = \frac{u(c)^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u(x_i)^4}{v_i}} \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde v_i es el número de grados de libertad asociados a $U(x_i)$.



V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1. Equipos y Materiales

Equipo	Marca	Modelo	Especificaciones Técnicas
Balanza Electronica Analítica (120 g)	Sartorius	TE 124 S, Serie 22450216	Max = 120 g; d=0.1 g
Espectrofotómetro UV-VIS	Perkin Elmer	lambda 15, Serie 5189	
Computador Lambda	Perkin Elmer	Serie 5366.	

Micro pipetas de 100 – 1000 μ L, marca Eppendorf, 2891026

Tubos de ensayos marca FHK, FUJIHIRA INDUSTRY CO, LTD, (Japonés).

Balones de 100 ml marca Blau Brand en $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1$, 50 ml marca Blau Brand Clase A ± 0.06 ml, 10 ml marca Pirex clase A TC $20^{\circ}\text{C} \pm 0.02$ ml.

Beakers de 50, 100, 10 ml $\pm 5\%$.

Embudos Plásticos marca FHK.

Papel Filtro marca Fisherbrand, porosidad media de 11 cm de diámetro.

Gradillas de Aluminio.

Espátulas.

Pizetas.

V.2. Reactivos

Fosfato de Potasio monobásico, KH_2PO_4 .

Meta vanadato de amonio (NH_4VO_3), marca Fisher Scientific, 99.3% de pureza Código A1-713-500, CAS 7803-55-6

Molibdato de amonio tetra hidratado ($\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, marca Fisher Scientific, Certified A.C. S, 82.9% de pureza, Código A 674-500,



Fluoruro de amonio (NH_4F), marca Fisher Scientific, Certified A.C. S, 99.3% de pureza, código A665-500, CAS 12125-01-8, cristal

Acido Clorhídrico (HCl), marca Fisher Scientific, 37.6% de pureza, código A144 c-212. Gravedad específica 1.19

Acido Nítrico (HNO_3), marca Fisher Scientific, Certified A.C, 69.6% de pureza, código A200c-212, gravedad específica 1.42, $N= 15.8$

V.3. Procedimientos

V.3.1 Preparación de soluciones

V3.1.1. Solución patrón de fosfato de Potasio monobásico KH_2PO_4 50 ppm

Se pesó 0.02195 g de fosfato de potasio monobásico y puso a secar en el horno durante 30 minutos, se disolvió en 100 ml con agua desionizada.

V.3.1.2. Solución extractante

Solución de Acido Clorhídrico 0.1N: se diluyeron 8.4 mL de HCl concentrado (P. esp. 1.19) en 1L de agua desionizada. Se valoró este ácido con una solución estándar de NaOH . Se diluyeron 1.11g de fluoruro de amonio (NH_4F) para tener una concentración de 0.03 N en 1 L de HCl 0.1 N.

V.3.1.3. Solución Colorimétrica Vanado –Molibdato

Se disolvieron 1.12 g de metavanadato de amonio (NH_4VO_3) en 250 ml de agua desionizada caliente. Se dejó enfriar y se agregaron cuidadosamente 250 ml de ácido nítrico (HNO_3) concentrado. Aparte, se disolvieron 27 g de molibdato de amonio tetrahidratado ($(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 250 ml de agua desionizada caliente. Luego se mezclaron en frío ambas soluciones y se aforó a 1 L con agua desionizada. Esta solución se guardó en frasco ámbar y se renovó cada 3 meses.



V.3.1.5. Tratamiento de la muestra

Se pesó 1g de muestra, se agregaron 10 ml de solución extractante, se agitó durante 1 minuto y luego se Filtró.

V.3.1.6. Desarrollo de la Coloración

Se tomaron 4 ml del extracto filtrado, se adicionaron 4 ml de agua desionizada y 2 ml de solución colorimétrica. Se dejó reposar durante 10 minutos para desarrollo del color y se realizó la lectura a una longitud de onda de 420 nm

V.3.2. Estudio de los parámetros de validación

V.3.2.1. Estudio de la linealidad de la curva de calibración normal

2 ml de solución colorimétrica y se aforaron cada uno con agua desionizada para obtener una concentración final de 6 ppm de fósforo, se dejaron desarrollar el color durante 10 minutos y se realizó la lectura en el equipo espectrofotométrico a una longitud de onda de 420 nm.

V.3.2.3. Precisión del método

Se realizaron 5 lecturas de tres niveles de concentración diferentes: uno bajo, un nivel intermedio y un nivel alto. Para fósforo 1, 6, y 10 mg/L. Se calculó el factor de respuesta y su desviación estándar relativa expresada como porcentaje (%RSD).



V.3.2.4. Exactitud del método

Se tomaron 3 matraces volumétricos de 10 mL, limpios y secos, se les agregaron a cada uno 0.2, 1.2, y 2.0 mL del estándar de fósforo de concentración 50 mg/L, se agregaron 2 ml de solución colorimétrica a cada uno y se aforaron con agua desionizada, se esperaron 10 minutos para el desarrollo del color y se realizó la lectura de cada uno en el equipo espectrofotométrico a una longitud de onda de 420 nm. Se realizaron cinco réplicas de la lectura de cada estándar. Finalmente se calculó el porcentaje de recuperación (%R) para cada nivel de concentración de la curva dividiendo la concentración experimental entre la concentración teórica multiplicado por 100.

V.3.2.5. Límite de detección y de cuantificación

Se tomaron 6 matraces volumétricos de 10 mL, limpios y secos, posteriormente se les agregaron a cada uno 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL del estándar de fósforo de 50 ppm, luego se adicionaron 2 ml de solución colorimétrica a cada uno de los matraces y se aforaron con agua desionizada para obtener una concentración final de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 ppm de fósforo, a continuación se dejó desarrollar el color durante 10 minutos y se realizó la lectura en el equipo espectrofotométrico a una longitud de onda de 420 nm.

V.3.2.6. Repetibilidad de las curvas de calibración normal

Se realizaron tres curvas de calibración con estándares puros a como se describe en el apartado V.3.2.1. Se realizó una curva durante tres días consecutivos, posteriormente se realizó el gráfico de control para el intercepto y la pendiente de las curvas.

V.3.2.7. Aplicación del método y estimar la incertidumbre asociada a la cuantificación

Se pesó 1g de muestra de suelo, se agregaron 10 ml de solución extractante, luego se agitó durante 1 minuto y se filtró. Seguidamente se tomaron 4 ml de extracto filtrado y agregaron 4 ml de agua desionizada y 2 ml de solución colorimétrica. Se dejó reposar por 10 minutos



para desarrollo del color y se realizó la lectura en el equipo Espectrofotométrico UV VIS a una longitud de onda de 420 nm.

Para efectuar los cálculos se utilizó en siguiente modelo matemático:

$$C_x = \left(\frac{(A_x - b_0)V_e x V_f x 0.04}{b_1 x V_a x W_0} \right) \quad \text{Ec. (6)}$$

Donde:

C_x : es la concentración de la muestra en mg/100 g de suelo.

A_x : es la Absorbancia de la muestra

b_0 : es el intercepto de la curva de calibración normal

b_1 : es la pendiente de la curva de calibración normal

V_e = Volumen de extractante agregado en ml, (10)

V_f = Volumen final de dilución en ml, (10)

V_a = Volumen tomado de alícuota en ml, (4)

Pm = Peso de la muestra en gramos, (1)

0.04 = factor de conversión

Para evaluar la incertidumbre primeramente se realizó la deducción del modelo matemático a partir del proceso de medición analítico, posteriormente se identificaron las fuentes de incertidumbres que contribuyen a la incertidumbre global del proceso de medición y se cuantificaron cada uno de estos componentes, seguidamente se calcularon los coeficientes de sensibilidad para cada parámetro del modelo matemático, a continuación se combinaron las incertidumbres y se calculó la incertidumbre combinada la cual al multiplicarla por un factor de cobertura de 2 para un nivel de confianza de 95.45 % se obtuvo la incertidumbre expandida con la cual se reportan nuestros resultados.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Estudio de la linealidad de la curva de calibración normal

Este estudio se realizó con el objetivo de encontrar el grado de linealidad que existe a lo largo de un buen rango de aplicación, para comprobar la linealidad se realizó una curva de calibración normal en un intervalo de concentración entre 1 – 10 mg/L para el fósforo, los datos se muestran en la tabla No. 1.

El valor del coeficiente de determinación (r^2) obtenido fue: 0.9997 para fósforo, una linealidad ideal indica un valor de coeficiente de determinación igual a 100 % ($r^2 = 1$),

Tabla No. 1. Datos de la curva de calibración normal para fósforo

Fósforo	
Concentración mg/L	Absorbancia
1	0.078
2	0.125
4	0.209
6	0.293
8	0.373
10	0.403

Como el valor de r^2 obtenido experimentalmente es cercano a la unidad se puede decir que existe una excelente linealidad, es decir existe una fuerte correlación entre las absorbancias obtenidas como función de la concentración. A continuación se muestra el gráfico obtenido.

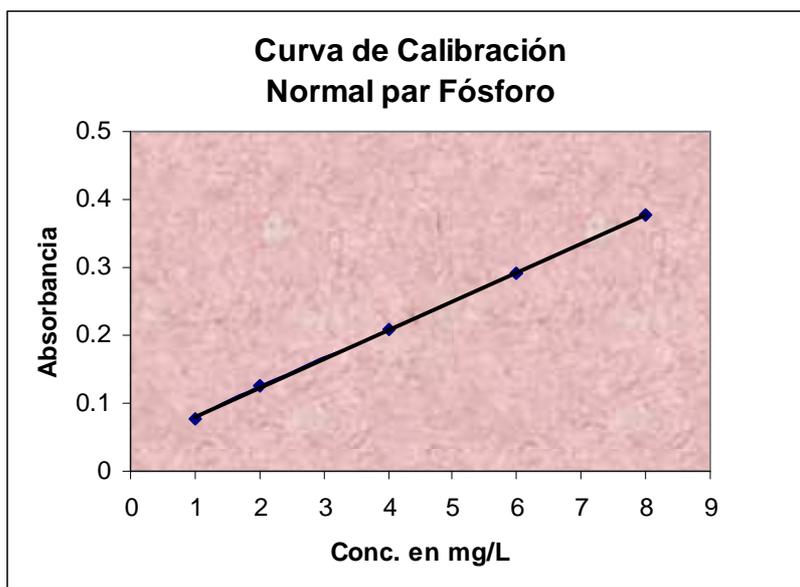


Gráfico No. 1. Curva de calibración normal para fósforo

VI.2. Repetibilidad del método

Este estudio se realizó con el propósito de comprobar la repetibilidad del equipo y del método espectrofotométrico utilizado, ya que si el equipo y el método no presentan una buena repetibilidad no serán aptos para realizar los análisis de fósforo en muestras de suelo, de no existir buena repetibilidad se deberá encontrar la causa de dicha anomalía y aplicar la o las acciones correctivas necesarias.

Para esto se midió por tres días la absorbancia de un estándar de fósforo de una concentración de 6 ppm, los datos se muestran en la siguiente tabla.

*Tabla No. 2. Estándar de fósforo de 6 ppm, Los valores de los días están en absorbancia.*

Réplicas	Días		
	1	2	3
1	0.353	0.357	0.355
2	0.358	0.353	0.355
3	0.358	0.353	0.356
4	0.357	0.353	0.356
5	0.357	0.353	0.357
Promedio	0.357	0.354	0.356
Varianza	4.3×10^{-6}	3.2×10^{-6}	7.0×10^{-7}

Para evaluar la homogeneidad de las varianzas se realizó la prueba de Bartlett, si se comprueba que las varianzas son homogéneas significa que existe buena repetibilidad en las lecturas de todos los días. Con esta prueba se obtuvo un valor del parámetro de Bartlett (M) = 2.61, y el valor de Chi – cuadrada (X^2) correspondiente a 2 grados de libertad y un nivel de confianza de 95 % es de 21.03, por tanto como el valor del parámetro M es menor que el valor de tabla de X^2 se puede concluir que no hay diferencia entre las varianzas es decir las varianzas son homogéneas, por tanto podemos afirmar que los resultados de todos los días son repetibles.

A demás de la prueba de Bartlett se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor, el cual es utilizado para comprobar si no hay diferencia entre las medias de todos los días en los que se realizó el estudio, si se demuestra que las medias de los resultados de todos los días son iguales significa que nuestros resultados son repetibles durante los tres días consecutivos estas dos pruebas son suficientes para afirmar que nuestro equipo y nuestro método producen resultados repetibles con el tiempo. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla No. 3. Resultados del ANOVA, Comparación de medias.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	F calculado	F tabla
muestras	2.1×10^{-5}	2	3.805	3.89
residual	3.3×10^{-5}	12		



Para saber si hay diferencia entre las medias se comparó el valor de F calculado ($F_c = 3.805$) con el valor de F de tabla ($F_{0.95} = 3.89$). Como se puede observar F_c es menor que F de tabla para el 95 % de confianza, por tanto se puede concluir que no hay diferencia significativa entre las medias, es decir el promedio de nuestros resultados diarios son repetibles, a través de la utilización de estas comprobaciones estadísticas podemos basarnos para afirmar que el método espectrofotométrico tiene una buena repetibilidad.

VI.3. Precisión del método

La precisión del método se llevo a cabo realizando cinco lecturas de tres estándares a tres niveles de concentraciones diferentes, 1, 6 y 10 ppm de fósforo, seguidamente se calculó el factor de respuesta ($FR = \text{Absorbancia/Concentración teórica}$) para cada estándar, posteriormente se calculó el promedio y la desviación estándar correspondiente a cada estándar, para finalmente calcular el %RSD por medio del cual se evalúa la precisión. Los resultados se muestran a continuación en la siguiente tabla.

Tabla No. 4. Resultados del estudio de precisión

Réplicas/Abs	Concentración (mg/L)		
	1	6	10
1	0.098	0.353	0.565
2	0.098	0.358	0.565
3	0.098	0.358	0.565
4	0.098	0.357	0.566
5	0.098	0.357	0.565
FR	0.098	0.059	0.057
	0.098	0.060	0.057
Promedio	0.098	0.059	0.057
Desv. Est.	4.4×10^{-8}	3.45×10^{-4}	4.4×10^{-5}
%RSD	4.6×10^{-5}	0.58	0.08

Como se puede observar se obtuvieron valores de %RSD menores al 1% lo cual indica una excelente precisión. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos afirmar que el método para determinar fósforo en muestras de suelo presenta excelente precisión.



VI.4. Exactitud del Método

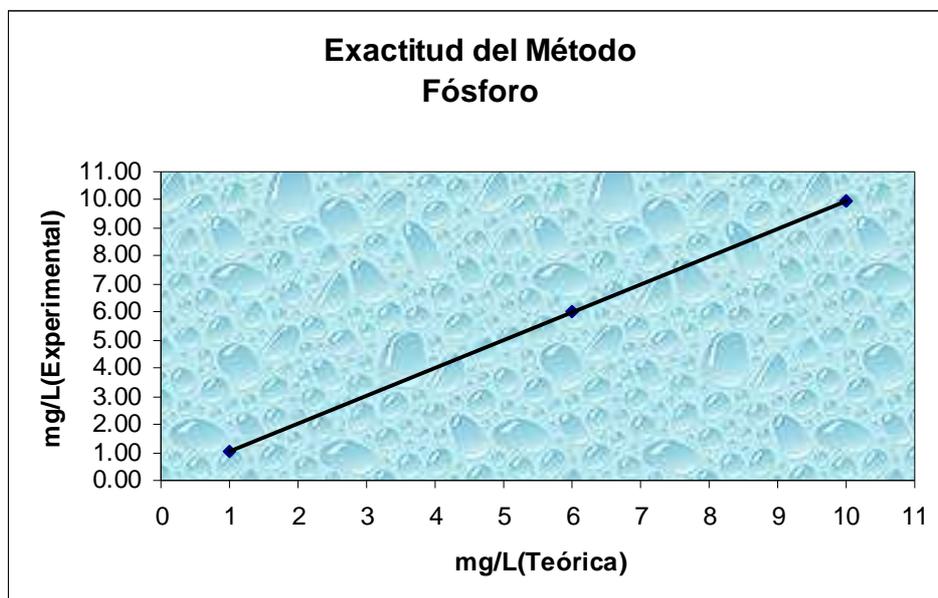
Para llevar a cabo el estudio de la exactitud del método se realizaron lecturas de tres estándares (tres niveles de concentración) de concentraciones perfectamente conocidas de fósforo, realizándose cinco réplicas para cada una de ellas, posteriormente se determinó el porcentaje de recuperación para evaluar la exactitud del método. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla No. 5. Resultados de la exactitud del método

Concentración Teórica (mg/L)	1	6	10
Réplicas	Concentración Recuperada (mg/L)		
1	1.03	5.92	9.99
2	1.03	6.02	9.99
3	1.03	6.02	9.99
4	1.03	6.00	10.01
5	1.03	6.00	9.99
Promedio	1.03	5.99	9.99
%R	102.95	99.86	100
%R	100.92		

Como se puede observar el valor del %R (porcentaje de recuperación) se encuentra dentro del criterio de aceptación es decir dentro del rango de 97 a 103 %. ($100 \pm 3\%$), Por lo tanto podemos afirmar que el método presenta buena exactitud para la determinación de fósforo.

A continuación se muestra el gráfico de concentraciones teóricas Vs concentraciones experimentales para el fósforo.



*Gráfico No. 2. Gráfico de evaluación de la exactitud del Método para **Fósforo***

Como se puede observar en el No. 2, para fósforo representa una línea recta con coeficiente de determinación de 1.00, por lo que podemos afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores de concentración teóricos y experimentales es decir el método presenta una muy buena exactitud.

VI.5. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Una de las ventajas de utilizar métodos instrumentales de análisis es que son capaces de detectar y determinar cantidades de analito mucho más pequeñas que los métodos clásicos. Uno de los principales problemas que se presentan cuando se trabaja a bajos niveles de concentración se da a la hora de informar sobre la presencia o ausencia de un analito determinado por esta razón es muy importante llevar a cabo la determinación tanto del límite de detección como del límite de cuantificación, esto se realizó utilizando la



desviación estándar del intercepto y la pendiente de la curva de calibración normal elaborada con estándar de Fosforo, las concentraciones utilizadas en la curva de calibración normal se encuentra cercana a la señal del blanco. Los datos se pueden observar en la siguiente tabla.

*Tabla No. 6. Datos de la curva de calibración normal para fósforo
Utilizada para calcular el LD y el LC*

Fósforo	
Concentración mg/L	Absorbancia
1	0.094
2	0.143
4	0.247
6	0.349
8	0.455
10	0.557
b1	0.052
S_{b0}	0.0011

Para el cálculo del límite de detección y el límite de cuantificación se usaron las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.29 \times S_{b_0}}{b_1} \quad \text{Ec. (1)}$$

$$LC = \frac{10 \times S_{b_0}}{b_1} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde S_{b_0} es la Desviación estándar del intercepto de la curva de calibración normal y b_1 es la pendiente de la curva de calibración normal.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación, como se puede observar los valores encontrados son muy pequeños.



VI.9. Repetibilidad de la curva de calibración normal

Tabla No. 7. Resultados del LD y LC para fósforo en suelo

Parámetros	Concentración
Límite de Detección (L.D.)	0.068 mg/L
Límite de Cuantificación (L.C.)	0.209 mg/L

Para observar la repetibilidad en las curvas de calibración normal se realizó un gráfico de control donde se presentan los límites de tolerancia de los parámetros de regresión (intercepto y pendiente) de dichas curvas las cuales se elaboraron por tres días consecutivos, construyendo los límites de control de la elipse con los parámetros de la curva del primer día. Estos datos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla No. 8. Parámetros de regresión de las curvas de calibración normal para fósforo, realizadas por tres días consecutivos

Fósforo			
mg/L	Días		
	1	2	3
1	0.094	0.099	0.096
2	0.143	0.143	0.147
4	0.246	0.242	0.253
6	0.350	0.370	0.356
8	0.455	0.466	0.458
10	0.557	0.557	0.558
b₀	0.041	0.043	0.045
b₁	0.051	0.052	0.051

Si tomamos en cuenta que los parámetros b_0 y b_1 están correlacionados, el modelo de correlación es una elipse. El gráfico No. 3 muestra la forma del gráfico de control. Los valores de b_0 y b_1 de las diferentes curvas de calibración deben caer dentro de la elipse. Los valores experimentales (b_0 y b_1) obtenidos durante tres días consecutivos están dentro de la elipse, por lo que se puede afirmar que la linealidad es repetible o la curva de calibración normal tiene una buena repetibilidad.

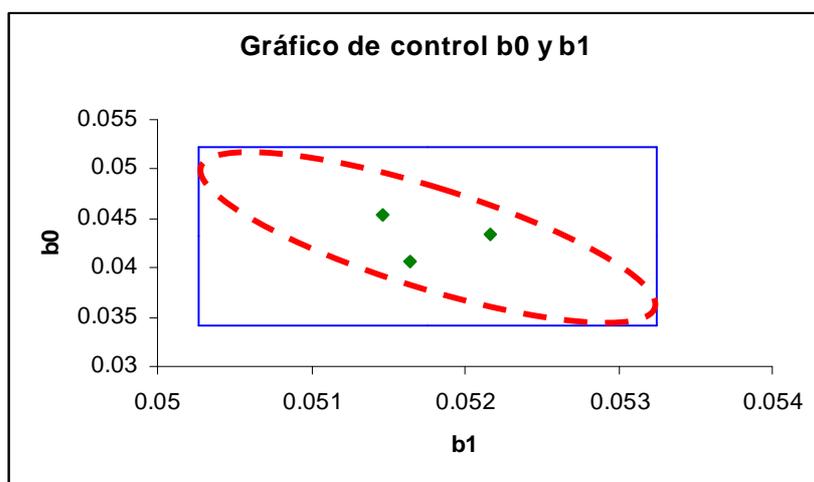


Gráfico No. 3. Gráfico de control de calidad de las curvas de calibración normal de fósforo realizadas durante 3 días consecutivos

VI.10. Aplicación del método y estimación de la incertidumbre asociada a la cuantificación de fósforo en muestras de suelo

VI.10.1. Modelo matemático

A continuación se muestra el modelo matemático empleado para la cuantificación de fósforo en muestras de suelo, el flujograma del proceso de cuantificación puede ser observado en los anexos.

Para efectuar los cálculos se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$C_x = \left(\frac{A_x - b_0}{b_1} \right) \left(\frac{V_f}{V_a} \right) \left(\frac{V_e}{W_0} \right) (0.04) \quad \text{Ec. (6)}$$

Donde:

C_x : es la concentración de la muestra en mg/100 g de suelo.

A_x : es la Absorbancia de la muestra



b_0 : es el intercepto de la curva de calibración normal

b_1 : es la pendiente de la curva de calibración normal

V_e = Volumen de extractante agregado en ml, (10)

V_f = Volumen final de dilución en ml, (10)

V_a = Volumen tomado de alícuota en ml, (4)

pm = Peso de la muestra en gramos, (1)

0.04 = factor de conversión

VI.10.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre

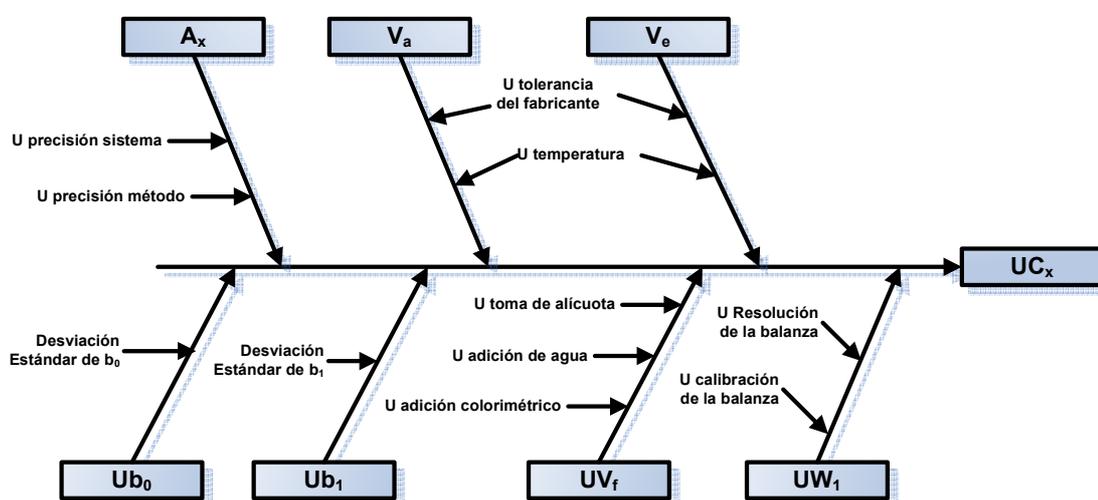


Figura No.5. Identificación de las fuentes de incertidumbres asociadas a la determinación de fósforo en muestras de suelo

VI.10.3. Cuantificación de los componentes de incertidumbre.

Incertidumbre debida a la lectura de la absorbancia de la muestra de suelo

$$U_{A_x} = \sqrt{\left(\frac{Sr}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad \text{Ec. (7)}$$

***Incertidumbre del intercepto de la curva de calibración normal de fósforo***

$$U_{b_0} = \frac{Sb_0}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. (8)}$$

Incertidumbre de la pendiente de la curva de calibración normal de fósforo

$$U_{b_1} = \frac{Sb_1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ec. (9)}$$

Incertidumbre debida a la adición de la solución extractante (10 ml)

$$U_{V_e} = \sqrt{\left(\frac{U_{T_e}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{V_e * \Delta t * \alpha}{2\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Ec. (10)}$$

Incertidumbre debida a la toma de la alícuota de extracto filtrado (4 mL)

$$U_{V_a} = \sqrt{\left(\frac{U_{T_a}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{V_a * \Delta t * \alpha}{2\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Ec. (11)}$$

Incertidumbre debida al volumen final de dilución (10 ml)

$$U_{V_f} = \sqrt{\left(\frac{U_{T_a}}{2}\right)^2 + \left(\frac{V_a * \Delta t * \alpha}{2\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{U_{T_b}}{2}\right)^2 + \left(\frac{V_b * \Delta t * \alpha}{2\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{U_{T_c}}{2}\right)^2 + \left(\frac{V_c * \Delta t * \alpha}{2\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Ec. (12)}$$

Incertidumbre debida a la pesada de la muestra de suelo (1 g)

$$U_{w_0} = \sqrt{\left(\frac{U_{cal}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{U_{res}}{2\sqrt{3}}\right)^2} \quad \text{Ec. (13)}$$

**VI.10.4. Cálculo de los coeficientes de sensibilidad**

Coefficiente de sensibilidad para la lectura de la absorbancia de la muestra de suelo

$$C_{A_x} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right) = \frac{(V_e * V_f * 0.04)}{b_1(V_a * W_0)} \quad \text{Ec. (14)}$$

Coefficiente de sensibilidad para el intercepto de la curva de calibración normal

$$C_{b_0} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) = -\frac{(V_e * V_f * 0.04)}{b_1(V_a * W_0)} \quad \text{Ec. (15)}$$

Coefficiente de sensibilidad para la pendiente de la curva de calibración normal

$$C_{b_1} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) = -\frac{(A_x - b_0)(V_e * V_f * 0.04)}{b_1^2(V_a * W_0)} \quad \text{Ec. (16)}$$

Coefficiente de sensibilidad par la alícuota de 4 mL

$$C_{V_a} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right) = -\frac{(A_x - b_0)(V_e * V_f * 0.04)}{b_1(V_a^2 * W_0)} \quad \text{Ec. (17)}$$

Coefficiente de sensibilidad para el volumen de extracción (10 ml)

$$C_{V_e} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right) = \frac{(A_x - b_0)(V_f * 0.04)}{b_1(V_a * W_0)} \quad \text{Ec. (18)}$$

Coefficiente de sensibilidad para el peso de la muestra (1 g)

$$C_{W_0} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right) = -\frac{(A_x - b_0)(V_e * V_f * 0.04)}{b_1(V_a * W_0^2)} \quad \text{Ec. (19)}$$

**Coefficiente de sensibilidad para la dilución final (10 ml)**

$$C_{W_1} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_1} \right) = \frac{(A_x - b_0)(V_e * 0.04)}{b_1(V_a * W_0)} \quad \text{Ec. (20)}$$

VI.10.5. Estimación de la incertidumbre combinada asociada al proceso de determinación de Fósforo en muestras de Suelo.

Aplicando la ley de propagación de la incertidumbre al modelo matemático (Ec. 7) se obtiene la siguiente expresión la cual se aplica para el cálculo de la incertidumbre combinada (La deducción completa de esta ecuación puede ser observada en los anexos).

La contribución de cada fuente de incertidumbre se obtiene finalmente multiplicando la incertidumbre estándar con su coeficiente de sensibilidad, la incertidumbre combinada es la suma cuadrática de las contribuciones individuales.

$$U_{C_x} = \sqrt{C_{A_x}^2 U_{A_x}^2 + C_{b_0}^2 U_{b_0}^2 + C_{b_1}^2 U_{b_1}^2 + 2C_{b_0} C_{b_1} U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)} + C_{V_a}^2 U_{V_a}^2 + C_{V_f}^2 U_{V_f}^2 + C_{W_0}^2 U_{W_0}^2 + C_{V_e}^2 U_{V_e}^2} \quad \text{Ec. (21)}$$

Sustituyendo los valores de los coeficientes de sensibilidad y los valores de las incertidumbres de cada uno de los parámetros que contribuyen con la incertidumbre en la ecuación 21, se obtiene el siguiente resultado.

$$U_{C(C_x)} = 0.01$$

**VI.10.6. Estimación de la incertidumbre expandida asociada al proceso de determinación de Fósforo en muestras de Suelo.**

Tomando un factor de cobertura de 2, para un nivel de confianza del 95.45 %. La incertidumbre expandida asociada a la cuantificación de fósforo en muestras de suelo.

$$U_{e(C_X)} = 2xU_{c(C_X)} = 0.02 \quad \text{Ec. (22)}$$

Tabla No. 9. Resultado obtenido para la cuantificación de fósforo en muestras de suelo.

Tipo de muestra	Analito	Concentración	Incertidumbre K = 2	Unidades
Suelo	Fósforo	34.2	0.02	mg fósforo / 100 g



VII. CONCLUSIONES

Existe buena linealidad en un buen rango de aplicación, desde 1 mg/L a 10 mg/L para fósforo, obteniéndose un valor de $r^2 = 0.999$.

El método presentó muy buena precisión para la determinación de fósforo en muestras de suelo, obteniéndose valores de %RSD menores del 1%.

El método analítico presentó muy buena exactitud, este se evaluó mediante lecturas de tres niveles de concentración perfectamente conocidas para luego compararlas con las concentración obtenida experimentalmente y finalmente calcular el % de Recuperación, obteniéndose valores de %R de 100.9 para la determinación de fósforo

Se lograron determinar el Límite de Detección obteniéndose valores de 0.389 mg fósforo / 100 g de suelo y 1.197 mg de fósforo / 100 g de suelo para el fósforo

Las curvas de calibración normal presentaron una muy buena precisión, lo cual se demostró a través de los gráficos de control para el intercepto y la pendiente, observándose que todos los puntos están dentro de la zona de aceptación del gráfico (Elipse).

Se realizó la cuantificación de fósforo y se estimó la incertidumbre asociada a la cuantificación de fósforo en muestras de suelo, obteniéndose resultados aceptables para el % de error: menos del 1 %. (34.2 ± 0.02 mg de fósforo /100g de suelo)



VIII RECOMENDACIONES

- Evaluar la exactitud del método utilizando un material de referencia certificado.
- Realizar el estudio de robustez de este método.
- Llevar a cabo el estudio del efecto de matriz en la cuantificación de fósforo.
- Realizar análisis de un mayor número de muestras de suelo.



IX BIBLIOGRAFÍA

- [1] Química, Raymond CHANG, Williams Collage, novena edición McGramHill (McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.), año 2007. Pagina N° 318, 322, 324, 340.
- [2] El fósforo, consultado en línea, fecha de acceso: 18 de febrero Del 2008, URL disponible en: <http://html.rincondelvago.com/fosforo.html>
- [3] La tierra y el fósforo, consultado en línea, fecha de acceso: 19 de febrero del 2008, URL disponible en: <http://html.rincondelvago.com/la tierra y elfosforo.htm>
- [4] Origen del fósforo, consultado en línea, fecha de acceso: 19 de febrero del 2008, URL disponible en: (<http://www.australtemuco.cl/site/apg/campo/pags/20030428142945.html>)
- [5] Handbook of Soil Science, Editor-in-Chief, Malcolm E. Sumner, CRC PRES, London New York Washington, D.C. Pag D-18)
- [6] Ciclo del fósforo, consultado en línea, fecha de acceso: 19 de febrero del 2008, URL disponible en: <http://html.rincondelvago.com/fosforo.html>
- [7] Cambio del Fosforo en suelos bajo diferentes rociones de cultivos, Suñer Liliana, Galantini Juan A. y Rosell Ramón, Comisión de Investigaciones Científicas (CIC, Pcia. Bs. As.), CONICET, Laboratorio de Humus, CERZOS - Dpto. Agronomía, UNS. Bahía Blanca (8000), Argentina, Pág. 1. lsuner@criba.edu.ar



[8] Ciclo geoquímica del fósforo, International plant Nutrition Institute (IPNI), Consultado en línea, fecha de acceso: Marzo del 2008, URL disponible en:

[http://www.inpofos.org/ppiweb/mexnca.nsf/\\$webindex/0D2745E9793640FD06256AAE00136ECB?opendocument&navigator=home+page](http://www.inpofos.org/ppiweb/mexnca.nsf/$webindex/0D2745E9793640FD06256AAE00136ECB?opendocument&navigator=home+page)

[9] Agroquímica, J. Pequeño Pérez, A. López Díaz, tomo 2, editorial Ciencia y Tecnología, Página 76, 77, 78, 79,80

[10] Métodos de análisis para los suelos, plantas y aguas, por Homer D. Chapman, Editorial Trillas, México, 1973, paginas 108, 112,113

[11] Análisis Químico de Suelos, M.L. Jackson, edición Revolucionaria, Pág. N° 191, 199, 203,209

[12] Manual de Asistencia Técnica No. 47, Bogota, Octubre de 1989. Autores: Leyla Amparo Rojas Escobar, Gloria Inés González Luna, Alvaro Ernesto Castillo Pinzón, Gloria Ortiz Ramírez, Edgar Amezquita Collazos, Rodrigo Lora Silva, Jaime Navas Alvarado, pagina No. 43). Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Subgerencia de Investigación y transferencia. División Disciplinas Agrícolas. Programa Nacional de Suelos; El análisis de Suelos, Plantas y Aguas para Riego.

[13] Métodos físicos y Químicos de análisis de suelos y aguas, J. Dewis y F. Freitas, Organización de las naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 1970

[14] Métodos modernos de análisis químicos, por, Robert L. Pecsok y L. Donal, consultado en línea, fecha de acceso: Junio del 2008, URL disponible en:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofotometría>

[15] Ley de Lambert-Beer, consultado en línea, fecha de acceso: 20 de Mayo del 2008, URL disponible en: http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible



- [16] Jorge Chacón. “Curso teórico práctico en aspectos técnicos del control de calidad interno del laboratorio de análisis”. CIRA/UNAN-Managua. 1999.
- [17] Johk Taylor. AnalChem 55(1983) 600A-608A.
- [18] Gustavo Delgado. “Principios de estadística y técnicas de validación”. UNAN-León. 1999.
- [19] Alicia Maroto Sánchez. “Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina” Tesis Doctoral, Universitar Rovira Virgili, Facultad de Química, Tarragona, 2002.
- [20] G-ENAC-09. “Guía para la expresión de la incertidumbre en los ensayos cuantitativos”. Rev. 1 Julio de 2005.
- [21] EURACHEM/CITAC Guide CG4. “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”. Second Edition. 2000.
- [22] ISO 5725-3:1994(E). “Accurecy (trueness and precision) of meausurement methods and results- Part 3: Intermediate measures of precision of a standard measurement methods”. First edition, 1994-12-15.
- [23] Cheng Chow Chan, Herman Lam, Y. C. Lee, Xue-Ming Zhang. “Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification”. Wiley-Interscience, a John Wiley & sons, Inc., Publication. 2004.
- [24] Ludwig Huber, “Validation and Quantification in Analytical Laboratories”. Second Edition. Agilent Technologies Waldbronn, Germany, Informa Healthcare USA, Inc. New York. 2007.
- [25] Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, “Principios de Análisis Instrumental”. Quinta edición. McGraw-Hill/Interamericana de España S.A. 2001.
- [26] David Harvey. “Modern Analytical Chemistry”. MacGraw-Hill Higher Education. 2000.



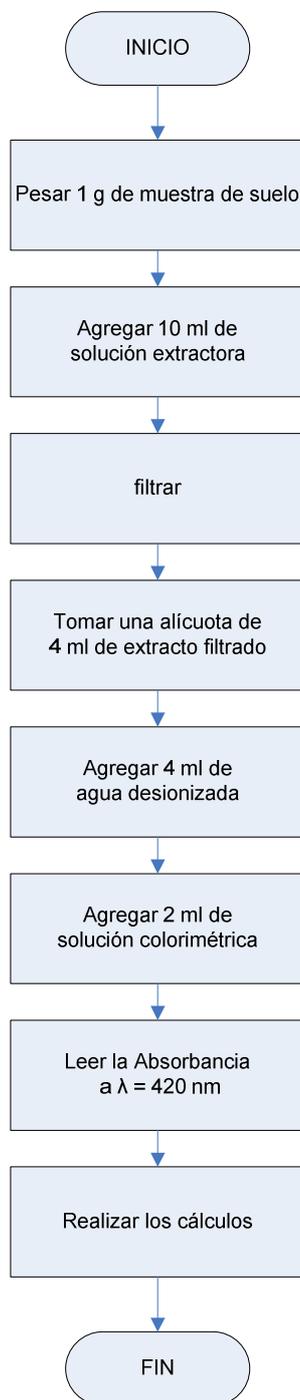
X. ANEXOS

X.1. matriz de datos y cálculos para estimar la incertidumbre en la cuantificación de fósforo en muestras de suelo.

Parámetro	Valor	U absoluta	distribución		U est. Comb.	Coef. Sensib.	Ci*Ui	(Ci*Ui)^2
Ax	0.355	0.00196	3.873	t-studen	0.00051	19.1880	0.009694	9.40E-05
b0	0.044	0.00075	2.449	t-studen	0.00031	-19.1880	-0.005877	3.45E-05
b1	0.052	0.00012	2.449	t-studen	0.00005	-114.5236	-0.005780	3.34E-05
Ve	10	0.002	2.449	rectangular	0.00082	0.5969	0.000487	2.37E-07
Va	4	0.002	2.449	rectangular	0.00082	-1.4921	-0.001218	1.48E-06
Vf	4	0.002	2.449	rectangular	0.00141	0.5969	0.000844	7.12E-07
	4	0.002	2.449	rectangular				
	2	0.002	2.449	rectangular				
Vf suma	10							
w0	1	0.0001	3.464	triangular	0.00058	-5.9685	-0.003450	1.19E-05
		0.001	1.732	triangular				
							r(b0b1)	-0.14188572
							Covarianza	-1.4901E-13
							UcCx	0.01
							UeCx(95,45%)	0.03
							Cx	5.97



X.2. Flujograma del procedimiento analítico





X.3. Deducción de la ecuación para estimar la incertidumbre asociada a la determinación de fósforo en muestras de suelo.

Modelo Matemático:

$$C_x = \left(\frac{A_x - b_0}{b_1} \right) \left(\frac{V_f}{V_a} \right) \left(\frac{V_e}{W_0} \right) (0.04)$$

Aplicación de la Ley de Propagación de la Incertidumbre al Modelo Matemático se obtiene:

$$dC_x = \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right) dA_x + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) db_0 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) db_1 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_f} \right) dV_f + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right) dV_a + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right) dV_e + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right) dW_0$$

$$\sum dC_x = \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right) \sum dA_x + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) \sum db_0 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) \sum db_1 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_f} \right) \sum dV_f + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right) \sum dV_a + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right) \sum dV_e + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right) \sum dW_0$$

$$\sum (dC_x)^2 = \left[\left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right) \sum dA_x + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) \sum db_0 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) \sum db_1 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_f} \right) \sum dV_f + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right) \sum dV_a + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right) \sum dV_e + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right) \sum dW_0 \right]^2$$

$$\begin{aligned} \sum (dC_x)^2 &= \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right)^2 \sum (dA_x)^2 + \left[\left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) \sum db_0 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) \sum db_1 \right]^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_f} \right)^2 \sum (dV_f)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right)^2 \sum (dV_a)^2 + \\ &+ \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right)^2 \sum (dV_e)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right)^2 \sum (dW_0)^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sum (dC_x)^2 &= \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right)^2 \sum (dA_x)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right)^2 \sum (db_0)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right)^2 \sum (db_1)^2 + 2 \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) \sum db_0 \sum db_1 r(b_0, b_1) + \\ &+ \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_f} \right)^2 \sum (dV_f)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right)^2 \sum (dV_a)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right)^2 \sum (dV_e)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right)^2 \sum (dW_0)^2 \end{aligned}$$



$$\frac{1}{N} [\sum (dC_x)^2] = \left[\left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right)^2 \sum (dA_x)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right)^2 \sum (db_0)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right)^2 \sum (db_1)^2 + 2 \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) \sum db_0 \sum db_1 r(b_0, b_1) + \left[\left(\frac{\partial C_x}{\partial V_f} \right)^2 \sum (dV_f)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right)^2 \sum (dV_a)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right)^2 \sum (dV_e)^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right)^2 \sum (dW_0)^2 \right] \frac{1}{N}$$

$$U_{C_x}^2 = \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right)^2 U_{A_x}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right)^2 U_{b_0}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right)^2 U_{b_1}^2 + 2 \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)} + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_f} \right)^2 U_{V_f}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right)^2 U_{V_a}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right)^2 U_{V_e}^2 + \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right)^2 U_{W_0}^2$$

Correlación entre el intercepto y la pendiente.

$$r_{(b_0, b_1)} = - \frac{\sum X_i}{n \sqrt{(\sum X_i^2) n}}$$

Calculo de los coeficientes de Sensibilidad

$$C_x = \left(\frac{A_x - b_0}{b_1} \right) \left(\frac{V_f}{V_a} \right) \left(\frac{V_e}{W_0} \right) (0.04)$$

Derivando parcialmente cada uno de los términos del modelo matemático se obtienen los coeficientes de sensibilidad, los cuales se muestran a continuación:

$$C_{A_x} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial A_x} \right) = \frac{(V_f * V_e * 0.04)}{b_1 (V_a * W_0)}$$

$$C_{b_0} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_0} \right) = - \frac{(V_f * V_e * 0.04)}{b_1 (V_a * W_0)}$$

$$C_{b_1} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) = \frac{[b_1 (V_a * W_0)] * d[(A_x - b_0)(V_f * V_e)] - [(A_x - b_0)(V_f * V_e)] * d[b_1 (V_a * W_0)]}{[b_1 (V_a * W_0)]^2}$$



$$U = (A_x - b_0)(V_f * V_e)$$

$$U = b_1(V_a * W_0)$$

$$\frac{dU}{db_1} = 0$$

$$\frac{dU}{db_1} = (V_a * W_0)$$

$$C_{b_1} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) = \frac{[b_1(V_a * W_0)] * (0) - [(A_x - b_0)(V_f * V_e)] * (V_a * W_0)}{[b_1(V_a * W_0)]^2}$$

$$C_{b_1} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) = - \frac{[(A_x - b_0)(V_f * V_e)] * (V_a * W_0)}{[b_1(V_a * W_0)]^2} = - \frac{[(A_x - b_0)(V_f * V_e)]}{b_1^2(V_a * W_0)}$$

$$C_{b_1} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial b_1} \right) = - \frac{(A_x - b_0)(V_f * V_e) * 0.04}{b_1^2(V_a * W_0)}$$

$$C_{V_a} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_a} \right) = - \frac{(A_x - b_0)(V_f * V_e) * 0.04}{b_1(V_a^2 * W_0)}$$

$$C_{V_f} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_f} \right) = \frac{(A_x - b_0)(V_e) * 0.04}{b_1(V_a * W_0)}$$

$$C_{W_0} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial W_0} \right) = - \frac{(A_x - b_0)(V_f * V_e) * 0.04}{b_1(V_a * W_0^2)}$$

$$C_{V_e} = \left(\frac{\partial C_x}{\partial V_e} \right) = \frac{(A_x - b_0)(V_f) * 0.04}{b_1(V_a * W_0)}$$

$$U_{C_x}^2 = C_{A_x}^2 U_{A_x}^2 + C_{b_0}^2 U_{b_0}^2 + C_{b_1}^2 U_{b_1}^2 + 2C_{b_0} C_{b_1} U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)} + C_{V_a}^2 U_{V_a}^2 + C_{V_f}^2 U_{V_f}^2 + C_{W_0}^2 U_{W_0}^2 + C_{V_e}^2 U_{V_e}^2$$

$$U_{C_x} = \sqrt{C_{A_x}^2 U_{A_x}^2 + C_{b_0}^2 U_{b_0}^2 + C_{b_1}^2 U_{b_1}^2 + 2C_{b_0} C_{b_1} U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)} + C_{V_a}^2 U_{V_a}^2 + C_{V_f}^2 U_{V_f}^2 + C_{W_0}^2 U_{W_0}^2 + C_{V_e}^2 U_{V_e}^2}$$

**Incertidumbre
Combinada**

$$Ue_{C_x} = 2U_{C_x}$$

Incertidumbre expandida



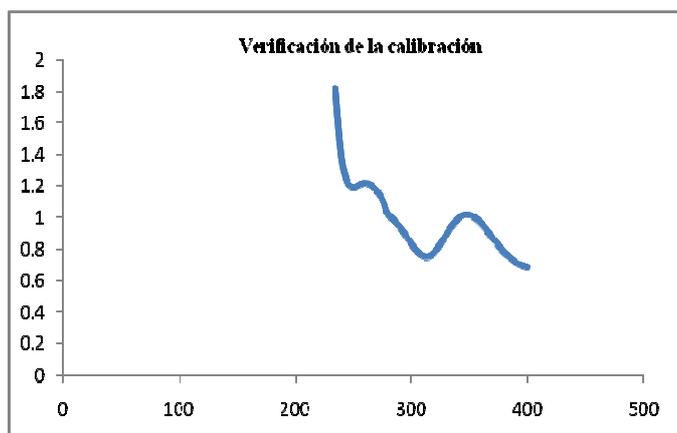
Exactitud Fotométrica

La exactitud Fotométrica se realizó con un estándar de Dicromato de Potasio en medio ácido a una concentración de 60 mg/L, para la verificación de la Calibración del Equipo espectrofotómetro realizando un barrido espectral de 200nm a 450nm.

La siguiente tabla muestra los datos de la longitud de onda máxima a la cual se verificó la Calibración del Equipo.

λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs
400	0.686	315	0.755
395	0.699	310	0.76
390	0.719	305	0.79
385	0.752	300	0.84
380	0.782	295	0.895
375	0.832	290	0.945
370	0.876	285	0.987
365	0.925	280	1.027
360	0.969	275	1.123
355	1.002	270	1.174
350	1.02	265	1.211
345	1.017	260	1.221
340	0.991	255	1.208
335	0.947	250	1.195
330	0.89	245	1.227
325	0.83	240	1.385
320	0.78	235	1.822

El siguiente gráfico muestra la longitud de onda a la cual se verificó la calibración del equipo. Hay buena exactitud fotométrica.

**Unidades**

$$C_x = (A_x \text{ mg/L} - b_0/b_1) \times (1\text{L}/1000\text{mL}) \times (V_e \text{ mL} \times V_f \text{ mL}/V_a \text{ mL}) \times (100 \text{ g}/P_m \text{ g} \times 2.2914)$$

$$\rightarrow (100/2.2914)/1000 = 0.04$$

Reordenando tenemos

$$C_x = ((A_x - b_0) \times V_e \times V_f \times 0.04 / b_1 \times V_a \times P_m)$$

$$C_x = (A_x - b_0 / b_1) \times (V_f / V_a) \times (V_e / W_0) \times (0.04)$$

$$C_x = A_x - b_0 \times V_e \times V_f \times 0.04 / b_1 \times V_a \times W_0$$

Valores

$$C_x = 0.355 - 0.044 \times 10 \times 10 \times 0.04 / 0.052 \times 4 \times 1$$

$$C_x = 5.97 \text{ mg/L}$$

$$LD = 3.29 \times 0.0011 / 0.052 = 0.068$$

$$LC = 10 \times 0.011 / 0.052 = 0.209$$

$$LC = [(0.068 \times V_e \times V_f \times 0.04) / V_a \times P_m] = 0.068 \text{ mg/L}$$

$$LD = [(0.209 \times V_e \times V_f \times 0.04) / V_a \times P_m] = 0.209 \text{ mg/L}$$

Sustituyendo los valores

$$LC = [(0.06 \times 10 \times 10 \times 0.04) / 4 \times 1] = 0.068 \text{ mg/L}$$

$$LD = [(0.209 \times 10 \times 10 \times 0.04) / 4 \times 1] = 0.209 \text{ mg/L}$$