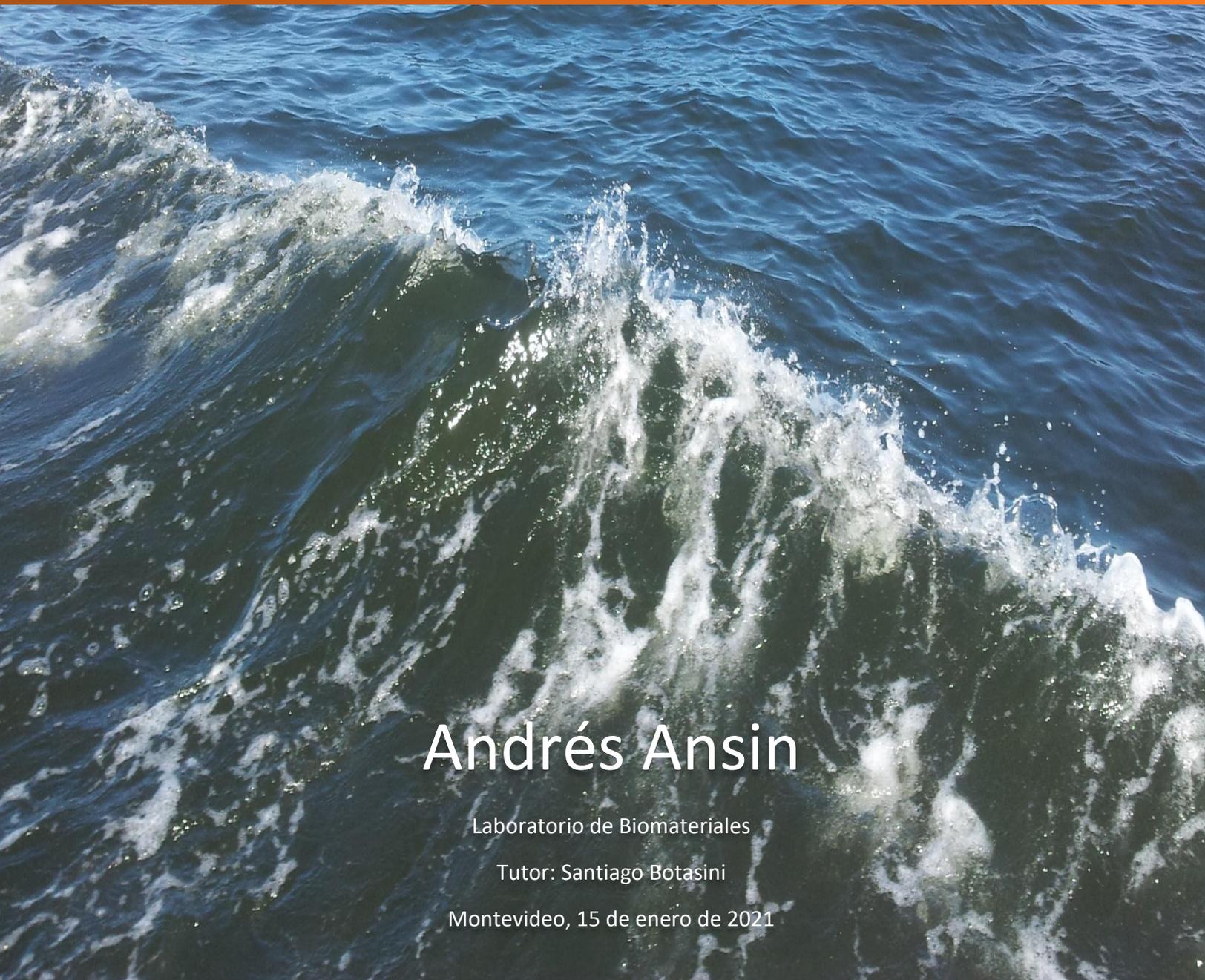




# Implementación de una técnica colorimétrica para la detección de fósforo en aguas empleando un teléfono celular



Andrés Ansin

Laboratorio de Biomateriales

Tutor: Santiago Botasini

Montevideo, 15 de enero de 2021



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



# Implementación de una técnica colorimétrica para la detección de fósforo en aguas empleando un teléfono celular

Tesina presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República por

**Andrés Ansin Rando**

En cumplimiento de los requerimientos para la obtención del título de Licenciado en  
Bioquímica.

Tutor de tesina: Dr. Santiago Botasini

Tesina realizada en el Laboratorio de Biomateriales, Instituto de Química Biológica, Facultad de  
Ciencias, Universidad de la República.

Montevideo, 15 de enero de 2021

“Mide lo que se pueda medir, y lo que no, hazlo medible”

Galileo Galilei<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Es una cita no literal de Galileo Galilei.

Andreas Kleinert (2009). “Der messende Luchs. Zwei verbreitete Fehler in der Galilei-Literatur. (The Measuring Lynx. Two Widespread Mistakes in the Galileo Literature),” *N.T.M. Zeitschrift für Geschichte der Wissenschaften, Technik und Medizin*, vol. 17, pp. 199–206

# Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto Alianza ANII-E.F.I.C.E. S.A. (ALI\_1\_2017\_1\_137101).

En especial se agradece el apoyo y la colaboración del Dr. Eduardo Méndez.

A mi tutor, por la innegable paciencia, confianza y dedicación.

A mis compañeros del Laboratorio de Biomateriales.

A mi madre, padre, hermana, familia y amigos. A Giselle por su constante apoyo.

A Stéphanie, por acompañarme en este recorrido y por todo lo demás.

Montevideo, 15 de enero de 2021.

## Resumen

La eutrofización del agua y el florecimiento asociado de cianobacterias es una de las problemáticas ambientales más preocupantes en Uruguay en los últimos años. Las pérdidas de ingresos relacionados al turismo y la pesca han tenido un fuerte impacto tanto económico como social para el país. Como nutriente esencial (y en muchos casos limitante) el fósforo es un buen indicador para evaluar el grado y riesgo de eutrofización en lagos y otros cursos de agua. Actualmente, los métodos utilizados para la medición de fósforo requieren de equipos costosos, de baja exactitud o no pueden ser implementados fácilmente en medidas *in situ*. Con el fin de abordar este problema, se diseñó un dispositivo colorimétrico y portable para medir la concentración de fósforo en lagos y ríos empleando un teléfono celular. Se incluye el diseño de la parte física y del *software* prototipo empleado para la toma de la imagen y su posterior procesamiento, además de la puesta a punto del protocolo de medida.

La base de esta metodología es el uso de la cámara del teléfono celular como colorímetro. Para esto, se plantea una medida del “porcentaje de azul” de la muestra, producto de la formación de un complejo entre el analito y el reactivo empleado para la cuantificación. La metodología aprovecha el espacio sRGB para el procesamiento de imágenes, permitiendo el seguimiento de un color en particular y mitigando ligeramente la variación en la medida causada por cambios en la iluminación. Gracias al reciclaje del *hardware* y *software* de un teléfono inteligente, se logra reducir en gran medida el costo de equipamiento necesario para las mediciones, al tiempo que se presenta como alternativa para medidas rápidas en campo.

La técnica es una adaptación colorimétrica de la técnica del “azul de molibdato”, una de las formas más usuales para llevar a cabo mediciones de fósforo. El dispositivo consta de una caja de acrílico a la que se adosa un teléfono celular y alinea la cámara con un tubo de vidrio en el que se coloca la muestra deseada junto a los reactivos que generan el cambio de color en presencia de fósforo. La caja mantiene una iluminación constante a partir de una LED y un difusor de luz incorporados, permitiendo tomar fotos de la muestra en las mismas condiciones de iluminación. Estas fotos son luego procesadas a partir de una aplicación instalada en el teléfono con el fin de determinar la concentración de fósforo basada en una curva de calibración predefinida y almacenada en la aplicación desarrollada.

# Contenido

Resumen	4
Introducción	8
Capítulo 1. Eutrofización	9
1.1. Eutrofización como problema ambiental	9
1.2. Eutrofización en aguas uruguayas	11
Capítulo 2. Sensores de fósforo	15
Capítulo 3. Reacción del azul de molibdato	20
Capítulo 4. Teoría del color	22
4.1. Generalidades	22
4.2. Aspectos biológicos	22
4.3. Percepción del color	24
4.4. Sistemas y espacios de color	25
4.4.1. Sistema CIE	28
4.4.2. Sistema RGB	29
4.4.3. Sistema HSL y HSV	31
4.4.4. Sistema CMYK	32
Capítulo 5. Colorimetría	33
Capítulo 6. Validación de técnicas analíticas	39
6.1. Propiedades de las técnicas analíticas	39
6.1.1. Precisión	39
6.1.2. Exactitud	39
6.1.3. Sesgo	39
6.1.4. Robustez	40
6.1.5. Repetitividad	40
6.1.6. Selectividad	40
6.1.7. Errores	40
6.1.8. Linealidad	41
6.2. Estándares y patrones	41
6.3. Curvas de calibración	42
6.4. Límites de detección, cuantificación y blanco	45
Desarrollo experimental	50

Capítulo 7. Objetivos	51
Capítulo 8. Medidas siguiendo el protocolo oficial de la DINAMA, por espectrofotometría UV-Vis	52
8.1. Materiales	52
8.1.1. Reactivos	52
8.1.2. Preparación de las soluciones <i>stock</i>	52
8.1.3. Instrumentación	52
8.2. Métodos	53
8.3. Resultados y discusión	53
Capítulo 9. Desarrollo del sensor colorimétrico	59
9.1. Materiales	59
9.1.1. Reactivos	59
9.1.2. Preparación de las soluciones <i>stock</i>	59
9.1.3. Construcción del colorímetro	59
9.1.5. Contenidos del <i>kit</i> para medidas de campo	63
9.2. Métodos	63
9.2.1. Calibración del dispositivo	63
9.2.2. Medición de fósforo en muestras incoloras	63
9.2.5. Limpieza del equipo	64
9.2.6. Ajustes de los parámetros del programa Open Camera	64
9.2.7. Determinación de parámetros de medida de color	66
9.3. Resultados y discusión	67
9.3.1. Determinación de la distancia focal óptima	70
9.3.2. Determinación de las coordenadas de los píxeles medidos	71
9.3.3. Necesidad de un difusor de luz	74
9.3.4. Determinación del modo de captura de imagen	74
9.3.5. Determinación los tubos de medición	77
9.3.6. Nivel de llenado del tubo de vidrio	78
9.3.7. Control del tiempo	79
9.3.8. Factores que afectan la linealidad de la técnica a bajas concentraciones	80
9.3.9. Tratamiento de muestras coloreadas	82
9.3.10. Límite de detección y cuantificación	85
9.3.11. Validación	89
9.3.12. Estabilidad del reactivo combinado	91

9.3.13. Limitantes de la técnica	92
10. Conclusiones y perspectivas futuras	93
11. Referencias	95
12. Anexo	106
12.1. Contenido de fósforo en gaseosas	106
12.2. Comparación de distintos algoritmos empleados en la adquisición de las imágenes	107
12.3. Cálculo del error estándar residual de la regresión lineal y comparación de los límites de detección y cuantificación por distintos métodos	108
12.4. Protocolo de cuantificación de fosforo mediante el método electroquímico	110
12.4.1. Reactivos	110
12.4.2. Materiales	110
12.4.3. Método	111
12.5. Código Java del programa prototipo para la determinación de fósforo	112

## Introducción

El **capítulo 1** comienza mostrando la problemática de la contaminación de diferentes cursos de agua con altos contenido de fósforo y como este es un factor clave en los procesos de eutrofización. Se destaca también la necesidad de contar con dispositivos portables que permitan hacer un ensayo *in situ* rápido como medida de control medioambiental.

En el **capítulo 2** se describen algunas de las principales metodologías empleadas para la cuantificación de fósforo mostrando las limitantes y las ventajas de cada una de ellas. Entre todas las técnicas mencionadas se destacan las medidas por UV-Vis basadas en la reacción del “azul de molibdeno”. Algunos detalles del mecanismo de reacción del “azul de molibdeno” se describen en el **capítulo 3**.

El **capítulo 4** aborda los aspectos claves de la teoría del color, haciéndose énfasis en explicar las diferencias entre las magnitudes físicas medibles y la percepción humana del color. Este capítulo es importante para entender el funcionamiento de los colorímetros, los cuales se emplean como instrumentos de medida de color y se describen en el **capítulo 5**.

El **capítulo 6** describe algunos conceptos básicos de química analítica a tener en cuenta a la hora de validar una nueva metodología. Se muestran diferentes formas de evaluar algunos de los principios básicos de esta disciplina como es el límite de detección, cuantificación, precisión, exactitud, robustez, entre otros.

Con el **capítulo 7** comienza el desarrollo experimental presentando el objetivo general. El **capítulo 8** muestra resultados de la verificación y adaptación del protocolo oficial, que servirá de validación de la técnica desarrollada. También se muestra el desarrollo del dispositivo para la detección de fósforo, las propiedades analíticas de la técnica, su validación y algunas limitaciones de la misma observadas a partir de los ensayos de validación internacional. En este capítulo se describe el diseño y las dificultades que se debieron atravesar en el desarrollo de la medida colorimétrica empleando celulares. Se muestran todas las etapas de forma sucesiva, finalizando con la validación del sensor.

Finalmente, en el **capítulo 9** se presentan las conclusiones, algunos comentarios finales sobre la técnica y las perspectivas futuras.

# Capítulo 1. Eutrofización

## 1.1. Eutrofización como problema ambiental

Junto con el nitrógeno, el fósforo es uno de los elementos esenciales para el desarrollo de los seres vivos (Duffy & Reagan, 2012). En cursos de agua, el fósforo puede encontrarse en una gran variedad de formas químicas, siendo los fosfatos los más abundantes (Greenberg et al., 1992). Estos últimos se encuentran en forma de ortofosfatos, formando parte de la matriz orgánica o como fosfatos condensados (Greenberg et al., 1992).

Pese a que el fósforo es un elemento necesario para el desarrollo de ecosistemas acuáticos saludables, su exceso se encuentra ligado a procesos de eutrofización<sup>2</sup> (D. W. Schindler, 1977). El excedente de uno o más nutrientes genera un crecimiento desmedido de algún tipo de organismo (floración), generalmente algas (David W. Schindler, 2006). Dependiendo de cuáles nutrientes se encuentren en exceso, estos serán quienes determinen qué especies tendrán un mayor crecimiento de su población (Anderson et al., 2002). No obstante, es importante aclarar que, más allá de la cantidad neta de nutrientes, la proporción entre ellos puede favorecer a algunos organismos sobre otros (Heisler et al., 2008). Factores como la luz, el pH y la temperatura también llevan a la eutrofización, pero la importancia de la contaminación por exceso de nutrientes —fósforo y nitrógeno en particular— no debe de ser subestimada (Scheffer et al., 1997).

Además de los desbalances ecosistémicos ocasionados por la floración de especies puntuales, existen múltiples problemas ambientales, económicos y de salud relacionados a este proceso. Un primer efecto de este crecimiento desmedido es el oscurecimiento del agua por el efecto físico de la concentración de microorganismos. Esto impide que la luz llegue al fondo del curso de agua, impidiendo la fotosíntesis. Asimismo, los organismos descomponedores aumentan su actividad metabólica, reduciendo todavía más el oxígeno disponible. Como resultado, el fondo del sistema acuático se torna anaeróbico, produciendo gases como anhídrido sulfuroso, dióxido de carbono y metano, los cuales son tóxicos para la mayoría de las especies que habitan ese ambiente. Este proceso culmina con una mortalidad masiva de especies, una reducción de la biodiversidad y una proliferación de organismos patogénicos (Anderson et al., 2002; De Jonge et al., 2002). A su vez, el proceso de eutrofización provoca también mal olor, afectando directamente diversas actividades humanas (Stadler et al., 2017).

---

<sup>2</sup> La eutrofización se define como la acumulación excesiva de nutrientes en el sistema acuático.

Entre los distintos organismos que proliferan con el aumento de fosfatos, encontramos poblaciones de cianobacterias que en su concentración habitual son inocuas para el ser humano, pero que pueden dejar de serlo luego de una floración indiscriminada. También podemos encontrar otro tipo de organismos como ciertas algas del género *Pseudo-nitzschia multiseries*, que producen ácido domoico como forma de defensa. En concentraciones suficientemente altas, esta sustancia tiene un efecto neurotóxico en aves, peces y mamíferos, incluyendo humanos. Adicionalmente, estos florecimientos generan mal olor, espuma en las playas y otros efectos que pueden afectar al hombre (Cochlan et al., 2008; De Jonge et al., 2002; Rao et al., 1988; RAPAL Uruguay, 2010) (Figura 1.1.).



**Figura 1.1.** Imagen de la "playa Mansa" de Punta del Este, uno de los principales centros turísticos del Uruguay, mostrando la presencia de colonias de cianobacterias. Adaptado de (Servisaberlo, 2017).

Pese a ser un proceso que ocurre naturalmente, la eutrofización se ve favorecida por la acción del ser humano (Heisler et al., 2008). Hoy en día se considera que su incremento es fundamentalmente

antropogénico, siendo uno de los problemas de calidad de agua más generalizados, cuya frecuencia se mantiene en aumento desde las últimas décadas (De Jonge et al., 2002; Van Dolah, 2000). Cuando se toma en cuenta que las poblaciones, a nivel mundial, suelen concentrarse en las regiones costeras y cercanas a cursos de agua, ocurre un efecto de doble intensificación del problema. Por un lado, el crecimiento de las ciudades y asentamientos fomenta la eutrofización a través del aumento en la carga de nutrientes. Por el otro, los daños a la salud y economía causados por este fenómeno son mayores en estas regiones, afectando entonces a más personas. Esto es observable en la ciudad de Washington (EEUU) donde el incremento de la población trajo consigo un aumento de la toxina paralizante secretada por el alga dinoflagelante en mariscos, lo que a su vez llevó a un aumento en los casos de intoxicación por consumo de frutos de mar contaminados (Trainer et al., 2003). En particular, los principales responsables de este fenómeno son la agroindustria, plantas de tratamiento de agua y desechos industriales (De Jonge et al., 2002). Otro ejemplo masivo ocurrió entre los años 1970 a 2000, donde la incidencia de marea roja en aguas costales Chinas mostró una clara correlación con las toneladas de fertilizantes utilizados (Anderson et al., 2002).

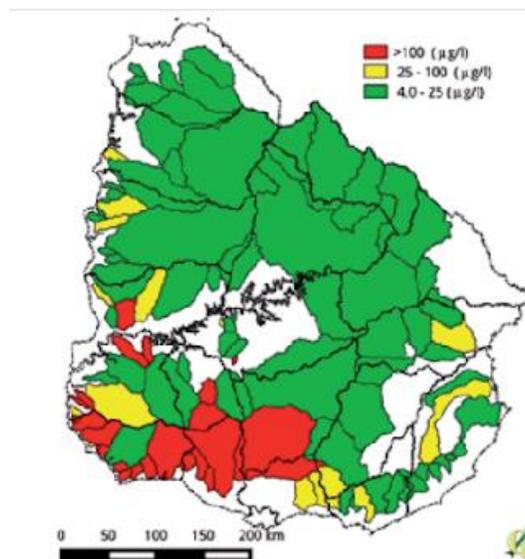
## **1.2. Eutrofización en aguas uruguayas**

Dada la importancia del agro y su cantidad de cursos fluviales, Uruguay no escapa a este problema ecológico. En 2015 se estimó que la totalidad de los cuerpos de agua en Uruguay presentan condiciones eutróficas, incluyendo cianobacterias capaces de producir toxinas que afectan la salud (Bonilla, 2009; Bonilla et al., 2015). Asimismo, los eventos de eutrofización por cianobacterias —popularmente llamados mareas verdes— son frecuentes en Uruguay, habiendo ganado particular notoriedad con la temporada de verano de 2019 (ElPais, 2019). Estos eventos tienen el potencial de repercutir fuertemente en la economía de los países afectados (Dodds et al., 2009). Dada la forma en que dañan las playas, el turismo es una de las industrias que más se ven afectadas. Se estima que durante el verano 2018-2019 la marea verde produjo una caída del 29% en el número de turistas (Observador, 2019). Otra industria afectada es la pesca, la cual reportó una disminución del 50% en la venta de pescado durante el mismo período (Subrayado, 2019). Además del turismo, la eutrofización de los ríos tiene graves consecuencias para la salud humana. Puesto que el río Santa Lucía es la principal fuente de agua potable en Uruguay, la frecuencia de florecimientos de cianobacterias con capacidad de producir citotoxinas en sus aguas resulta particularmente preocupante (Achkar et al., 2013; Olano et al., 2019).

Los dos mayores responsables de la eutrofización que da origen a estas mareas verdes en Uruguay son las industrias agrícola y ganadera, y la contaminación proveniente de centros urbanos (Aubriot et al., 2017;

Bonilla et al., 2015; Olano et al., 2019; Prensa UDELAR, 2020; RAPAL Uruguay, 2010; Rodríguez, 2016). En particular, estas industrias han visto una fuerte intensificación y expansión de sus actividades desde el inicio del siglo XXI (Failde et al., 2015). Dentro de estas actividades económicas, las floraciones observadas y las condiciones de eutrofización pueden ser estudiadas utilizando el fósforo total en el agua como modelo (Correll, 1998). En este caso, los fosfatos que ingresan en los cursos fluviales provendrían principalmente de fertilizantes, estiércol de ganado, detergentes industriales y residuos agrícolas (Rodríguez, 2016). Además del vertido directo, existen diversos mecanismos por los cuales los fosfatos pueden pasar del suelo a los ecosistemas acuáticos: arrastre por lluvias, desplazamientos de fosfatos adsorbidos a la fracción coloidal del suelo (desplazándose verticalmente), erosión de materiales y movimientos de los fosfatos en forma soluble (Rodríguez, 2016).

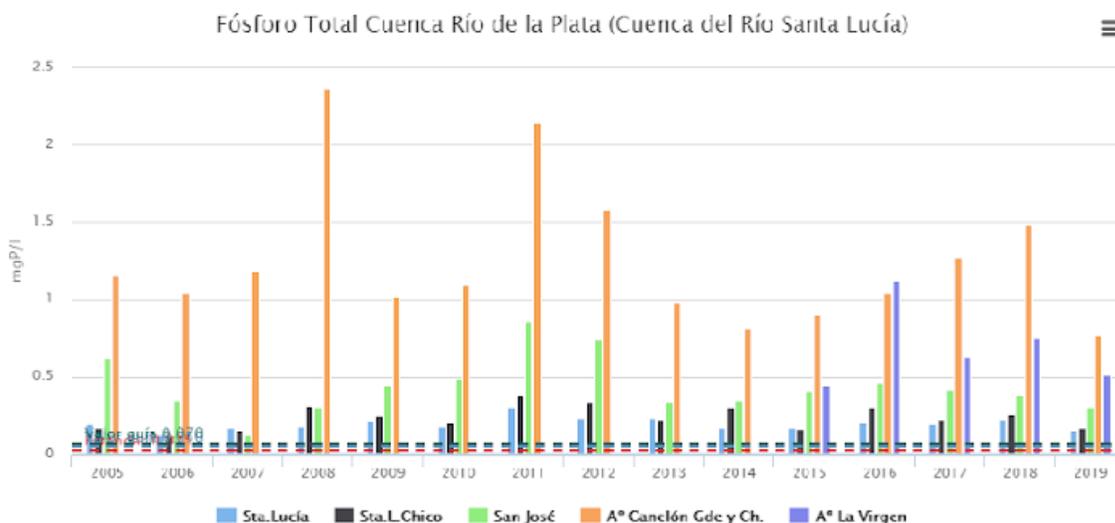
De acuerdo con los datos recabados por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), del año 2014, los niveles de fósforo de varias cuencas del suroeste presentaron niveles superiores a los  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , cuyo valor queda muy por encima de la reglamentación nacional vigente de  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 2) para ríos y  $5 \text{mg L}^{-1}$  para desagües industriales (Carrasco Leister et al., 2014). Estos resultados son altamente preocupantes, especialmente porque la zona de mayor concentración de fósforo atraviesa el río Santa Lucía, una de las principales reservas de agua dulce de nuestro país.



**Figura 1.2.** Estado de situación de la concentración de fósforo en el Uruguay. Adaptado de referencia Carrasco Leister (2014).

A raíz de estos relevamientos, en el año 2015 el Ministerio de Vivienda y Ordenamiento Territorial (MVOTMA) publicó una serie de once medidas para mitigar la contaminación del río Santa Lucía

(MVOTMA, 2015). Entre estas medidas se incluye la implementación de un programa sectorial de mejora del cumplimiento ambiental de vertimientos de origen doméstico que exige una reducción en los niveles de nitrógeno y fósforo, así como protocolos de fertilización en base al análisis de suelos, para alcanzar y mantener la concentración de fósforo por debajo de 31 ppm —31 mg L<sup>-1</sup>— de fósforo Bray y una concentración en aguas por debajo de 0,025 mg L<sup>-1</sup>, según el decreto Decreto 253/79. Sin embargo, pese a las recomendaciones y las medidas adoptadas, de acuerdo con el observatorio de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA)<sup>3</sup> a la fecha el problema no ha podido resolverse, encontrándose aún niveles de fósforo por encima del límite establecido (Figura 3) (DINAMA, 2019). Esta insuficiencia de las medidas fue también evidenciada ese año por la Intendencia Municipal de Montevideo (IMM) la cual encontró niveles de fósforo total superiores a los márgenes de seguridad establecidos en la totalidad de los sitios de muestreo de todos los cursos fluviales evaluados (Cacho, 2019).



**Figura 1.3.** Gráficas de fósforo total en diferentes secciones de la cuenca del río de la plata, adaptado de referencia (DINAMA, 2019).

Cuando el fenómeno de eutrofización tiene lugar las consecuencias pueden sentirse rápidamente, por lo que es necesario tener formas de remediación. Las más usuales consisten en la reducción de la carga de nutrientes a partir de su precipitación a formas no aprovechables por los organismos florecidos (Hamilton et al., 2009; T. Murphy et al., 1983). La técnica consiste en la introducción de minerales como la calcita a los ecosistemas eutrofizados, la cual precipita el fósforo y reduce la carga de fosfatos disponibles a los

<sup>3</sup> La Dirección Nacional de Medio Ambiente es una dependencia del Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. En Uruguay es el cuerpo que establece los protocolos estandarizados para medición de muestras ambientales, incluidas mediciones de fósforo.

microorganismos (Hamilton et al., 2009; T. Murphy et al., 1983). Este proceso reduce la carga de nutrientes, pero no hace nada para remediar las consecuencias de los cambios biológicos generados. Con este abordaje es que se han planteado otras técnicas como la biomanipulación de cadenas tróficas. El reemplazo de algunas especies de peces por otras, en forma controlada, ha dado mejores resultados que simplemente la precipitación de nutrientes, pero siguen sin constituir soluciones perfectas (Boers et al., 1991). La evidencia sugiere que, luego de un proceso de eutrofización, no es realista plantearse el retorno al estado previo (Duarte et al., 2009). Los cambios producidos por este proceso afectan al ecosistema a un nivel fundamental, modificando la composición de la microbiota y las cadenas tróficas (Duarte et al., 2009). Como resultado, luego de los intentos de remediación, el ecosistema puede volver a un estado aprovechable por el ser humano, pero probablemente nunca llegue a su estado previo. En resumen, es esencial poder actuar rápidamente o, mejor aún, impedir que el ambiente se torne eutrófico. En ambos casos, la herramienta primordial es la información sobre la carga de nutrientes en tiempo real y para eso el desarrollo e implementación de sensores de fósforo es una necesidad imperiosa.

## Capítulo 2. Sensores de fósforo

Tradicionalmente, los análisis de cuantificación de fósforo son realizados tomando muestras que luego se envían a los laboratorios. Este es un proceso que lleva tiempo, esfuerzo y es susceptible a contaminación o deterioro de la muestra. Si a esto se le suma que las concentraciones de nutrientes pueden tener grandes fluctuaciones en función de la flora y el ambiente microbiológico que habita en un determinado lugar, la información obtenida por esta metodología tradicional resulta simplemente insuficiente. En este sentido, la solución al problema se encuentra en los sensores autónomos que permitan mediciones a lo largo del tiempo o dispositivos portátiles, que faciliten la medida *in situ*, evitando los inconvenientes relacionados al tiempo de análisis, la toma de la muestra y su almacenamiento (Prien, 2007).

Dentro del ambiente acuático, el fósforo se encuentra bajo diferentes formas. Siendo un ácido, presenta distintos grados de protonación según el pH del medio, cuya forma más ácida se define como ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Los organismos biológicos emplean a estos fosfatos como nutrientes incorporándolos a un gran número de moléculas orgánicas de gran importancia en los sistemas vivos, siendo ejemplo de esto el ATP, la cadena de fosfatos del ADN y los fosfolípidos, entre otros. Entre las clasificaciones más comunes se encuentran el fósforo reactivo, que incluye los fosfatos disponibles como nutrientes y el fósforo total, que considera los ortofosfatos, las sales inorgánicas y el fósforo orgánico. Mientras que la primera medida es directa, la segunda requiere de una etapa de digestión para oxidar la materia orgánica y liberar el fósforo en forma de ortofosfatos (Greenberg et al., 1992). Esta generalmente consiste en una digestión ácida a altas temperaturas y presiones —pudiendo utilizarse un autoclave— que resulta viable para análisis en un laboratorio pero difícil de descentralizar para medidas de campo (EPA, 1978; Simone, 2017). Una segunda aproximación puede ser la medición de fósforo hidrolizable, que incluye las especies fosforadas de alto peso molecular y los fosfatos condensados<sup>4</sup> (Greenberg et al., 1992). Esta medida requiere de una digestión más simple, pero sigue siendo poco práctica para descentralizar (Greenberg et al., 1992). Tanto la medida de fosfato total como la de fosfato reactivo es empleada como parámetro de control de aguas (Bazzano, 2017; Broggi, 2017; De Nigris, 2017; Simone, 2017). Esta última, en particular, se correlaciona con los procesos de eutrofización (Ritchie et al., 1997), por lo que la medida de ortofosfatos es la más utilizada como indicador de calidad del agua y como elemento predictor de la eutrofización.

Independientemente de la fracción de fósforo de interés, un paso fundamental en el tratamiento de la muestra es el filtrado con un filtro de por lo menos  $0.2 \mu\text{m}$  (Greenberg et al., 1992). Esto elimina partículas

---

<sup>4</sup> Los fosfatos condensados incluyen todas las especies de fosfatos que contienen sales, minerales o metales. Esto incluye polifosfatos, metafosfatos y pirofosfatos (Greenberg et al., 1992).

que puedan interferir con las mediciones, además de las algas o bacterias presentes en la muestra<sup>5</sup>. La consideración de organismos consumidores de fósforo es imprescindible cuando la muestra no es medida en el momento, ya sea porque está siendo transportada a un laboratorio o porque se la va a almacenar para repetir mediciones. En caso de no ser eliminados, estos microorganismos mantendrán a corto plazo su consumo de fósforo, reduciendo la concentración de ortofosfatos. Sin embargo, si el almacenamiento de la muestra se extiende, puede producirse el efecto contrario debido a la muerte de estos microorganismos, lo que en algunos casos —como en el de las cianobacterias— implica una lisis celular. Como resultado, el fósforo acumulado comienza a liberarse, generando una sobrevaloración del fósforo reactivo. Esta es otra de las razones por las cuales se necesita de técnicas de análisis *in-situ* (Nausch et al., 2009).

La medición de fósforo requiere de métodos que involucren reacciones químicas para poder medirlo indirectamente (Duffy & Reagan, 2012). Algunos de estos métodos se describirán más adelante, pero antes de hacerlo es importante detenerse a reconocer el rol de las técnicas enzimáticas. Estas no reemplazan ninguna de las metodologías tradicionales, sino que pueden acoplarse a estas para mejorar los resultados o para adaptar la técnica a una problemática particular. Gracias a la capacidad de las fosfatasa de generar ortofosfatos a partir formas específicas de fósforo orgánico uno puede elucidar indirectamente cuáles son las especies de fósforo presentes. Dada la versatilidad de las enzimas disponibles estas metodologías han ganado prevalencia para la determinación de diferentes especies de fósforo en diversas matrices (Baykov et al., 1987; Buss & Stull, 1983; He & Honeycutt, 2005).

El uso de métodos electroquímicos para medición de fosfatos es un área de investigación prometedora, ya que tienen el potencial de aumentar en gran medida la velocidad de las mediciones (Duffy & Reagan, 2012). El desarrollo continuo de estas técnicas comenzó hace más de 70 años, construyendo las bases de la amplia gama de técnicas disponibles (Midgley, 1986).

Dada la inactividad de los fosfatos a la mayoría de los métodos electroquímicos, una de las primeras aproximaciones fue la medición indirecta a partir de complejos formados con el fósforo (Duffy & Reagan, 2012). Uno de los elementos más utilizados para formar estos complejos es el molibdato. La reducción del complejo de fosfomolibdato para la medición de fósforo ya era utilizado en técnicas colorimétricas, por lo que es natural que se partiera del mismo complejo para las aproximaciones electroquímicas (Fiske & Subbarow, 1925; Harden & Nonidez, 1984). Es posible entonces realizar voltamperometrías —ya sea

---

<sup>5</sup> La mayoría de las bacterias oscilan en el rango de 0.5 a 3  $\mu\text{m}$ , por lo que pese a que pueden haber bacterias de menor tamaño, el proceso de filtrado elimina la mayor parte de la carga bacteriana (Murray et al., 1998).

cíclicas o lineales— en las que se reduce y oxida esta especie, utilizando luego las corrientes generadas para cuantificar fosfatos a partir de una curva de calibración (Maeda et al., 1994). También se puede determinar concentraciones de fósforo a partir de amperometrías, o técnicas de pulso (Fogg et al., 1981), usando el mismo complejo (Harden & Nonidez, 1984). Una de las grandes ventajas de este conjunto de técnicas es que pueden acoplarse con un sistema FIA<sup>6</sup>, facilitando mucho el desarrollo de dispositivos automatizados para uso en campo (Fogg et al., 1981; Harden & Nonidez, 1984). Adicionalmente, algunos métodos electroquímicos presentan bajas interferencias por parte de los silicatos e iones de hierro que aparecen frecuentemente en cursos de agua. A bajas concentraciones de fósforo, los silicatos pueden presentar interferencias, pero es posible enmascararlos utilizando ácido oxálico (Song et al., 2016). Desafortunadamente, estos sensores son de un armado y mantenimiento más complejo.

Recientemente, una nueva ola de sensores electroquímicos ha aparecido, intentando superar las limitaciones de las metodologías previas. Entre estos se encuentra el desarrollo de electrodos sensibles al fósforo (Khaled et al., 2008). Estos sistemas son simples, no se ven afectados por la turbidez o color de la muestra, tienen precisión y exactitud apropiadas y permiten realizar medidas rápidamente. Sin embargo, históricamente han sido de difícil fabricación, poca vida útil y presentan dificultades para realizar mediciones en cursos de aguas (Khaled et al., 2008). El más famoso de estos sistemas es posiblemente el electrodo de cobalto, que consigue un buen rango lineal y una excelente sensibilidad, pero la interferencia de la materia orgánica lo descarta como un sensor para cursos de agua agrícolas o industriales (Ebuele et al., 2018).

Otra rama de investigación en la fabricación de sensores para fosfatos es el uso de fluorescencia. Son similares en muchos aspectos a los sensores de absorbancia, pero giran en torno a complejos de fluorescencia, *quantum dots*<sup>7</sup>, o nanopartículas que presenten fluorescencia (Duffy & Reagan, 2012). Este tipo de análisis se ha utilizado también en dispositivos automatizados gracias a que necesita poca cantidad de reactivo, permitiendo un mayor tiempo de medición antes de que sea necesario recargar los reactivos del sistema (Frank et al., 2006). Sin embargo, el uso de fluorescencia presenta algunos desafíos propios. Por un lado, los equipos suelen ser relativamente grandes, por lo que pueden atraer la curiosidad de la fauna local y ser susceptibles al vandalismo (Frank et al., 2006). Asimismo, el costo suele ser alto comparado con las técnicas basadas en absorbancia UV-visible (Barnett & Kahn, 1972). Existen algunos

---

<sup>6</sup> *Flow Injection Analysis* es un sistema en que se inyecta la muestra a un flujo portador antes de alcanzar un detector. Estos sistemas permiten miniaturizar y automatizar mediciones, siendo particularmente útiles cuando se tienen diferentes reactivos que no pueden mezclarse hasta llegar al momento de la medición (Xu et al., 2005).

<sup>7</sup> Estas son pequeñas partículas semiconductoras de algunos nanómetros de diámetro.

sensores que buscan resolver estos problemas, pero se encuentran con otros desafíos, como por ejemplo cortos rangos de funcionamiento que limitan su versatilidad (Kröckel et al., 2014).

Actualmente, los sensores basados en absorbancia UV-visible son los más utilizados para la detección de fósforo, especialmente en la fabricación de sensores de campo. Esto se debe al bajo costo en relación con los que utilizan fluorescencia o análisis electroquímico (Barnett & Kahn, 1972). Asimismo, el límite de detección es lo suficientemente bajo como para ofrecer resultados aceptables en la mayoría de las situaciones (Patey et al., 2008). A esto hay que sumarle que los sistemas pueden ser sumamente simples, tanto en los reactivos que utilizan como en los protocolos de medición, haciéndolos ideales para el análisis de rutina (Ma et al., 2014). Finalmente, es importante considerar que estos sensores han tenido extensas instancias de validación y mejoramiento de los protocolos de medida (Duffy & Reagan, 2012). Dados estos factores, no sorprende que las técnicas de absorbancia sigan siendo las más utilizadas. En efecto, la DINAMA plantea técnicas de absorbancia UV-visible como metodología oficial para la medición de fósforo en cursos de agua (Bazzano, 2017; De Nigris, 2017; Simone, 2017). Si bien se cuenta con una técnica oficial, esto no implica que el desarrollo de estas metodologías se haya detenido. Muchas variaciones y adaptaciones siguen en desarrollo. Una de las más prometedoras son la incorporación a dispositivos miniaturizados. Estos son sistemas de inyección que utilizan cantidades muy reducidas de reactivo para generar las reacciones necesarias a la medición *in situ* (Clinton-Bailey et al., 2017). Los límites de detección obtenidos son buenos, y el costo es relativamente bajo comparado a otros sistemas automatizados. No obstante, tienen problemas de interferencias, siguen siendo dependientes de la estabilidad de los reactivos y el costo (tanto inicial como de mantenimiento), aunque más bajo que otros sistemas automatizados, sigue siendo alto en comparación a sistemas dependientes de un operador.

Entre los métodos ópticos se destacan tres técnicas: la primera es la denominada “verde de malaquita”. Este es un método sumamente utilizado, entre otras aplicaciones, para la medición de actividad de enzimas que liberan fosfatos, como las fosfatasas (Bernal et al., 2005; Ekman & Jager, 1993; Feng et al., 2011). El “verde de malaquita” que da nombre a la técnica es un colorante verde que no se obtiene del mineral epónimo, sino que adquiere esta denominación por su similitud en color. Se basa en la formación de un complejo coloreado, al mezclar molibdato de amonio y fosforo inorgánico, cuya formación que puede medirse por absorbancia a 660 nm (Buss & Stull, 1983). La técnica es relativamente simple y puede muy fácilmente ser adaptada para su uso en placas de micro titulación, haciéndola atractiva para sistemas que requieran bajos volúmenes de trabajo (Ekman & Jager, 1993). Asimismo, el reactivo es estable por más de un año, facilitando su uso en campo. Sin embargo, tiene poca solubilidad, y precipita en medios

ligeramente ácidos, reduciendo mucho su reproducibilidad (Baykov et al., 1987). Pese a todas sus ventajas, el rango lineal de la técnica se obtiene a concentraciones bajas y presenta interferencias de sulfatos (Barberis et al., 1998). Asimismo, las fuertes interferencias de los cloruros de calcio, comunes en ríos, son un obstáculo considerable, lo que se ve empeorado por el hecho de que muchas sustancias absorben alrededor de los 660 nm. Finalmente, las medidas con esta técnica llevan alrededor de 2 horas, lo que la vuelve sumamente impráctica para ser descentralizada (Barberis et al., 1998).

La segunda técnica es la del “amarillo de vanadato”. En esta metodología se vuelve a utilizar el molibdato para acomplejar al fósforo, pero el complejo coloreado se forma con el agregado de vanadato<sup>8</sup> en medio ácido (Chapman et al., 1973). El resultado es un color amarillo cuya absorbancia se mide a 335 nm (Chapman et al., 1973). La técnica es muy utilizada dado que el reactivo es estable por más de un año y el color producido por la reacción permanece invariado por al menos dos semanas, brindando una gran flexibilidad en materia de transporte y almacenamiento (Baadenhuijsen et al., 1977; Chapman et al., 1973; Legiret et al., 2013). Desafortunadamente, la alta acidez requerida para la técnica la hace poco práctica para el tratamiento con muestras biológicas, por lo que el verde de malaquita suele usarse en estos casos (Ekman & Jager, 1993; Legiret et al., 2013). Asimismo, el color amarillo del complejo formado puede ser un problema para el trabajo con muestras de cursos de agua y desechos industriales dado que no es raro que la matriz ya tenga un tinte amarillento. Finalmente, es uno de los métodos ópticos menos sensibles, lo que lo hace inviable para muchas aplicaciones (Alvarado, 2010).

La última en esta familia de técnicas es la llamada “azul de molibdato”. Esta es una de las formas de medición de fósforo más antiguas, por lo que han surgido muchas variantes respecto al protocolo original. En todas sus formas, la detección de ortofosfatos se realiza acomplejándolos con molibdeno y luego reduciendo el complejo formado para dar una especie de color azul, cuya absorbancia suele medirse en el entorno de los 800 nm (Huang & Zhang, 2008). La reducción puede realizarse con una gran variedad de reactivos, todos con sus propias ventajas y limitaciones. Uno de los primeros fue SnCl<sub>2</sub>, que brinda la mayor sensibilidad, pero tiene rangos lineales acotados y puede dar resultados inconsistentes (Holman, 1943). Para estudios agrícolas se suele utilizar las variantes derivadas del método original del año 1962 desarrollado por Murphy y Riley (J. Murphy & Riley, 1962). Esta técnica emplea el ácido ascórbico como agente reductor, el cual se agrega al molibdato de amonio para formar complejos con los ortofosfatos revelando la presencia del analito. En este estado, la técnica puede hidrolizar parcialmente el fósforo

---

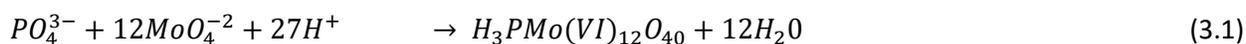
<sup>8</sup> El vanadato es un ion tetraédrico de fórmula VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

orgánico causando una ligera sobreestimación de la concentración de ortofosfatos (Haygarth & Sharpley, 2000). Con el fin de adaptar la técnica a problemáticas más específicas han surgido decenas de nuevas metodologías que modifican los protocolos originales, variando el pH de trabajo y/o agregando reactivos adicionales como el citrato-arsenato<sup>9</sup> (Dick & Tabatabai, 1977; He & Honeycutt, 2005) o el tartrato de antimonio y potasio<sup>10</sup> (Bazzano, 2017; De Nigris, 2017; Ma et al., 2014; Simone, 2017). No obstante, pese a todas las modificaciones la técnica aún presenta problemas como en la inestabilidad del color azul y la corta vida útil del ácido ascórbico en solución (Holman, 1943). Si bien la sensibilidad del método es inferior a otras técnicas, hoy en día, es la metodología oficial del Uruguay y varios otros países (Bazzano, 2017; De Nigris, 2017; Ma et al., 2014; Simone, 2017) por lo cual requiere una especial consideración. El siguiente capítulo se detallan algunos aspectos de la reacción química entre el molibdato de amonio y el fósforo, que da lugar a la técnica.

### Capítulo 3. Reacción del azul de molibdato

La reacción de formación del complejo coloreado de fosfomolibdato, ha sido la base de las técnicas colorimétricas oficiales para la detección y cuantificación del fósforo. Si bien con el correr de los años la metodología original sufrió varias modificaciones, paradójicamente el mecanismo de formación del complejo ha sido un gran motivo de debate dentro de la comunidad académica (Barrows et al., 1985; Clausen & Shroyer, 1948; Guanghai et al., 1999; Nagul et al., 2015; Woods & Mellon, 1941). Independientemente de la variante implementada, la técnica siempre contiene tres elementos principales: una fuente de molibdeno, Mo (IV), un agente reductor y un ácido fuerte (Baadenhuijsen et al., 1977; He & Honeycutt, 2005; Holman, 1943; Nagul et al., 2015).

De todas las propuestas sobre naturaleza química del proceso, la más reciente es la de (Nagul et al., 2015) que plantea las ecuaciones (3.1) y (3.2):



<sup>9</sup> El citrato-arseniato tiene la capacidad de formar complejos con el molibdato. Esto se utiliza para eliminar el molibdato excedente y de esa forma impedir que los fosfatos inorgánicos generados por hidrólisis luego de comenzada la medición causen una sobrevaloración de los fosfatos en la muestra.

<sup>10</sup> El tartrato de antimonio ha ganado particular prevalencia en las técnicas actuales gracias a su rol estabilizando el complejo coloreado formado por la reducción del fosfomolibdato por ácido ascórbico.

En esta ecuación, el  $H_3PMo(VI)_{12}O_{40}$  (ácido molifosfórico o 12-MPA) es de particular interés, ya que sería también la especie coloreada que revela la presencia de fósforo (Feng et al., 2011; Fogg et al., 1981; Legiret et al., 2013; Maeda et al., 1994). De todas formas, los autores reconocen que, en la práctica, la reacción produce una mezcla de productos reducidos que se evidencia en la gran variedad de máximos de absorción y coeficientes de extinción molar. Esta especiación tendría sus orígenes en los diferentes grados de protonación del molibdato y del proceso de reducción en sí. En otras palabras, distintas concentraciones de molibdato, de agente reductor y/o de pH puede dar lugar a productos diferentes, lo cual explica en parte por qué aún no se conoce en profundidad el mecanismo de reacción. (Nagul et al., 2015).

## Capítulo 4. Teoría del color

### 4.1. Generalidades

La colorimetría es una técnica muy utilizada en química para medir la concentración de componentes coloreados. De forma similar a las técnicas de absorbancia, el color es producido por la absorción y reflexión de la luz que atraviesa la muestra. No obstante, las técnicas de absorbancia se limitan a la medición de luz asociada a una longitud de onda —o de un rango muy acotado de éstas— mientras que las colorimétricas observan el color resultante en la forma en que el ojo humano lo percibe. En otras palabras, la colorimetría requiere utilizar la totalidad de la región visible de los espectros para construir un color y no puede aplicarse con unas pocas longitudes de onda (Ohta & Robertson, 2006).

### 4.2. Aspectos biológicos

El ser humano no determina colores a partir de longitudes de onda singulares, sino que lo hace a partir de la activación combinada de tres tipos de fotorreceptores presentes en los conos<sup>11</sup>. Cada tipo de cono posee un fotorreceptor diferente que actúa a nivel celular cuando es irradiado por fotones de ciertas longitudes de ondas. Estas longitudes de onda pueden superponerse ligeramente entre dos receptores diferentes, pero es posible simplificarlo y plantear que cada uno reacciona dentro del rango de un color determinado: rojo, verde y azul. Como resultado, los colores percibidos no son más que la interpretación que nuestro cerebro hace de las diferentes combinaciones de intensidades que estimulan estos tres tipos de células. Es importante notar la complejidad de este procesamiento que incluye fenómenos como la inhibición lateral<sup>12</sup>. La temperatura de la luz con la que se iluminan los objetos, la cercanía de otros objetos y la opacidad de la imagen, son todos factores que contribuyen a la determinación del color percibido. (Bear et al., 2016; Kandel et al., 2000; Witzel & Gegenfurtner, 2018).

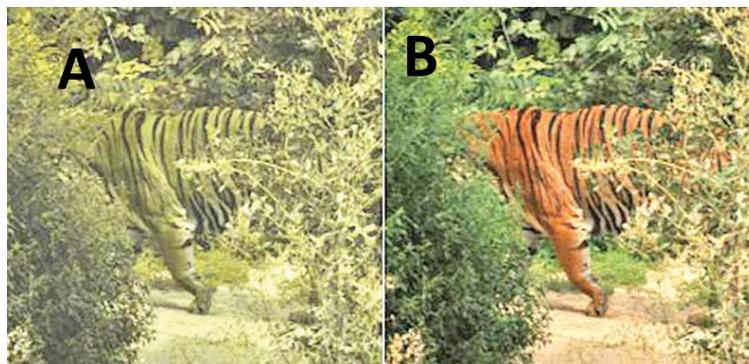
Finalmente es necesario mencionar el rol de la especie, así como de la variabilidad genética dentro de la misma. Hasta ahora se ha hablado de tres conos que perciben rojo, azul y amarillo; sin embargo, esto es específico para seres humanos. Otros animales pueden tener diferentes tipos y número de conos causando que su visión sea completamente diferente (Figura 4.1. y 4.2.). Un caso particularmente notorio son algunas serpientes capaces de percibir luz infrarroja, invisible para los seres humanos. Por otro lado, el

---

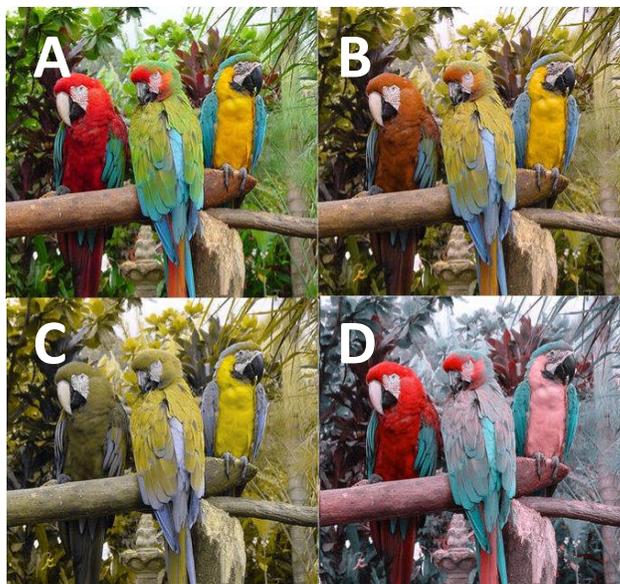
<sup>11</sup> Células sensoriales de la retina que poseen pigmentos capaces de detectar fotones dentro de ciertas longitudes de ondas, ocasionando una hiperpolarización de membrana y transduciendo el estímulo para que sea interpretado luego por las áreas correspondientes del cerebro. Los bastones son un tipo de célula homóloga pero no distinguen color, por lo que asisten en la visión en blanco y negro, especialmente a baja luminosidad. (Bear et al., s. f.)

<sup>12</sup> Fenómeno en que la excitación de una célula sensorial inhibe las células sensoriales adyacentes, amplificando la percepción de contraste al modificar la forma en que los fotorreceptores perciben los estímulos (Kandel et al., 2000).

camarón mantis posee 12 conos diferentes, capaces de percibir desde el ultravioleta lejano al infrarrojo, lo que podría implicar una teoría del color basada en reglas completamente diferentes a las nuestras. Sin embargo, no hace falta mirar otras especies para encontrar diferentes formas de visión. En humanos existen varios tipos de daltonismo diferentes, estas condiciones están causadas por mutaciones en uno o más conos, lo que suele resultar en una percepción alterada de los colores, no pudiendo distinguir algunos de ellos. En los casos más leves, uno solo de los conos se ve afectado manteniendo una visión típica para los colores que dependan de los otros dos conos. Sin embargo, la familia de afecciones categorizadas como daltonismo es grande y contiene muchas variaciones, cada una con su propia forma de percibir el color (Cronin & Marshall, 1989; Newman & Hartline, 1982; Sharpe et al., 1999).



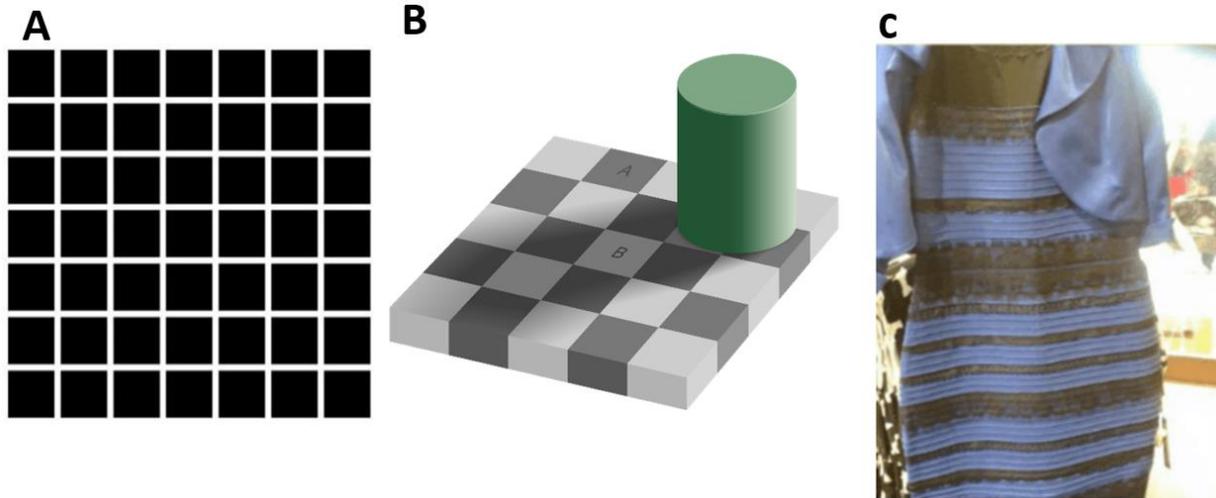
**Figura 4.1.** **A:** fotografía de un tigre con filtro que emula la visión de un cévido; **B:** fotografía original. Imagen adaptada de (Daily News, 2019).



**Figura 4.2.** Misma imagen modificada por filtros que emula la percepción por personas con diferentes tipos de daltonismo. **A:** visión normal, **B:** mutación o ausencia de conos que captan luz verde (deuteranopsia), **C:** mutación o ausencia de conos que captan luz roja (protanopia), **D:** mutación o ausencia de conos que captan luz azul (tritanopia). Imagen adaptada de (Giedrė Vaičiulaitytė, 2017).

### 4.3. Percepción del color

Además de la complejidad del sistema sensorial, siempre que se hable de color es necesario hacer énfasis en el carácter subjetivo del mismo. El color no es una propiedad física que un objeto posee, sino que es una construcción mental generada para interpretar los estímulos visuales. Esto implica que distintos individuos pueden percibir el mismo color ante un estímulo visual diferente o percibir colores diferentes ante un mismo estímulo visual (Gegenfurtner et al., 2015) (Figura 4.3). Asimismo, es posible que haya también factores culturales que afecten la percepción de los objetos observados. Un ejemplo se daría con la observación de bananas. Dado que se suelen asociar con el amarillo, es posible que, al observar una variedad roja, el recuerdo de la banana como amarilla altere el color percibido, para que se adapte mejor a las expectativas del observador (Granzier & Gegenfurtner, 2012; Hansen & Gegenfurtner, 2006). De forma similar, las categorías en que el lenguaje clasifica colores pueden tener repercusiones a nivel de la percepción de los mismos (Athanasopoulos et al., 2010; Hardy et al., 2005; Roberson et al., 2009). Finalmente, si a esto se le suma la variabilidad genética entre personas con ligeras modificaciones en los fotorreceptores, la identificación de colores se torna sumamente difícil de universalizar.



**Figura 4.3.** Ilusiones ópticas fisiológicas y cognitivas. **A:** los puntos oscuros en las intersecciones no existen, son producto de la inhibición lateral de las células fotorreceptoras, **B:** los casilleros marcados A y B tienen el mismo color, pero este se modifica durante el procesamiento de la imagen para que sea consistente con las claves contextuales del cilindro y la sombra, **C:** imagen que causó conmoción en 2015, dado que dependiendo de la luminosidad de la imagen y factores individuales el vestido puede verse como azul y negro, o blanco y dorado. Imágenes adaptadas de (Grupo Altavista Lab & Trend, 2015; harrysgoldbootsyndrome, 2015; Toledo, 2018).

#### 4.4. Sistemas y espacios de color

Cercano al 1660, Newton plantea que los colores observados en un arcoíris no son más que una descomposición de la luz blanca. Esta descomposición era también fácil de reproducir gracias al uso de prismas de cristal, y empleando dos de ellos en sucesión era incluso posible aislar cada uno de los colores. Este fue el primer paso en el planteamiento del llamado color espectral, una categorización que asocia un color a un rango de longitudes de onda, explicitado en la Tabla 4.1. Esta forma de ver el color es útil pero completamente insuficiente, dado que no se observan longitudes de ondas discretas, sino espectros que resultan en colores sin una longitud de onda asociada, con varios espectros posibles. (Newton, 1952).

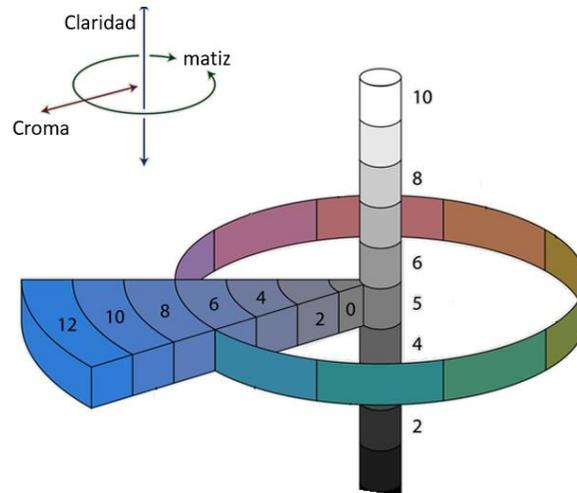
**Tabla 4.1.** Colores espectrales con sus respectivos rangos de longitud de onda (Lynch et al., 2001).

Color percibido	Rango de longitudes de onda (nm)
violeta	380 - 435
azul	435 - 500
cian	500 - 520
verde	520 - 565
amarillo	565 - 590
naranja	590 - 625
rojo	625 - 740

Incluso antes de que Newton publicara su obra sobre la óptica, la necesidad de resolver la ambigüedad causada por la inconsistencia en la percepción del color había llevado a la creación de varios sistemas de color. En muchos de ellos se distinguen dos categorías de colores básicos. Los primarios serían los que no pueden obtenerse como mezclas de otros, mientras que los secundarios son producto de la mezcla de colores primarios. Los terciarios serían entonces todos los demás colores, siendo posibles de obtener por combinaciones de los anteriores. El sistema griego, por ejemplo, usaba como primarios el ocre, azul, verde y rojo, representando los 4 elementos: tierra, cielo, agua y fuego, pero no tenía necesariamente las mismas clasificaciones que el idioma español, por lo que un observador hoy en día no utilizaría los mismos nombres para referir a esos colores. El sistema más tradicional hoy en día en el mundo occidental es el que plantea al amarillo, rojo y azul como colores primarios y es el precursor del sistema CMYK que será descrito más adelante en este capítulo. Sin embargo, todos estos sistemas parten de la percepción visual, sin pasar realmente por un modelo físico, por lo que no logran eliminar completamente la ambigüedad causada por la subjetividad del color (Berlin & Kay, 1991; Caivano & López, 2009).

Uno de los primeros y más notorios intentos de agregar un modelo físico es el sistema de color de Munsell. Su nombre se debe al pintor norteamericano Alberto Munsell, quien lo diseñó con el fin de crear una definición sistemática de los colores para su uso en pintura. Se lo puede considerar un precursor de los espacios de color modernos dado que utilizaba tres propiedades para definir el color: matiz, intensidad del color (croma) y claridad del color (Figura 4.4). Estos parámetros fueron obtenidos a través de rigurosas mediciones en humanos que aportaron al sistema un carácter científico que lo hizo ser adoptado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos. La precisión del modelo era tal, que el artista creó varias esferas pintadas con colores de diferente matiz, pero igual claridad e intensidad, que al ser puestas a girar lograban fusionarse en una escalas de grises. El trabajo de Munsell ha sido de gran influencia, pero fue

progresivamente reemplazado por los sistemas de categorización modernos (Kuehni, 2002; Landa & Fairchild, 2005; Nikerson, 1946)(Kuehni, 2002; Landa & Fairchild, 2005; Nikerson, 1946).



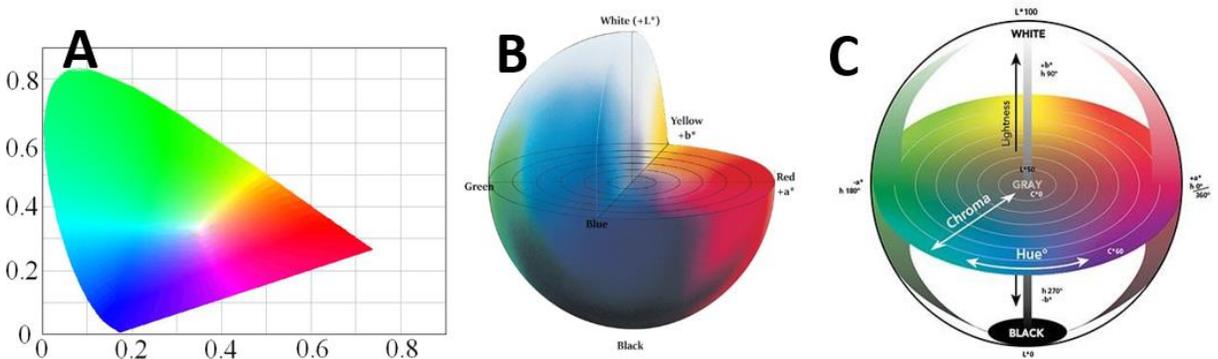
**Figura 4.4.** Representación gráfica del sistema de color de Munsell. Adaptado de referencia (Molinari, 2011).

El problema de la determinación sistemática de los colores termina de ser resuelto con las metodologías que parten de la información en un espectro visible y la condensan en un color resultante. Dado que esta conversión se realiza de forma matemática, la percepción visual no juega un rol en la medición (Delgado-González et al., 2018). Según la organización internacional para la estandarización (ISO), los espectros de partida deben de ser de transmitancia en caso de utilizar muestras líquidas y de reflectancia para las sólidas (ISO, 2019). Existen muchas formas de generar esta condensación, pero a la hora de codificarla, la mayoría de los espectros utilizan los denominados espacios de color. Estos son modelos matemáticos donde cada color es representado como un punto definido por coordenadas espaciales. Para crearlo es necesario partir de un modelo de color que describa cada uno como una combinación de lineal de parámetros. Existen muchos modelos de color diferentes y en esto se hará foco en las secciones siguientes. Sin embargo, es necesario señalar que un modelo de color en el abstracto no es suficiente por sí solo, es necesario añadir una función de mapeo entre el modelo y un espacio de color de referencia. Informalmente se suele referir como espacio de color al modelo de color, ya que ambos tienen utilidad práctica solo cuando están asociados: al identificar el espacio de color, su modelo asociado queda implícito. De cualquier manera, hay que ser precavidos a la hora de utilizar los términos de forma intercambiable, no solo porque es incorrecto sino porque pueden existir varios espacios de color basados

en el mismo modelo. Trabajar con espacios de color trae consigo muchas ventajas. La primera es que elimina la ambigüedad inherente al lenguaje y la percepción de color. Es posible que dos observadores tengan nombres diferentes para el mismo punto, pero mientras utilicen las coordenadas sabrán que trabajan con el mismo color. La segunda es que, al ser espacios matemáticos, es posible realizar conversiones de unos a otros, haciendo más práctico el trabajo sin perder información en el proceso. Finalmente, los espacios de color permiten traducir los colores a un formato numérico con el que computadoras y dispositivos digitales pueden operar (Plataniotis & Venetsanopoulos, 2000).

#### 4.4.1. Sistema CIE

Los sistemas CIE (*International Commission on Illumination*) son la base de la mayoría de los espacios de color utilizados. El primero de estos fue CIE XYZ, en 1931, y es el precursor de todos los otros sistemas colorimétricos CIE. Para definir un color, CIE XYZ lo representa como un punto en un espacio tridimensional (Figura 4.5). Estas coordenadas permiten estandarizar colores, pero no son demasiado intuitivas ya que no es posible hacerse una idea del color representado simplemente observando las coordenadas (Schanda, 2007). Es importante notar que CIE XYZ, así como sus sistemas derivados, son llamados sistemas de color aditivos. Esto implica que se parte de la ausencia de luz de cualquier longitud de onda y cada coordenada agrega color de su respectiva componente, sumando así todos ellos para obtener el color final (Stone, 2016). De esta conceptualización del color surgen los primarios aditivos: rojo, verde y azul (Stone, 2016).



**Figura 4.5.** Representación gráfica de los espacios de color CIE XYZ (A), CIE L\*a\*b\* (B) y CIE L\*C\*H\* (C), adaptadas respectivamente de Ding et al. (2013), Konica Minolta (2018) y X-Rite PANTONE® (2018).

En 1976 se desarrolla el sistema CIE L\*a\*b\*, el cual retoma las bases matemáticas de CIE XYZ pero aplica una conversión a las coordenadas de forma que el espacio se defina a través de L\*, a\* y b\*. Donde L\*

representa la luminosidad del color,  $a^*$  que el eje rojo-verde y  $b^*$  el eje azul-amarillo<sup>13</sup> (Schanda, 2007). En 2008 este sistema fue adoptado como estándar internacional (ISO, 2008). En el mismo año se presenta también el modelo CIE  $L^*C^*H^*$ , que retoma CIE  $L^*a^*b^*$  pero lo pasa del sistema cartesiano a un sistema de coordenadas polares. Como resultado,  $L$  permanece inmutable, pero surgen dos nuevos parámetros que reemplazan a  $a^*$  y  $b^*$ . Estos son  $C^*$  (croma) que va de 0 a 100, representando la intensidad del color y  $H$  (*hue* o matiz) que va de 0 a 360 y es el principal parámetro en la determinación del nombre adjudicado al color (Schanda, 2007).

#### 4.4.2. Sistema RGB

Finalmente, en la segunda mitad del siglo XIX surge el modelo RGB (Schanda, 2007). Las letras corresponden a *Red* (rojo), *Green* (verde) y *Blue* (azul) lo cual corresponde a su vez con los colores asociados a las longitudes de absorción máximas en los pigmentos de los fotorreceptores humanos. La escala por lo general va de 0 a 1 para cada uno de los colores, con 1 representando el máximo posible de contribución de ese color. La luminosidad no está representada directamente, sino que surge de la contribución total de los tres parámetros. Como ejemplo, un valor de 0 en todos los parámetros correspondería a un negro, mientras que un 1 sería un blanco. (Delgado-González et al., 2018; Schanda, 2007).

El modelo RGB merece particular atención ya que es el modelo más utilizado a la hora de definir y tratar el color a nivel informático. En el pasaje a la codificación digital, el espectro que da origen al color pasa a un segundo plano y se reduce a un número que condensa ese color. A nivel informático, la información es tratada como si fuera un punto  $a$  en un espacio tridimensional, lo que le confiere algunas propiedades interesantes. En primer lugar, la diagonal principal del cubo es una línea que va de negro (0, 0, 0) a blanco (1, 1, 1), ya que cantidades iguales de los rojos, azul y verde dan tonalidades de gris. Estas tonalidades de grises se logran mediante la suma lineal de las coordenadas que definen un determinado color con las coordenadas del valor más pequeño del rojo, verde o azul que definían a ese color (Tabla 4.2). Finalmente, las esquinas son los colores primarios y secundarios. Cabe destacar que matemáticamente, nada impide

---

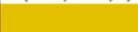
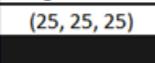
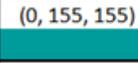
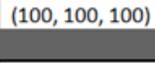
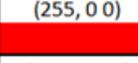
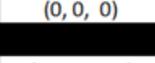
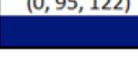
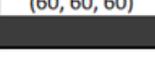
<sup>13</sup>  $L^*$  es una escala de 0 a 100 donde 0 es negro y 100 es blanco. Sin embargo,  $a^*$  y  $b^*$  pueden adquirir valores positivos (indicando tonos más rojos o amarillos respectivamente) así como negativos (indicando tonos más verdes y azules respectivamente).

la existencia de colores ficticios, por lo que es siempre necesario establecer un límite a esta escala (Stone, 2016).

En la mayoría de los dispositivos electrónicos, la imagen se compone de varios puntos, llamados píxeles. Cada píxel es codificado con coordenadas en un espacio RGB para generar el color correspondiente al punto de la imagen. Dado que hoy en día los píxeles suelen ser representados como valores de 8 bits, la escala utilizada va de 0 a 255 en lugar de 0 a 1, avanzando de forma discreta de  $a$  enteros. No obstante, es necesario agregar un último factor antes de terminar de definir la escalada de color RGB utilizada: la percepción de la luminosidad del ser humano. De forma similar al oído, la percepción de la intensidad de luz y el incremento de dicha intensidad no son lineales. Por tanto, para que el color en la pantalla pueda percibirse como un continuo lineal es necesario hacer que la variación entre intervalos de intensidad tampoco sea lineal. Dada la complejidad de la percepción, no existe una forma de uniformizar todas las escalas para que actúen acorde al ojo humano. Desde que la “Comisión Electrotécnica Internacional” lo propuso como el espacio por defecto (International Electrotechnical Commission, 1999; Stone, 2016), el *Standard RGB* (sRGB) define el espacio de color no lineal más utilizado. Las escalas no lineales tienen el problema de requerir algunos pasos extra para poder ser convertidas a CIE XYZ (lo que es necesario para muchas operaciones) pero la facilidad de uso y el carácter intuitivo del sistema tienen más peso que la complejización de cálculos, ya que estos pueden ser fácilmente automatizados.

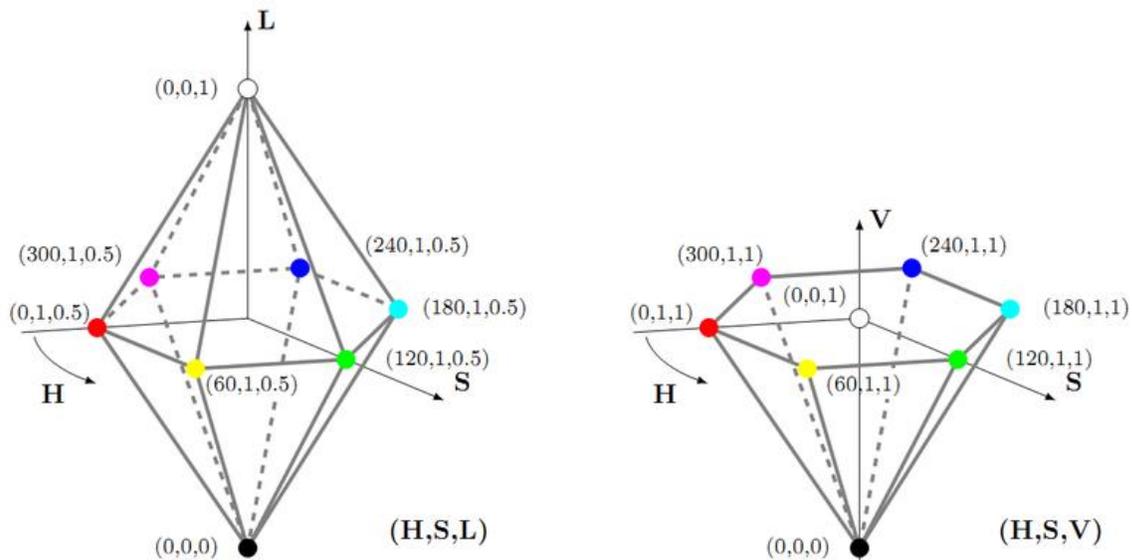
Si se nombra el sistema RGB es necesario mencionar el sistema hexadecimal (Tabla 4.2). Este sistema toma las coordenadas del modelo RGB y las escribe como un solo número de seis cifras en formato hexadecimal de 0 a F. Las dos primeras cifras representan la coordenada roja, la tercera y cuarta representan la verde y la quinta y sexta la azul. Este es el formato en que se suele escribir los colores en muchos lenguajes de programación incluidos HTML y CSS por lo que su uso es muy frecuente en informática. Es importante aclarar que el sistema hexadecimal asume un marco informático por lo que la conversión solo tiene sentido si el modelo RGB de partida está en una escala de 0 a 255. Siguiendo la misma lógica, el negro pasa de ser (0; 0; 0) a 000000 pero el blanco pasa de ser (255; 255; 255) a ser FFFFFFFF (Carey, 2009).

**Tabla 4.2.** Ejemplos de conversiones de color de hexadecimal a RGB y su descomposición en un matiz y un gris.

color de base	hexadecimal	RGB	matiz RGB	gris RGB
	FCD919	(252, 217, 25)	 (227, 192, 0)	 (25, 25, 25)
	64FFFF	(100, 255, 255)	 (0, 155, 155)	 (100, 100, 100)
	FF0000	(255, 0, 0)	 (255, 0 0)	 (0, 0, 0)
	59FFBC	(60, 255, 188)	 (0, 95, 122)	 (60, 60, 60)

#### 4.4.3. Sistema HSL y HSV

Tanto los modelos HSV (*Hue Saturation Lighthness*) como HSL (*Hue Saturation Value*) fueron generaron en la década del 70 con el fin de adaptar el modelo RGB para que estuviese más alineado con la forma en que el ser humano percibe el color. En particular, se buscaba que el modelo tuviese en cuenta la forma de mezclado de tipo sustractiva de los colores (más intuitiva dado el uso de pigmentos con que las personas están familiarizadas). Asimismo, dado que derivan del RGB, las conversiones a HSL y HSV son sumamente rápidas, lo que los hace útil para ciertos procesamientos informáticos. La primera coordenada de ambos sistemas es el matiz o *hue*, que da cuenta de la categoría del color y se representa como un ángulo alrededor del eje vertical. La segunda también es compartida y puede interpretarse como la contribución de blanco o negro al color final y se representa como la distancia perpendicular al eje vertical (yendo de 0 a 0.5 en HSL y de 0 a 1 en HSV). Finalmente, tenemos la última coordenada que es la que distingue a ambos sistemas. En HSV, esta última es el valor o *value* que se correlaciona con la oscuridad o claridad del color y se representa a lo largo del eje vertical yendo de 0 a 1 (Figura 4.6.). En HSL, la luminosidad o *lighthness* representa el qué tan lejos se encuentra el color del blanco o el negro y también se grafica a lo largo del eje vertical. Los conceptos de valor y luminosidad son similares, sin embargo, el valor es parecido a la adición de pigmentos mientras que la luminosidad lo es para las adiciones de luces (Milligan et al., 1992; Myers, 1979; Stone, 2016).



**Figura 4.6.** Representación gráfica de los espacios de color producidos a partir de los modelos de color HSL (izquierda) y HSL (derecha). Imagen adaptada de Zalud & Horak (2012)

#### 4.4.4. Sistema CMYK

El pasaje de una secuencia de puntos en un espacio RGB a una imagen visible puede realizarse de muchas formas en función del dispositivo en cuestión. No obstante, es importante separar la imagen proyectada en una pantalla de la que se imprimiría en un objeto físico como una hoja de papel. Esto se debe a que a la hora de realizar impresiones es necesario realizar otra conversión de sistemas de colores, esta vez a CMYK. A diferencia de CIE, CMYK es un sistema sustractivo. Esto significa que se parte de la luz blanca como base y luego se aplican filtros que remueven longitudes de onda hasta formar el espectro del color deseado. En el caso de CMYK, estos filtros corresponden con los pigmentos cian (C), magenta (M), amarillo (Y) y negro o *key* (K). Nótese como estos (sin contar el negro) son los colores primarios de los sistemas sustractivos, de forma análoga al RGB para los aditivos. CMYK también puede verse como una forma de representar los colores como un espacio de coordenadas, pero con cuatro valores que representan la cantidad de tinta de cada tipo que debe agregarse para que el espectro resultante sea el deseado. Pese a que la teoría matemática detrás de CMYK es similar a la de RGB, este último suele utilizarse para condensar una combinación de luces en un solo color mientras que CMYK suele utilizarse para descomponer un color en una combinación de pigmentos. Otro aspecto esencial a tener en cuenta es que a diferencia de los sistemas aditivos, (0, 0, 0, 0) representaría blanco, no negro (Sharma & Bala, 2017).

## Capítulo 5. Colorimetría

Es imposible hablar de la colorimetría como técnica sin contrastarla con la espectrofotometría. Ambas son técnicas que se basan en las propiedades ópticas de la muestra y sus aplicaciones pueden superponerse en algunas ocasiones. Los equipos colorimétricos tienen la ventaja de ser más pequeños (Bustos López et al., 2013) y por lo tanto son útiles para el análisis descentralizado. Sin embargo, en general, los equipos espectrofotométricos comerciales suelen tener una mayor precisión y exactitud, aunque en contrapartida esta ventaja viene acompañada de un aumento en el costo del equipo (Dartnall, 1953). Antes de poder hablar de los equipos colorimétricos es necesario entender lo que los separa de cualquier cámara fotográfica. Se dice que un equipo es colorimétrico si cumple con la condición de Luther, planteada por el astrónomo Robert Luther en 1927. La condición busca que los equipos utilizados logren reproducir adecuadamente el comportamiento del ojo humano. Por tanto, la condición de Luther se cumple si la curva de sensibilidad espectral<sup>14</sup> difiere únicamente en un factor ( $k$ ) de la pseudo-curva de sensibilidad espectral generada a partir de los filtros y receptores utilizados en un aparato. El factor  $k$  puede ser cualquier valor siempre y cuando este sea constante. Pese a ser conceptualmente idénticas desde un punto de vista físico, se hace una distinción entre las curvas y pseudo-curvas de sensibilidad ya que la primera refiere específicamente a la del ojo humano y la segunda a los intentos de emularla por medio de dispositivos artificiales (Dartnall, 1953).

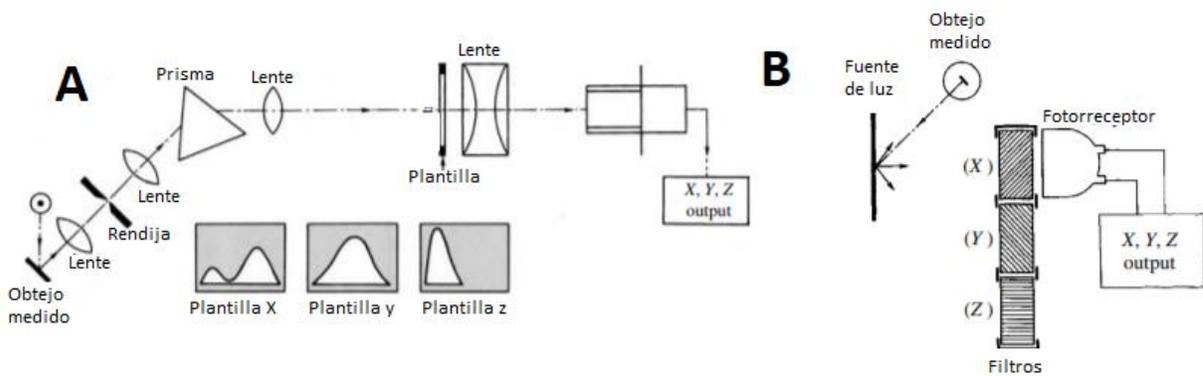
Actualmente existen tres tipos de colorímetros, categorizados según su funcionamiento. El primero son los de medida directa de tri-estímulo. Estos emulan el funcionamiento del ojo humano, calculando el color a partir de la señal producida por tres receptores cuyo pico se da a las mismas longitudes que los fotorreceptores en los conos (capítulo 4.2). Estos valores son luego utilizados para generar una salida compuesta de un set de coordenadas en un espacio de color a partir de un modelo predeterminado en el equipo (Hunter, 1942; Ohta & Robertson, 2006). Este tipo de colorímetro utiliza una de dos estrategias para cumplir con la condición de Luther. La primera es el uso de filtros ya sea en arreglos en serie o en paralelo. Estos permiten eliminar las longitudes de onda a las que el foto-receptor emulado es menos sensible, modificando entonces la luz que llega al receptor en lugar de cambiar directamente la sensibilidad de los receptores. Este es el sistema más utilizado gracias a que permite un buen compromiso entre costo y cumplimiento de la condición de Luther, además de ser sumamente simples de utilizar. En

---

<sup>14</sup> Es la curva de eficiencia en la detección de longitudes de onda específica en los pigmentos de los fotorreceptores de una especie. Diferentes especies tiene diferentes pigmentos, por lo que cada una tiene su propia curva de sensibilidad espectral. Dado el contexto en este trabajo, cuando no se hace referencia a un animal específico se está refiriendo a la curva correspondiente al ser humano (Dartnall, 1953).

general es necesario algunos cálculos adicionales para poder transformar la salida a coordenadas en un sistema CIE, sin embargo, esto no es un problema es dispositivos digitales que pueden trivializar el proceso.

La segunda estrategia es a través de plantillas (Figura 5.1.). En ella, se utiliza un prisma para separar las componentes de la luz que ingresa al dispositivo y luego se usan rendijas prediseñadas para permitir solamente el pasaje de aquellas longitudes de onda que correspondan con las coordenadas  $x$ ,  $y$ ,  $z$  del tri-estímulo. Estas rejillas bidimensionales dan forma al estímulo lumínico antes de llegar al receptor, por lo que se las suelen denominar plantillas. Cada plantilla corresponde a una coordenada del tri-estímulo y solamente se puede utilizar una a la vez. La medición directa resultante permite generar una salida en un sistema CIE sin cálculos intermedios. Estos sistemas son conceptualmente simples, pero la dificultad y costo de construirlos los hace muy poco populares en la práctica (Ohta & Robertson, 2006).



**Figura 5.1.** Sistema de plantillas (A) y filtros (B) en colorímetros de medida de tri-estímulo. Figura adaptada de Ohta & Robertson (2006).

Los sistemas de colorimetría espectral son la tercera familia de colorímetros. Estos funcionan de forma muy similar a los espectrofotómetros, utilizando un prisma y un monocromador para dividir la luz incidente en longitudes de ondas discretas —o en rangos cortos de longitudes de onda—. Esto permite generar un espectro de luz que puede, a partir de una serie de cálculos matemáticos, transformarse en un valor tri-estímulo que cumpla con la condición de Luther. Dada la similitud de su funcionamiento, existen espectrofotómetros que a la vez actúan de colorímetros, denominados espectrocolorímetros. Los espectralradiómetros constituyen un ejemplo de estos, los cuales además miden la irradiancia o el resplandor de una muestra. Al igual que su contraparte puramente espectroscópica, estos equipos trabajan con tipos específicos de muestra, ya sean líquidos o sólidos (Ohta & Robertson, 2006).

Es necesario tener especial cuidado cuando se trabaja con muestras fluorescentes, como pueden ser algunas señales de tránsito y chalecos reflectivos. Cuando estos materiales reciben luz de ciertas longitudes de onda, la absorben mediante la excitación de ciertos electrones, los cuales al regresar a su estado basal emiten luz a otra longitud de onda distinta de la absorbida. La luz emitida, sin embargo, es siempre de menor energía —por tanto, de mayor longitud de onda— que la recibida ya que en el proceso parte de esa energía se pierde en forma de calor. Como resultado, llegará más de una longitud de onda al receptor del colorímetro. Con el fin de resolver esto se debe tener especial cuidado no solo a la geometría de la iluminación, sino que también a la fuente de luz utilizada. Los equipos capaces de estas medidas tienen un diseño similar al de los fluorímetros, con un monocromador antes y después de la muestra, para poder determinar la componente del color que se debe a la fluorescencia para corregir la medida (Chorro et al., 2016; Ohta & Robertson, 2006).

El principal uso industrial de las técnicas colorimétricas es en la determinación del grado de maduración en frutos de consumo humano (García de Souza et al., 2012; Lado et al., 2012; Zaccari et al., 2017). Para realizar estas medidas se suelen utilizar colorímetros portátiles como el Minolta CR-200B o CR-400 (Alicia et al., 2014; Lado et al., 2012; Zaccari et al., 2017), que son dispositivos de pequeño tamaño y autonomía variable. Utilizan un sistema tri-estímulo basado en filtros que luego se traducen al sistema CIE, —la mayoría puede realizar las conversiones entre los espacios de color de los diferentes modelos CIE— asistido a través de *software* que permiten la rápida medición de umbrales, comparaciones con estándares u otras funciones programables. Su costo es muy reducido comparado a un equipo espectrofotométrico tradicional, pero sigue siendo considerable. Esto es especialmente cierto para medidas especializadas que requieran accesorios y software puntuales. Asimismo, estos equipos tienen el problema de ser específicos para sólidos, por lo que no pueden utilizarse para la medición de muestras líquidas (Konica Minolta, 2020).

Otro sistema colorimétrico de uso común son los teléfonos celulares. De forma similar que los colorímetros portátiles, los celulares utilizan filtros en sistemas tri-estímulo para captar y determinar el color a la hora de tomar las fotos. No obstante, a diferencia de ellos están optimizados para que los colores de salida sean apropiados para su fácil visualización en una pantalla y no necesariamente se adapten a la percepción del ser humano. Por esta razón la mayoría de estas cámaras no cumplen con la condición de Luther, no pudiendo entonces considerarse sistemas colorimétricos en el sentido más estricto. Pese a esto, las ventajas de trabajar con teléfonos celulares son demasiado grandes como para ser ignoradas.

En el pasado, el mayor obstáculo para las colorimetrías en base a teléfonos celulares era la obtención de imágenes de suficiente calidad. Sin embargo, hoy en día incluso los celulares de menor gama tienen

cámaras apropiadas (Nixon et al., 2019). La ubicuidad de los *smartphones* hace que los costos de implementar estos sistemas disminuyan drásticamente (El Observador, 2019). Asimismo, los teléfonos inteligentes ya poseen la capacidad de realizar cálculos complejos, incluidas las conversiones a coordenadas de modelos CIE que se realizan por defecto. Esto hace posible generar aplicaciones que utilicen al mismo teléfono para el tratamiento de datos, reduciendo la necesidad de equipamiento costoso. Asimismo, su tamaño los hace fácilmente transportables y al utilizar una cámara son ideales para medidas donde no haya contacto con las muestras.

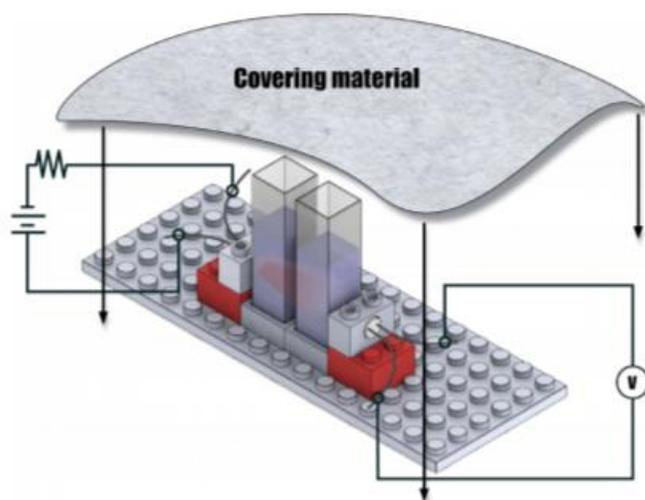
Pese a todas las ventajas, es importante tener en cuenta las limitaciones que los teléfonos celulares traen consigo. La variedad de filtros, software de procesamiento, lentes y ajustes de blancos, son algunos de los parámetros o variables a considerar, que presentan estas cámaras digitales. En función de para qué se haya optimizado la cámara, diferentes dispositivos pueden dar resultados distintos ante un mismo estímulo. Eso genera una necesidad de calibrar todas las técnicas, no solo al modelo, sino al celular específico que se está utilizando. Para técnicas donde se requiere gran precisión y exactitud esto es una limitante para la universalización, ya que las aplicaciones generadas no pueden ser descargadas y utilizadas sin una calibración previa. Otro problema es la variación de la luz ambiental. Tener luz de fondo diferente puede afectar considerablemente la medida. Existen formas de contrarrestar esto mediante el procesamiento de imágenes con y sin *flash*. Sin embargo, generar una iluminación constante a través de algún dispositivo externo suele ser la forma más consistente de asegurarse que la luz ambiente no interfiera con la medida (Nixon et al., 2019).

En 2015, se publicó una metodología para la medición de fosfatos en muestras de suelo utilizando la cámara de un teléfono celular a modo de colorímetro (Moonrungssee et al., 2015). El sensor no es completamente descentralizado ya que las muestras requerían un procesamiento relativamente largo que incluía el secado de la tierra al aire libre, así como su molido hasta alcanzar 2 mm de tamaño de partícula. Si a esto se le agregan los pasos de filtrado y tratamiento químico, la técnica perdía practicidad en su uso como sensor *in situ*. El método incorporaba también una caja cerrada con iluminación constante y una ventana por la cual se tomaba la foto. El procesamiento incluye la generación de curvas de calibración a partir de la suma de los canales RGB. Desafortunadamente, las curvas debían ser generadas para cada medida, por lo que el sensor dejaba de ser apropiado como técnica descentralizada para trabajo en campo.

Desde entonces otros autores también han explorado el uso de *smartphones* como sensores colorimétricos de fósforo, cada uno con sus capacidades y limitantes (Asheim et al., 2014; Hosker, 2018;

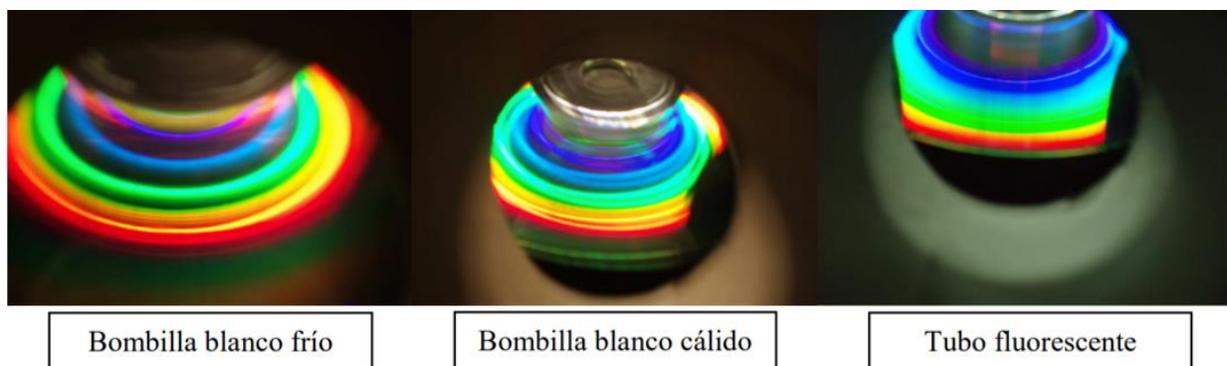
Kiliç et al., 2018; Kuntzleman & Jacobson, 2016; Nixon et al., 2019). Similarmente a las técnicas espectrofotométricas oficiales, la reacción más utilizada es la del “azul de molibdeno”. El color de la reacción es seguido a partir de la suma de los valores RGB obtenidos directamente del software de procesamiento de imágenes o a partir de otros algoritmos. En todos los casos, se encontraron dificultades para obtener una robustez suficiente como para un sensor *in situ* que pueda utilizarse por personal no capacitado. Entre ellos, los efectos de la luz ambiente, el punto focal de la cámara y el índice de reflexión del medio son los que presentan más incidencia sobre los resultados observados (Kiliç et al., 2018; Moonrungssee et al., 2015).

Las ventajas de utilizar teléfonos celulares no son exclusivas de la colorimetría. También existen antecedentes del uso de estos dispositivos en técnicas espectrofotométricas. Una forma de lograrlo es a partir de la construcción de un espectrofotómetro que incorpora el teléfono celular como receptor fotónico. Los primeros modelos generaban una caja a partir de algún material sólido —siendo los LEGO® una opción muy popular (Figura 5.2.)— y utilizaban lámparas LED de longitudes de onda discretas. Estos modelos tenían un muy bajo costo, pero la disponibilidad de las LEDs con las longitudes de onda necesarias limitaba considerablemente las reacciones que podían seguirse a partir de esta metodología. Dado que el objetivo de estos diseños era la reducción de costos a nivel de educación secundaria, esta desventaja era fácilmente superable eligiendo las reacciones a estudiar. Asimismo, la capacidad de medir directamente a una longitud de onda simplifica muchísimo el procesamiento de datos necesario con respecto a un análisis colorimétrico con el celular (Knagge & Raftery, 2002; Yeh & Tseng, 2006).



**Figura 5.2.** Esquema de un colorímetro basado en LEGO® obtenido de Asheim et al. (2014).

Fuera del marco educativo, el encontrar LEDs que se adapten a las necesidades específicas de un proyecto vuelve esta técnica obsoleta en la mayoría de sus aplicaciones. Por esta razón es que se generó una segunda ronda de sistemas que buscaban resolver este problema. Los aparatos resultantes eran una versión algo simplificada de los espectrofotómetros de uso en laboratorios. Estos consisten en una fuente de luz blanca cuyas emisiones son dirigidas a partir de un lente hacia una muestra en una cubeta de plástico transparente. Luego de atravesar la muestra, la luz atraviesa un difractor—comúnmente compuesta de la parte transparente de un disco compacto o CD— y luego es detectada directamente por la cámara de un celular (Figura 5.3.). El espectro obtenido es luego analizado a partir de un software diseñado con este fin. Pese a la necesidad de un software de procesamiento de datos, estos modelos mantienen muy bajos costos y presentan muy buenos resultados. De todas formas, su construcción es compleja y delicada y el procesamiento de datos puede llegar a ser algo engorroso de realizar *in situ* (Hosker, 2018; Taha et al., 2017).



**Figura 5.3.** Espectros obtenidos utilizando la parte transparente de un CD como difractor en espectrómetros caseros, para diferentes fuentes lumínicas; imágenes adaptadas de (Lagos, 2015).

Finalmente, es posible generar dispositivos de complejidad intermedia a partir del uso de filtros. Para ello simplemente se colocan filtros entre una fuente de luz blanca y la muestra para eliminar las longitudes de onda no deseadas. El resultado es equivalente a utilizar una luz monocromática. No obstante, obtener filtros para las longitudes de onda deseada puede ser un problema y la fabricación propia de estos filtros trae otras dificultades asociadas. Asimismo, la utilización de filtros no suele dar luz monocromática pura, sino dentro de un rango que —dependiendo del experimento— puede interferir con los resultados. Pese a estos problemas, el costo de estos equipos sigue siendo bajo, se elimina la limitación asociada a obtener LEDs monocromáticas y no requiere de *software* de procesamiento de imágenes complicados (Kuntzleman & Jacobson, 2016).

## Capítulo 6. Validación de técnicas analíticas

### 6.1. Propiedades de las técnicas analíticas

Uno de los aspectos importantes en la formulación de una metodología analítica es su validación. Para esto es necesario definir algunos conceptos propios de la química analítica, necesarios para la implementación de todo sensor, así como también para entender las limitaciones de la técnica desarrollada y su comparación con otras metodologías alternativas.

#### 6.1.1. Precisión

La precisión refiere al grado de coincidencia entre las medidas reportadas de una misma muestra y se relaciona fuertemente con el error aleatorio implícito en la medida, sin tomar en cuenta errores sistemáticos. Para cuantificarla se utilizan medidas estadísticas de dispersión poblacionales aplicadas a las medidas de una misma muestra. Las más populares de estas son la desviación estándar (SD) y la desviación estándar relativa (RSD)<sup>15</sup>. La primera es útil para tener una idea de la variabilidad de las medidas en el contexto de la medición mientras que la segunda es útil para comparar la precisión de diferentes metodologías (Wisconsin Department of Natural Resources, 1996). Una forma de aplicar este método es encontrando el intervalo en donde nuevos datos tendrían una probabilidad del 95% de aparecer. Este rango queda definido por el valor medio de la medida y  $\pm 2$  veces su SD.

#### 6.1.2. Exactitud

La exactitud refiere a la cercanía de un valor reportado con respecto al valor real. Se suele reportar como un porcentaje de recuperación, calculado como:  $\%_{recuperación} = \frac{(\square_{reportado} * 100)}{\square_{considerado\ real}}$ . La concentración real suele obtenerse a partir de un estándar de concentración conocida, o comparando los resultados de la técnica evaluada con los de una técnica distinta que ya haya sido validada previamente (Irving et al., 2017; Wisconsin Department of Natural Resources, 1996).

#### 6.1.3. Sesgo

Pese a que se suele confundir con el concepto de exactitud, el sesgo refiere a la diferencia entre el promedio de los valores medidos y el valor “real”. Al considerar los promedios, los errores sistemáticos pasan a ser incorporados, por lo que conocer el sesgo global de la técnica permite agregar correcciones

---

<sup>15</sup>  $SD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$  y  $RSD = \frac{SD}{\bar{x}}$ , N es el tamaño de la población,  $\bar{x}$  es el promedio del conjunto de datos y  $x_1, \dots, x_N$  es el conjunto de datos que conforman la población.

al resultado final, mejorando la exactitud de las medidas individuales (College of Natural Resources, University of Idaho, 2009).

#### **6.1.4. Robustez**

La robustez refiere a la capacidad de una técnica de dar resultados consistentes bajo distintas condiciones. Es un indicador de la fiabilidad de la técnica en condiciones de uso normales. No hay un parámetro específico que pueda ser calculado para determinar la robustez de la técnica, pero es posible obtener una estimación repitiendo el experimento en la misma muestra alterando deliberadamente las condiciones. Algunos ejemplos de estas condiciones son el operador, la temperatura, el día o la humedad (Castillo Aguilar & González Hernández, 1996).

#### **6.1.5. Repetitividad**

Complementando la robustez, la repetitividad de una técnica refiere a la capacidad de obtener resultados consistentes en iguales condiciones. Una técnica con buena repetitividad debería brindar los mismos valores si se mide la misma muestra por el mismo operador en el mismo equipo.

#### **6.1.6. Selectividad**

La selectividad es la capacidad de la técnica de dar una señal analítica para un solo analito. Existen dos formas de poner a prueba la selectividad de un método. La primera es el ensayo de interferencia, en que se generan muestras con diferentes sustancias potencialmente detectables y se compara la señal analítica obtenida contra muestras conteniendo solamente el analito de interés. La segunda consta en la medición de muestras complejas con muchos interferentes distintos y cantidades conocidas de analito. Este procedimiento se asemeja más a las condiciones reales a las que se enfrentará la técnica, sin embargo, las discrepancias en valores medidos no pueden explicarse directamente sin estudios secundarios. (Castillo Aguilar & González Hernández, 1996).

#### **6.1.7. Errores**

Otros conceptos importantes son los errores de tipo I y tipo II. El primero de estos ocurre cuando se descarta una hipótesis nula verdadera y es referido coloquialmente como falso positivo. En química analítica estos suelen tomar la forma de la detección de un analito que no se encuentra en la muestra. En el análisis estadístico el  $p$ -valor refiere a la probabilidad de cometer este tipo de error. Esto es importante porque testar la validez estadística de un análisis no da certezas absolutas de que no se está cometiendo este tipo de error, simplemente da una indicación de la probabilidad con la que se puede estar cometiendo (la que puede aproximarse, pero nunca alcanzar 0). El único momento en que uno puede estar

completamente seguro de que no está cometiendo un falso positivo es cuando hay una alta probabilidad de que los resultados se deban a errores de muestreo y por tanto reporte un resultado negativo (Rubin, 2009).

El error de tipo II es el error opuesto al de tipo I, es cuando no se rechaza una hipótesis nula falsa. También llamado falso negativo, este error suele corresponder a no reportar la presencia de analito en una muestra que lo contiene. Estos errores suelen verse amplificadas cuando los muestreos son pequeños (Rubin, 2009).

Ambos tipos de errores pueden reducirse al incrementar el número de repeticiones (o aumentar el tamaño de la muestra), sin embargo, el diseño experimental debe considerar cuál de los dos errores conlleva consecuencias más graves para hacer énfasis en él. En estudios ambientales, por ejemplo, no reportar un contaminante puede resultar nefasto a largo plazo mientras que un falso positivo no cuesta más que algunas horas de trabajo y el costo de análisis. En estos casos, aumentar la sensibilidad de la técnica, arriesgándose a que el ruido se confunda con una respuesta positiva puede llegar a ser sensato. Cada situación tiene diferentes requerimientos por lo que la técnica ideal tendrá un balance de robustez, errores de tipo I y errores de tipo II (Rubin, 2009).

#### **6.1.8. Linealidad**

Cuando se busca cuantificar, independientemente de la técnica, se suele utilizar una curva de calibración (ya sea explícita o implícita). Estas curvas de calibración no son más que representaciones gráficas de un modelo que relacionan la concentración del analito de interés con una respuesta analítica específica para la técnica utilizada. Este modelo no necesariamente debe de ser lineal, pero es deseable que lo sea por la facilidad en el cálculo, tanto de la concentración de la muestra como de sus errores. (Dosal & Villanueva, 2008).

#### **6.2. Estándares y patrones**

Para la asignación de los parámetros es necesario la realización de mediciones de muestras con diferentes concentraciones conocidas de analito. Se requiere entonces de una sustancia de concentración conocida denominada estándar o patrón. Sin embargo, no todos los estándares son de igual calidad. Siempre que sea posible deben usarse los llamados patrones primarios. Estos son los patrones de mayor fiabilidad y son sustancias de composición conocida, elevada pureza, alta estabilidad a temperatura ambiente, que puedan ser secados en estufa, no absorben gases, tienen en general un alto peso molecular y rápida reacción con titulantes y producidas por laboratorios certificados que garantizan la trazabilidad de la

medida. Cuando se trabaja con matrices más complejas o sustancias inusuales se deben utilizar patrones certificados que incluyan, además de una concentración conocida del analito, la matriz en donde éste se encuentra. Desafortunadamente, estos dos tipos de patrones son caros y no siempre fáciles de obtener. En situaciones donde no sea posibles utilizar patrones primarios o certificados debe recurrirse a patrones secundarios. Estos son productos cuya concentración es determinada cuidadosamente por el propio laboratorio, generalmente a partir de un patrón primario (Galano & Rojas, 2017).

### 6.3. Curvas de calibración

Una vez que se tienen las soluciones estándar existen dos formas de preparar la curva de calibración, la más usual es a partir de los llamados estándares externos. Cuando se trabaja con estándares externos, los puntos a partir de los que se construye la curva de calibración son obtenidos de soluciones preparadas *de novo*. Como regla general se necesitan al menos cinco puntos para que la curva de calibración sea lo suficientemente robusta. Estas soluciones se utilizarán entonces para la calibración y cuando se midan muestras, estas se interpolarán en la línea de mejor ajuste generada.

Dado que se suele priorizar el modelo lineal, se suele ajustar las curvas obtenidas en la región de trabajo a una recta. Este proceso se lleva a cabo por el método de mínimos cuadrados<sup>16</sup> para determinar la recta de mejor ajuste  $y = ax + b$ . Este algoritmo es sumamente poderoso, sin embargo, es susceptible a errores causados por valores anómalos. Ya sea por un error de muestreo o por cuestiones ambientales, puede ser difícil determinar si un dato es realmente por una falla experimental o si simplemente es producto del error aleatorio. Una forma de hacerlo es a partir del parámetro llamado residuo estándar, calculado a partir de la distancia vertical entre un punto determinado empíricamente y el punto correspondiente de la línea de mejor ajuste específico como:

$$r_i = \frac{y_i}{S_i} \quad (6.1)$$

donde  $S_i$  es la varianza generada para cada uno de los  $i$ -ésimos puntos de la curva de calibración,  $y_i$  es la distancia de cada punto a la recta de mejor ajuste y  $r_i$  es el residuo estándar para cada uno de los puntos

---

<sup>16</sup> El método de mínimos cuadrados es una técnica de optimización matemática que busca minimizar el cuadrado de la distancia vertical entre los valores empíricos obtenidos y los puntos equivalentes de la curva generada. Esta es la forma en la que la mayoría de los programas de procesamiento de datos generan curvas por defecto (Abdi, 2003; Morrison, 1960)

medidos. Se suele comenzar a considerar que un residuo es anormalmente alto cuando su residuo estándar tiene un valor absoluto superior a 1.5 (Torre, 2007).

Dado el modelo utilizado, es necesario asegurarse que uno esté trabajando en el rango lineal de la técnica. Esto es importante porque ninguna técnica analítica es lineal en todos los rangos de trabajo posibles. Una forma rápida verificar la recta obtenida es a partir de coeficiente de determinación<sup>17</sup> ( $r^2$ ). Si los puntos se encuentran perfectamente alineados el valor de  $r$  será de 1. En la práctica, generalmente, se utiliza 0.99 como umbral para determinar una buena relación lineal; sin embargo, este valor puede ser un poco más bajo dependiendo de la variabilidad de la técnica y el criterio adoptado por el investigador. Otra forma de verificar que uno trabaja en un rango en que el modelo lineal se ajusta a los datos es a partir de un análisis de residuos. Si la aproximación lineal es válida, los residuos a lo largo de todo el rango serán similares y estarán distribuidos aleatoriamente en positivos y negativos. Finalmente, es posible realizar una prueba de linealidad que divida la varianza en dos componentes: el no-ajuste del modelo y la variabilidad experimental. Para un número  $n$  de muestras, de  $k$  concentraciones diferentes, repetidas  $i$  veces, dando señales  $y_{ij}$ , la componente que corresponde puramente al error experimental ( $D_{ex}$ ) y la correspondiente a la desviación del modelo ( $D_m$ ) se calculan mediante las siguientes expresiones:

$$D_{ex} = \frac{\sum_i^k \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \underline{y}_i)^2}{n-k} \quad (6.2)$$

$$D_m = \frac{\sum_i^k n_i * (y_i - \hat{y}_i)^2}{k-2} \quad (6.3)$$

A partir de las dos componentes se puede obtener el valor estadístico  $F$  como:

$$F = \frac{D_m}{D_{ex}} \quad (6.4)$$

Si este valor es menor al correspondiente de la tabla de valores  $F$  previamente tabulados entonces se acepta la linealidad del modelo. Independientemente de los valores estadísticos, es importante confirmar esta linealidad observando la curva directamente, para asegurarse de que no hay artefactos matemáticos involucrados (Dosal & Villanueva, 2008; Torre, 2007)

Un problema que frecuentemente se observa al trabajar con matrices complejas son errores sistemáticos causados por sustancias desconocidas (o de interacciones desconocidas). Este problema se amplifica al

---

<sup>17</sup> El coeficiente de determinación es un valor estadístico que da cuenta de la variabilidad aleatoria de las medidas. Los valores de  $r^2$  van de 0 a 1, donde 1 significa que la totalidad de la variación de la medida se explica por el modelo lineal utilizado y 0 indica que ninguna parte de la variación de la medida se explica por el modelo (Rodríguez, 2005).

trabajar con muestras tan cambiantes como pueden serlo aguas de río y desechos industriales. Para resolver esta incertidumbre existe el llamado método de adiciones estándar. Este último consiste en la adición de cantidades conocidas de analito a la muestra problema con el fin de extrapolar la concentración (Meija et al., 2014).

La concentración original de la muestra ( $x_0$ ) es obtenida a partir de la línea de mejor ajuste para el set de datos  $\{x, y\}$  donde  $x$  es la cantidad de analito añadida e  $y$  es la respuesta analítica obtenida. Se plantea entonces que  $x_0 = -x_{y=0}$ . Es importante recordar que los agregados se hacen directamente sobre la muestra a medir, por lo que la técnica es destructiva y cada alícuota puede medirse una sola vez (Meija et al., 2014).

El problema con obtener el valor directamente del corte de la recta con el eje  $x$  es que el cálculo de errores se torna sumamente tedioso y matemáticamente complejo. No obstante, es posible realizar un simple cambio de variables que elimina este problema mediante una calibración inversa (Matuszewski et al., 2003). Si en lugar de plantear  $y = ax + a_0$  se plantea  $x = by + b_0$ , el valor de concentración sin agregados de analito es obtenible directamente del corte con el eje  $y$  ( $b_0$ ). Dado que casi todos los algoritmos utilizan mínimos cuadrados para obtener la recta de mejor ajuste, el error asociado a la obtención de  $b_0$  es el causado por el algoritmo de mínimos cuadrados. Como la transformación no es perfectamente simétrica puede haber ciertas diferencias en los valores calculados de una y otra forma, hecho que ha generado largos debates sobre la validez de esta técnica. Sin embargo, se puede decir que los modelos son metrológicamente compatibles ya que el error asociado al cálculo es mayor que la diferencia generada por la transformación. Gracias a esto es que se puede aceptar la calibración inversa como válida (Meija et al., 2014)

Otro aspecto que es necesario tener en mente es que no necesariamente la respuesta obtenida va a poder ser ajustada a una recta. En estos casos se suele ajustar la recta obtenida a un polinomio virial y el método de adiciones estándar sigue siendo válido. Existen limitaciones como la baja precisión y exactitud obtenidas a partir de otro tipo de curvas, pero la evidencia sugiere que los resultados que brinda la técnica en condiciones de no-linealidad son aceptables. Finalmente, existen casos en que la curva puede ser similar a una recta, dificultando saber si la tendencia observada se debe a la relación señal/concentración o a la variabilidad de la técnica, en caso de elegir el modelo equivocado los resultados pueden ser considerablemente diferentes a los valores reales por lo que es necesario asegurarse que el modelo es no lineal antes de intentar aplicarlo (Kościelniak, 1999).

#### 6.4. Límites de detección, cuantificación y blanco

Cuando uno desarrolla una técnica, existe una variedad de factores que pueden afectar las concentraciones medibles y que son independientes de los límites instrumentales. Para poder incorporar estos factores es necesario determinar el límite de detección del método (*LD*). Este límite es un valor, obtenido de forma empírica u estadística, para el que una cantidad de analito puede distinguirse del blanco con una confianza del 99%. Es importante notar que este valor es específico para una muestra puntual, en una matriz específica para un método dado, por lo que no es extrapolable a otros instrumentos o sustancias medidas (Gibbons, 1996; Wisconsin Department of Natural Resources, 1996).

Es importante conocer este valor ya que simplemente eliminar los datos por debajo del límite de cuantificación general sesga que afectan a diferentes distribuciones. De forma similar, reportar que no se encontró el analito en cantidades cuantificables tiene un impacto diferente en quienes interpretan los datos. Esto es particularmente importante en estudios ambientales donde un veredicto negativo puede generar una falsa sensación de seguridad que se traduce en menos estudios posteriores y que puede dar lugar a que un aumento del contaminante pase desapercibido. Finalmente, es imperativo tener en cuenta que este es un límite experimental, por lo nunca se puede afirmar que no hay nada de analito presente, por lo que si la técnica no logra detectarlo se debe reportar como  $< LD$  (Gibbons, 1996; Wisconsin Department of Natural Resources, 1996).

También es importante no confundir este límite con el límite de blanco. Mucho menos utilizado, el límite de blanco es la menor concentración a la que se puede comenzar a ver una respuesta analítica. Se diferencia del límite de detección en que esta concentración no asegura una respuesta, sino que simplemente puede darla. Existen técnicas en las que ambos límites coinciden, pero esto no necesariamente se cumple en todos los casos (Armbruster & Pry, 2008).

Existen muchas formas de determinar el límite de detección, con mayor o menor grado de rigurosidad. La forma más utilizada es a partir de un análisis por repetición de medidas del blanco. Esta es una de las formas más simples de calcularlo y no requiere del gasto de estándares primarios, lo cual puede ser un factor determinante si no se tiene cantidades suficientes de estándar o el precio de este es demasiado elevado. El objetivo de esta forma de calcular el límite de detección es determinar el rango en que es razonable que un blanco de señal, tomando entonces como señales positivas todas aquellas superiores a las calculadas. A partir de al menos diez mediciones de blancos diferentes se puede determinar el *LD* directamente como:

$$LD = 2t_{n,\alpha}SD\sqrt{\frac{1}{n_S} + \frac{1}{n_B}} \quad (6.5)$$

donde  $t_{n,\alpha,S}$  es para el test de Student unilateral para  $\alpha$  correspondiente al grado de incertidumbre con  $n$  grados de libertad,  $SD$  es la desviación estándar de las mediciones,  $n_B$  es el número de muestras en cada grupo de blancos y  $n_S$  es el numero de repeticiones para cada blanco. Si se hicieran, por ejemplo, diez muestras diferentes medidas una vez cada una,  $n_B = n_S = 1$  (Ansín et al., 2019). Este método tiene como ventaja que deriva del análisis estadístico de poblaciones y entre otras cosas toma en cuenta el número de repeticiones de cada medida y el número de blancos realizados.

Aunque menos frecuente, otra forma de hacerlo es con la técnica de la ERA (*Environmental Resource Associates*), la cual parte de una extrapolación de la desviación estándar de las medidas. El fundamento de este procedimiento consiste en extrapolar la desviación estándar de la en ausencia de analito. En lugar de hacer repeticiones del blanco, se calcula la desviación estándar de al menos 6 triplicados de concentraciones diferentes a lo largo del rango de trabajo. Se grafica entonces la desviación estándar de cada uno de los patrones de referencia en función de la concentración. El  $LD$  queda determinado por tres veces el valor de la ordenada en el origen de la regresión lineal de estos puntos. Una de las ventajas de esta forma de calcular el  $LD$  es que toma en cuenta todo el rango de trabajo en lugar de un solo punto, lo que puede reducir sesgos producidos al medir solamente el blanco. Es también importante mencionar que, al igual que en los métodos que serán descritos más adelante, el uso de estándares certificados para estas mediciones es imperativo. Para el cálculo del límite de detección, la recomendación de la ERA simplemente plantea multiplicar al límite de detección por 10. Debido a que parte de la misma base matemática, todas las ventajas y desventajas que pueda tener el  $LD$  calculado de forma equivalente serán acarreadas al  $LC$  (McHale, 2012).

Una tercera forma de determinar el límite de detección es a partir de la curva de calibración con la señal del blanco. Para esto es necesario tener una curva de calibración lineal, así como por lo menos cinco mediciones del blanco y plantear la relación:

$$LD = k * \frac{S_y}{b} \quad (6.6)$$

donde  $S_y$  es el error estándar de la regresión o alternativamente, puede ser también la desviación estándar residual de la ordenada en el origen determinada por la regresión lineal;  $b$  es la pendiente de la curva de calibración y  $k$  es un factor de expansión. La elección del  $k$  a utilizar determinará la probabilidad de errores de tipo I y II. Suele emplearse de forma simplificada y arbitraria un valor de  $k = 3$  (Rajaković

et al., 2012). Como ventaja este método es sencillo y solamente toma en cuenta los parámetros de la curva de calibración. En cierto modo puede entenderse como una simplificación del método descrito anteriormente en la ecuación 6.5, por lo que, a diferencia de éste, pueden acarrear errores al simplificar el fundamento estadístico.

Es posible calcular el límite de detección a través de la técnica oficial de la EPA (USEPA, 2016). Esta es una de las técnicas más utilizadas dada la importancia de esta organización a la hora de generar protocolos de control ambiental. Esta forma de obtener el *LD* consiste realizar al entre siete y diez mediciones de blancos diferentes. Se calcula entonces la desviación estándar (*SD*) de los blancos. El Límite de detección puede calcularse a partir de las muestras como:

$$LD = \bar{X} + SD * t_{(n-1, \alpha-1=0.99)} \quad (6.7)$$

donde  $t_{(n-1, \alpha-1=0.99)}$  es el valor de *t* de Student apropiado para un intervalo de confianza del 99% y una desviación estándar estimada con *n-1* grados de libertad.  $\bar{X}$  corresponde al promedio de las medidas del blanco. En caso que el promedio de negativo debe colocarse un 0. Paralelamente, es necesario realizar también la medida por *spiking* de la muestra: Se debe estimar el *LD* y preparar muestras con analito en concentraciones de 2 a 10 veces el límite estimado —siendo este valor más alto cuanto menor sea el porcentaje de recuperación del analito—. Se realizan entonces siete mediciones de blanco y siete mediciones de las muestras. Estas mediciones y preparaciones deben de realizarse en tres tandas diferentes, cada una siendo preparada en tres días distintos. Se calcula entonces el *LD* como se muestra en la ecuación 6.8.

$$LD = SD * t_{(n-1, \alpha-1=0.99)} \quad (6.8)$$

El límite oficial reportado será entonces el valor más alto entre los dos calculados, con y sin el *spiking*. En caso que la relación señal/ruido<sup>18</sup> sea alta —entre 5 y 20—, no es necesario hacer la medida de *spiking* y simplemente se emplea la ecuación 6.7 para reportar el valor final. Es importante recordar que este método no es aplicable a mediciones que no den distribuciones continuas de resultados. Por último, el límite de cuantificación puede calcularse como:

$$LC = 3 LD \quad (6.9)$$

---

<sup>18</sup> Relación  $\frac{\text{señal}}{\text{ruido}} = \text{promedio de medidas} / \text{SD de medidas}$  (NIST, 2017).

Es relevante destacar, que se menciona que esta metodología no puede utilizarse para mediciones de color. Sin embargo, dado el contexto agrícola es probable que esto refiera a colorimetrías en las que se identifica el matiz de un color y no a instancias en que se realiza el seguimiento de la aparición de un color como medida indirecta de una reacción (US EPA, 2016).

La principal ventaja de éste método es que toma en cuenta el valor mayor entre la medida sin el analito y con el mismo, por lo que no sólo tiene en cuenta la relación señal ruido con el blanco sino también con el analito. Como desventaja, si se fija un umbral de confianza del 99 % se esperaría que un 1 % de las muestras presente un error de tipo I pero la medida es vulnerable a errores de tipo II para los valores muy cercanos al límite. Finalmente, es importante mencionar que existen críticas a la validez de las asunciones estadísticas implícitas en el método. No obstante, esta metodología sigue siendo muy utilizada a nivel institucional y ofrece una forma sencilla de obtener un límite razonable (Gibbons, 1996; Wisconsin Department of Natural Resources, 1996).

La IUPAC, adopta una definición del límite de detección igual al mostrado por la EPA en la ecuación 6.7, aunque deja a criterio del usuario la elección del valor  $t$ , dependiendo del grado de confiabilidad arbitrario (IUPAC, 1997).

Como se mencionó anteriormente, existe una diferencia entre poder detectar un analito y poder cuantificarlo. El límite de cuantificación ( $LC$ ) es el umbral que se fija a partir del cual los resultados tienen fiabilidad suficiente como para ser cuantificados. En muchos laboratorios el  $LC$  no es calculado explícitamente, sino que se utilizan medidas de desviación estándar multiplicada 10 o se calcula a partir del  $LD$  multiplicándolo por una constante, generalmente 3, 3.3 o incluso 10 (McHale, 2012). La relación de 3.3 surge de que generalmente se toma que para detectar un analito la señal debe ser al menos 3 veces mayor que el ruido y para cuantificarlo al menos 10 veces. Dando como cociente entre el  $LD$  y  $LC$  una razón de 3.3. Sin embargo, como se mencionó anteriormente muchas normas simplifican los valores estableciendo sus criterios arbitrarios.

Existen diversos métodos para el cálculo del  $LC$  absoluto. Los más estrictos son computacionalmente complejos por lo que se han validado algunas aproximaciones que brindan resultados parecidos, facilitando la implementación, siendo algunos de estos últimos los descritos en el presente capítulo (Vashist & Luong, 2018; Zorn et al., 1999).

Una forma sumamente sencilla y rápida de estimar el límite de detección y cuantificación es a partir de la relación señal ruido de la respuesta analítica, tomando relaciones típicamente de 10:1 y 3:1 para cada uno de los límites respectivos. En estos casos los límites se calculan según las siguientes ecuaciones:

$$LC = 10 \frac{S_y}{a} \quad (6.10)$$

$$LD = 3 \frac{S_y}{a} \quad (6.11)$$

donde  $a$  es la pendiente de la regresión lineal de la curva de calibración y  $S_y$  es la desviación estándar de la respuesta, que puede ser o bien la desviación estándar del blanco de medida, la desviación estándar de la ordenada en el origen, o bien el error residual de la regresión lineal (Ver el capítulo 12. 4 del Anexo). Este método asume que si la señal analítica es suficientemente mayor que el ruido debería detectarse (3) y cuantificarse (4), lo cual no necesariamente es válido (Armbruster & Pry, 2008).

En resumen, existen varias formas de medir la sensibilidad de una técnica analítica, en su gran mayoría todas las formas están basadas en criterios estadísticos, pero por conveniencia también se introducen algunas arbitrariedades que simplifican los cálculos. El análisis estadístico exhaustivo requeriría varios capítulos. En su lugar se realizó una descripción de las formas más comúnmente empleadas, cuyas fórmulas se resumen en la tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Metodologías resumidas para el cálculo de los límites de detección y cuantificación

Método	Tipo de método	Cálculo del LD	Cálculo del LC
(Ansin et al., 2020 ; Wenzl et al., 2016)	Método tradicional a partir de 10 repeticiones del blanco.	$LD = 2t_{n,a}SD \sqrt{\frac{1}{n_S} + \frac{1}{n_B}}$	$LC = 3.3 LD$
(Rajakovic et al., 2012)	Método tradicional simplificado. A partir de la curva de calibración.	$LD = 3 \frac{S_y}{a}$	$LC = 10 \frac{S_y}{a}$
(McHale, 2012)	Método de la ERA. A partir de la desviación estándar de la ordenada en el origen.	$LD = 3 * SD_0$	$LC = 10 * LD$
(US EPA, 2016) (US EPA, 2000)	Método del EPA. A partir de al menos 7 repeticiones del blanco.	$LD = SD * t_{(n-1, \alpha-1=0.99)}$ o $LD = \bar{X} + SD * t_{(n-1, \alpha-1=0.99)}$	$LC = 3 * LD$

$SD_0$  refiere a la extrapolación de la desviación estándar del blanco a partir de la curva de desviación estándar vs concentración del analito.

# **Desarrollo experimental**

## Capítulo 7. Objetivos

### Objetivo general

Fabricar y validar un sensor colorimétrico de fósforo empleando un teléfono celular *Smartphone*.

### Objetivos específicos

- Implementar la técnica oficial (de DINAMA) en condiciones controladas de laboratorio, la cual servirá de guía y control para la comparación de las medidas de fósforo.
- Comparar la técnica colorimétrica con otros métodos de medida como son las técnicas electroquímicas o la espectroscopia en UV-Vis.
- Evaluar los distintos parámetros a tener en cuenta para el desarrollo de la medida de fósforo empleando un teléfono celular.
- Realizar ensayos de medidas de fósforo en muestras reales.

## Capítulo 8. Medidas siguiendo el protocolo oficial de la DINAMA, por espectrofotometría UV-Vis

Como etapa previa al desarrollo del sensor colorimétrico se puso a punto y se adaptó el protocolo oficial de la DINAMA para la medida de fósforo reactivo. Cabe aclarar que se mantuvieron todas las concentraciones invariantes y los únicos cambios realizados fueron la reducción del volumen al décimo y el trabajo con una celda espectrofotométrica de poliestireno de camino óptico de 1 cm en lugar de las de 5 cm recomendadas en el protocolo oficial.

### 8.1. Materiales

#### 8.1.1. Reactivos

Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , J. T. Baker  $\geq 98\%$ ), ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , Grupo Benzo  $\geq 99.7\%$ ), molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_2\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich  $\geq 99.98\%$ ), tartrato de antimonio ( $\text{K}_2\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6)_2$ , Sigma-Aldrich  $\geq 99\%$ ), fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Biopack  $\geq 99\%$ ) y agua ultrapura (MiliQ  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

#### 8.1.2. Preparación de las soluciones *stock*

Solución *stock* de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N: Diluir 7 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en 50 mL de agua ultrapura.

Solución *stock* de molibdato: Disolver 2 g de molibdato de amonio en 50 mL de agua ultrapura, preparando un *stock* nuevo cada 6 meses.

Solución de ácido ascórbico 0.1 M: Disolver 0.176 g de ácido ascórbico en 10 mL de agua ultrapura, preparando un *stock* nuevo cada 7 días.

Solución de tartrato de antimonio: Disolver 0.1372 g de tartrato de antimonio en 50 mL de agua ultrapura, preparando un *stock* nuevo cada 6 meses.

Solución de fósforo  $50 \text{ mgL}^{-1}$ : Disolver 219.68 g de fosfato de potasio monobásico, previamente secado en estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 hora, en 1 L de agua ultrapura. Volver a preparar el *stock* cada 6 meses.

#### 8.1.3. Instrumentación

Las medidas de espectrofotometría se realizaron con un espectrofotómetro Specord 200 Plus en celdas descartables de poliestireno con paso óptico 1 cm.

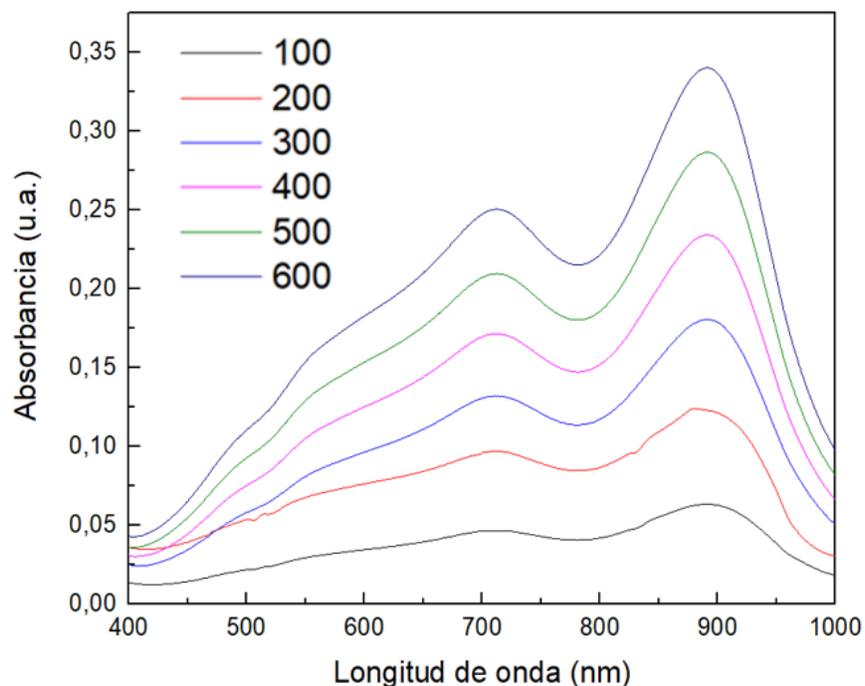
## 8.2. Métodos

La evaluación de la concentración de fósforo se realiza siguiendo el protocolo descrito por la DINAMA: Se preparan muestras de 20 mL a diferente concentración de fósforo por dilución de la solución *stock* de fósforo ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Se prepara el reactivo combinado (RC) agregando en orden 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N, 5 mL de la solución *stock* de tartrato de antimonio, 1.5 mL de la solución de molibdato de amonio y 3 mL de la solución de ácido ascórbico (estabilidad máxima del RC = 4 h). Las medidas de concentración de fósforo se realizan agregando 3.2 mL de RC a las muestras problema, se homogeniza agitando vigorosamente y se espera 10 min antes de registrar la medida de absorbancia a 880 nm. Para la medida del blanco se agrega el mismo volumen sobre una muestra de agua ultrapura.

Para los estudios cinéticos se sigue el protocolo anterior empleando 10, 100 y  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  y el máximo de absorbancia a 880 nm se registra cada 0.2 s durante 40 min. Se considera el tiempo 0 desde el inicio de la medida espectrofotométrica. Se desprecia el tiempo de agregado de los reactivos, el homogeneizado y el pasaje de la muestra a la cubeta. Este tiempo toma ca. 15 s.

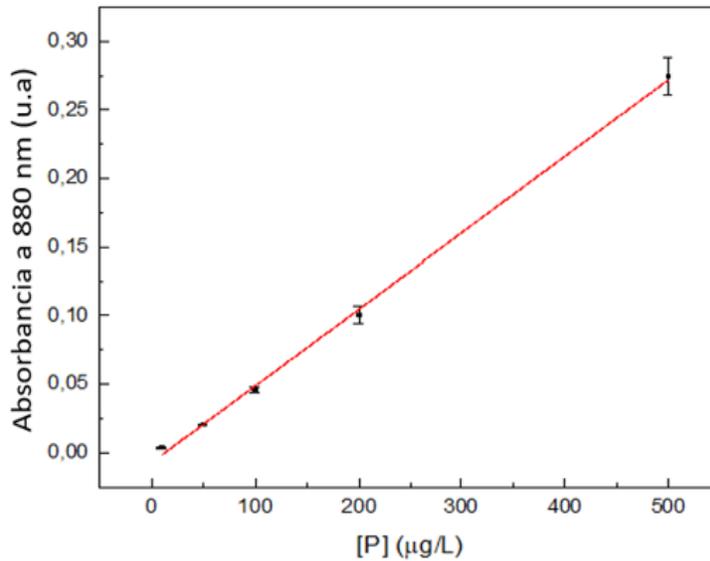
## 8.3. Resultados y discusión

El espectro de absorbancia obtenido a diferentes concentraciones de fósforo es mostrado en la Figura 8.1. Se observa la presencia de dos picos a 710 y 880 nm. Se utilizará este último para la elaboración de la curva de calibración necesaria para la validación del método dado que a todas las concentraciones es la longitud de onda de mayor absorbancia. En este rango de concentraciones, todos los agregados de fósforo tuvieron un correspondiente incremento de absorbancia.



**Figura 8.1.** Espectros de absorción UV-visible de 400 a 1000 nm resultantes de la reacción de azul de molibdato con concentraciones crecientes de a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  entre  $100$  y  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  de fósforo.

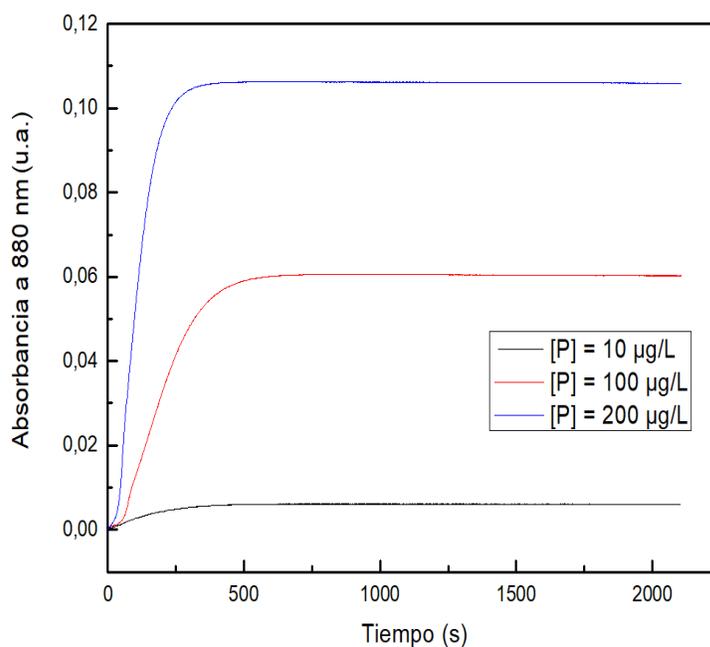
Para evaluar la robustez de la técnica se generan tres curvas de calibración en tres días diferentes. Los datos de las tres repeticiones son luego incorporados a una nueva curva de calibración final. Las tres repeticiones, así como la curva de calibración resultantes se muestran en la Figura 8.2. Utilizando el conjunto de todos los datos la regresión lineal resultante tiene un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.999. Esto no solo refleja una fuerte robustez de la técnica —dado que las condiciones de trabajado durante los cuatro días fueron diferentes— sino que confirma la aplicabilidad del modelo lineal. El rango de concentraciones de trabajo corresponde al del protocolo de la DINAMA y permite —luego de diluir la muestra en caso de ser pertinente— evaluar la calidad de cursos de agua.



**Figura 8.2.** Gráfica de absorbanza a 880 nm en función de la concentración de fósforo utilizando datos obtenidos en tres días diferentes.

Durante la puesta a punto de esta técnica se realiza también la determinación del límite de cuantificación midiendo diez blancos diferentes. La desviación estándar del conjunto de datos generado es  $0.90 \mu\text{g L}^{-1}$ . Utilizando un valor  $k$  de 3.3 para determinar el DL y 10 para el LC, se obtienen  $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $9.0 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. Los valores del blanco se muestran en la Tabla 1 del anexo.

Dada la variedad de tiempos descritos en los protocolos que dependen de la técnica de azul de molibdeno, se decidió medir la absorbanza a 880 nm con diferentes concentraciones de fósforo en función del tiempo. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 8.3. Se observa que para el rango de trabajo la reacción llega a un máximo de absorbanza a los 10 min y permanece estable por al menos 40 min. Si bien estos resultados muestran que la señal espectrofotométrica se estabiliza a valores superiores a los 10 min de reacción, como se verá más adelante este perfil cinético puede cambiar en presencia de interferentes, lo que puede comprometer la medida dependiendo de la matriz de medida.



**Figura 8.3.** Absorbancia a 880 nm en función del tiempo en segundos para muestras de 10, 100 y 200  $\mu\text{g/L}^{-1}$  de fósforo.

La exactitud de la medida se evalúa mediante la medición de una muestra problema proporcionada por un ejercicio de medición internacional gestionado por ERA. En él, se utiliza el protocolo descrito para medir el contenido de fósforo en una muestra desconocida con interferentes frecuentemente encontrados en muestras equivalentes pero cuya identidad y concentración es también desconocida. Esta prueba puede considerarse como un ensayo de competencia dado que la muestra contiene una variedad de contaminantes que podían interferir con la medida.

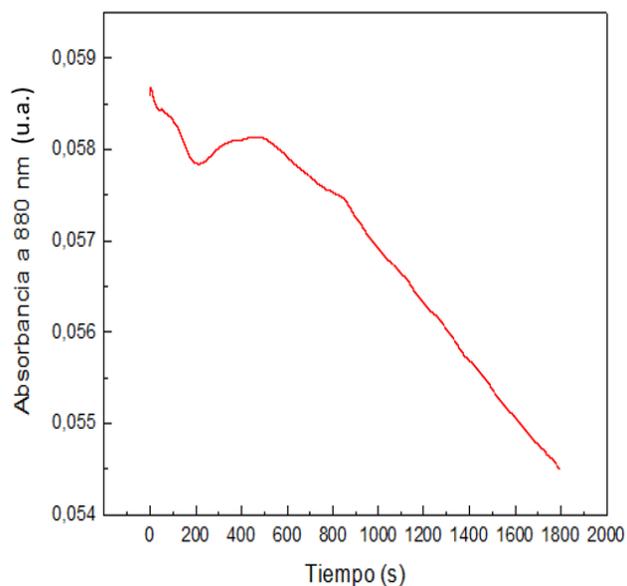
El porcentaje de recuperación es de 97.2% ( $n=6$ ) con respecto al valor reportado por la ERA. Estos resultados son satisfactorios analíticamente. El reporte de los resultados junto con la certificación obtenida durante el ensayo se muestra en la Figura 8.4.



**Figura 8.4. A:** Certificación de la ERA para las medidas de fósforo total y ortofosfatos, realizadas en el Laboratorio de Biomateriales en el marco de la presente tesina; **B:** Reporte de la performance de la cuantificación de ortofosfatos por medida de absorbancia del Laboratorio de Biomateriales (Facultad de Ciencias, Universidad de la República) en contexto de los demás laboratorios participantes; **C:** Evaluación de la cuantificación de ortofosfatos por medida absorbancia.

Es relevante mencionar que las primeras medidas realizadas de la muestra problema del ensayo de inter-comparación arrojaron valores cuya dispersión eran significativamente mayor a la precisión previamente evaluada durante la verificación de la técnica (datos no mostrados). En otras palabras, la desviación estándar de tres medidas consecutivas era significativamente mayor a la esperada para muestras donde no existiera una matriz compleja. Más aún, los resultados de las repeticiones eran consistentes cuanto menor fuese el tiempo entre las medidas consecutivas. Esto sugería que el problema era de tipo cinético. Para evaluar esta hipótesis se repitió el experimento empleado para la cuantificación de fósforo, pero en lugar de realizar una medida puntual se siguió la reacción durante 30 min. Estos resultados se presentan en la Figura 8.5. En lugar de observarse un comportamiento constante de la absorbancia como se mostraba en la Figura 8.4, luego de los 10 min de reacción se observa una oscilación inicial y luego un descenso sostenido de la absorbancia de la muestra problema. Este efecto complejo se atribuye a la presencia de una matriz compleja que afecta la cinética del proceso. La composición de la muestra

problema no se encuentra disponible por lo que no es posible identificar cual es la interferencia, sin embargo, este resultado indica que los aspectos cinéticos deben tenerse en cuenta a la hora de realizar la medida, y también explican en parte el amplio rango de precisión de las medidas espectrofotométricas de muestras reales.



**Figura 8.5.** Absorbancia a 880 de la muestra problema del ensayo de certificación de la ERA medida por la técnica del azul de molibdeno en función del tiempo.

## Capítulo 9. Desarrollo del sensor colorimétrico

### 9.1. Materiales

#### 9.1.1. Reactivos

Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , J. T. Baker  $\geq 98\%$ ), ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , Grupo Benzo  $\geq 99.7\%$ ), molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_2\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich  $\geq 99.98\%$ ), tartrato de antimonio ( $\text{K}_2\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6)_2$ , Sigma Aldrich  $\geq 99\%$ ), fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Biopack  $\geq 99\%$ ), hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$  grado industrial 4.2% m/m) y agua ultrapura (MiliQ, resistividad  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

#### 9.1.2. Preparación de las soluciones *stock*

Todas las soluciones se preparan en matraces aforados.

Solución *stock* de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N: Diluir 7 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en 50 mL de agua ultrapura.

Solución *stock* de molibdato: Disolver 2 g de molibdato de amonio en 50 mL de agua ultrapura, preparando un *stock* nuevo cada 6 meses.

Solución de ácido ascórbico 0.1 M: Disolver 0.176 g de ácido ascórbico en 10 mL de agua ultrapura, preparando un nuevo *stock* cada 7 días.

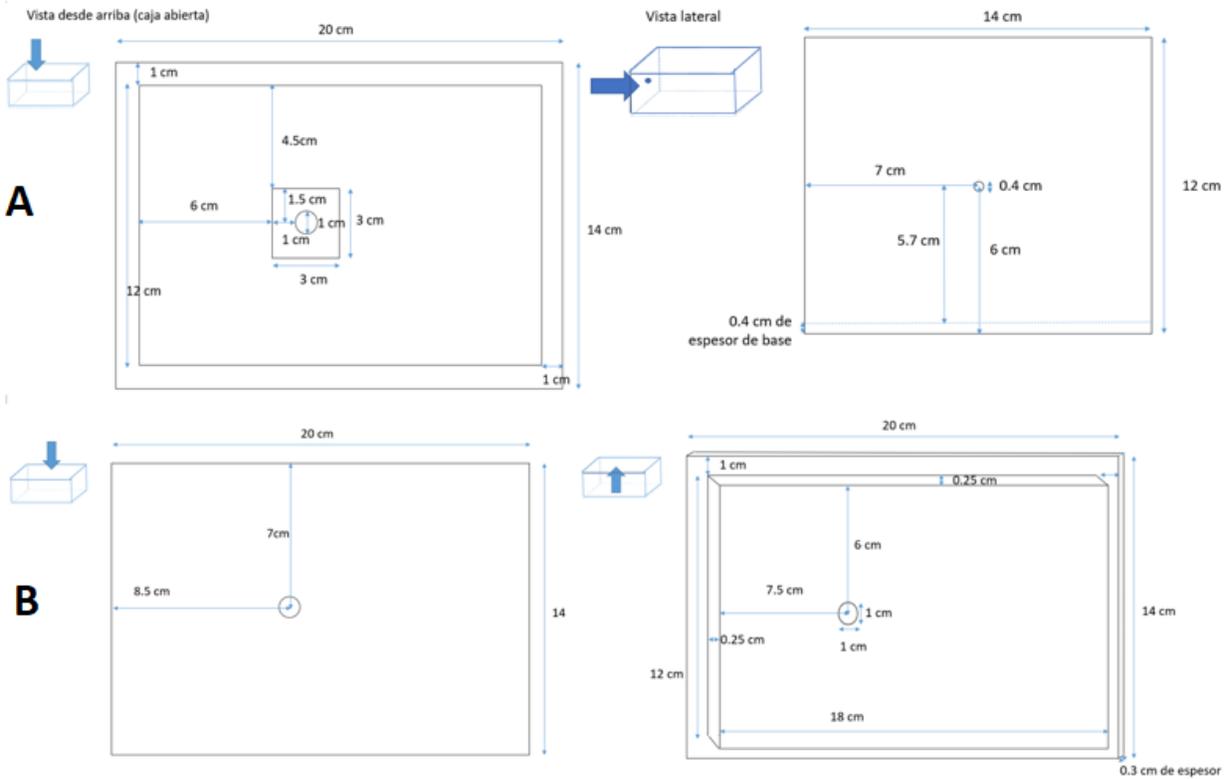
Solución de tartrato: Disolver 0.1372 g de tartrato de antimonio en 50 mL de agua ultrapura, preparando un nuevo *stock* cada 6 meses.

Solución *Stock* de fósforo 50 mg  $\text{L}^{-1}$ : Disolver 219.68 g de fosfato monobásico de potasio, secado en estufa a 50 °C por 4 h, en 1 L de agua ultrapura. Volver a preparar el *stock* cada 6 meses o si aparecen florecimientos.

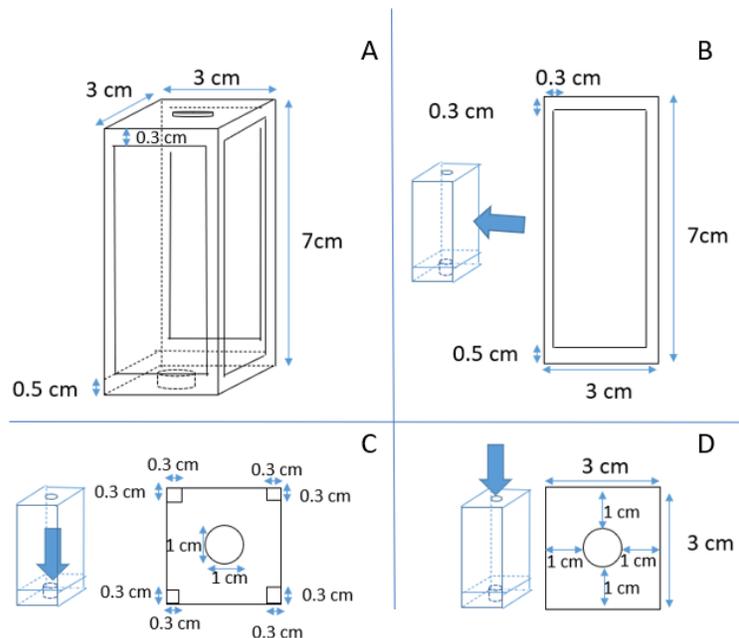
#### 9.1.3. Construcción del colorímetro

La toma de imágenes, así como su procesamiento se realizan con un teléfono celular Haweei LM-X210RM con Android 7.1.2 de sistema operativo. Este se coloca en una caja diseñada especialmente para la medida con un soporte para un tubo de vidrio conteniendo la muestra a analizar. Las Figuras 9.1 y 9.2 muestran respectivamente la construcción de la caja, la disposición de la tapa y el soporte para el tubo. La construcción de la caja debe realizarse con algún material resistente al agua, blanco opaco, que limite el ingreso de luz desde el exterior. Como prototipo inicial se empleó una caja de madera pintada con pintura epoxi blanca para protegerla de derrames de líquido, sin embargo, para el prototipo final se eligió al acrílico por su bajo peso, resistencia al agua y posibilidad de moldear de forma precisa. Las dimensiones de ambas cajas son las mismas. Los tubos que contienen la muestra dentro de la caja son tubos de vidrio

de base cóncava de 1 cm de diámetro y 10 cm de largo. Para ponerlos en condiciones de uso se pinta 1 cm desde la base con pintura acrílica blanca. Luego de haberse secado se dan dos manos finas de barniz sobre la superficie pintada. El teléfono se fijó a la tapa de forma que la cámara coincidiese en el agujero en la misma, obteniendo una vista directa de la parte superior del tubo.

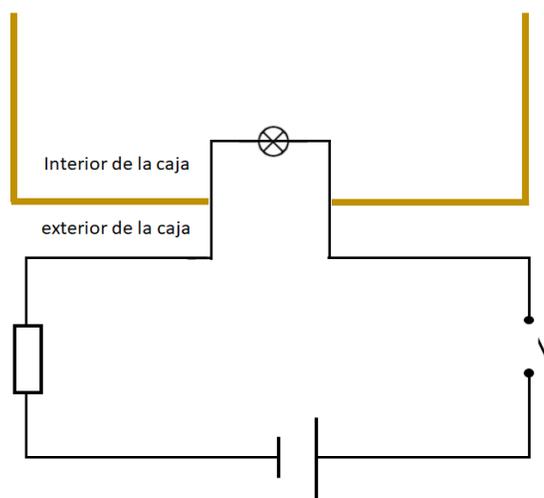


**Figura 9.1. A:** Esquema de la caja sin tapa vista desde arriba y lateralmente desde el lado en que se conecta la lámpara. **B:** Esquema de la tapa de la caja.



**Figura 9.2.** Esquema del soporte del tubo en el interior de la caja, **A:** representado tridimensionalmente **B:** visto lateralmente, **C:** de la cara superior de la base, **D:** vista desde arriba.

La iluminación dentro de la caja fue realizada con una lámpara LED colocada en el agujero lateral de la caja que se muestra en la Figura 9.1. Esta se conecta en serie a 4 baterías AA, una resistencia de 560 k $\Omega$  y un interruptor colocados en el exterior de la caja para su fácil remoción. Un esquema de esta disposición se encuentra en la Figura 9.3. A modo de filtro de luz y difusor se coloca una tapa blanca alrededor de la LED.



**Figura 9.3.** Esquema del circuito eléctrico de la iluminación de la caja, señalándose los componentes que se encuentran en el interior y en el exterior.



**Figura 9.4.** Fotos del prototipo original (arriba) y el final de la caja de medición (abajo).

#### **9.1.4. Programa de procesamiento de imágenes**

Para la toma de fotografía se optó por el programa Open Camera®. El programa por defecto para el uso de la cámara fotográfica del teléfono tiene muchos parámetros que no pueden ser modificados por el usuario, y que son necesario fijar para obtener resultados reproducibles. Por esta razón se necesita un programa auxiliar para el control de la cámara. En primer lugar, se eligió Open Camera porque prácticamente todos los parámetros pueden ser fijados manualmente. En segundo lugar, el programa es abierto, por lo que su uso no tiene costo, no aparecen publicidades a la hora de usarlo y su código fuente está disponible.

#### **9.1.5. Contenidos del *kit* para medidas de campo**

La medida en campo requiere de un teléfono celular con la aplicación calibrada, la caja de medición y un pequeño contenedor con un tubo de vidrio (con su base previamente pintada con pintura blanca epoxi o acrílica), una pipeta Pasteur de 3 mL, tres tubos Eppendorf de reactivo combinado previamente congelado, un trapo limpio y una jeringa analítica de 1 mL o una pipeta automática de 1000  $\mu\text{L}$ .

### **9.2. Métodos**

#### **9.2.1. Calibración del dispositivo**

A partir de la solución patrón, preparar en tubos Falcon tres muestras conteniendo 6 mL con concentraciones de crecientes de fósforo a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  entre 25 y  $175 \mu\text{g L}^{-1}$ . A partir de las soluciones *stock* preparar 10 mL de reactivo combinado. Medir el porcentaje de azul de los tubos de una misma concentración como se indica en el capítulo 9.1.2. Determinar los valores de porcentaje de azul correspondientes a cada concentración y realizar una regresión lineal en un programa de procesamiento de datos. Oprimir el botón “calibrar” en la aplicación e ingresar los parámetros encontrados para la regresión lineal. Mantener oprimido el botón “calibrar” ´por 4 segundos para completar el proceso. Como criterio arbitrario, todas las desviaciones estándar son representadas con dos cifras decimales.

#### **9.2.2. Medición de fósforo en muestras incoloras**

Prender el teléfono y asegurarse que el programa se encuentra abierto.

Se toman 6 mL del analito en tres tubos Falcon de 15 mL. Descongelar tres tubos Eppendorf conteniendo el RC sosteniéndolos fuertemente en la mano. Agregar 1 mL de RC a cada tubo Falcon con la muestra, agitar vigorosamente por 3 segundos los tres tubos e inmediatamente oprimir el botón de “Inicio” en la aplicación. Se verá en la pantalla un temporizador de 900 s (15 min), tiempo en el cual transcurrirá la reacción (Figura 8.3.). Al final de este tiempo sonará una alarma y se abrirá automáticamente la aplicación

para la toma de la foto del tubo. Cuando esto ocurra, llenar el tubo de vidrio con el contenido de uno de los tubos Falcon hasta que desborde, colocar en la ranura correspondiente de la caja, encender la luz cerrar la caja y tomar la foto.

Descartar el contenido del tubo, enjuagar con unas gotas de la muestra siguiente y repetir el proceso, asegurándose que el orden de agregado del RC a los tubos coincida con el orden de la toma de imágenes.

### **9.2.3 Medición de fósforo en el Laboratorio**

Además de mediciones en campo, el dispositivo puede ser utilizado en laboratorios como una alternativa económica a un colorímetro u espectrofotómetro. En estos casos la medida se realiza de las formas descritas anteriormente. La única distinción es que las muestras deben ser filtradas con filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro en el momento de su toma y previo al transporte al laboratorio. En caso de no realizar este paso es posible que la concentración de ortofosfatos varíe con el tiempo de almacenamiento dado que existen microorganismos que bioacumulan fósforo. El uso de estos filtros reduce el contenido de este tipo de organismos haciendo que la concentración en las muestras almacenadas no varíe de forma significativa, almacenándolas en heladera a 4 °C.

### **9.2.5. Limpieza del equipo**

Luego de finalizadas las mediciones, se remueve el tubo de vidrio y se lo enjuaga cinco veces con agua caliente. Luego de cada agregado de agua la parte pintada del tubo debe de ser secada para evitar daño al barniz y a la pintura. El interior de la caja puede luego ser enjugado con agua ultrapura, frotando con una esponja en caso ser necesario.

### **9.2.6. Ajustes de los parámetros del programa Open Camera**

A continuación, se detallan los parámetros fijados manualmente en Open Camera®:

NR, HDR o DRO: Estos son tres modos disponibles empleados para mejorar la toma de imágenes. NR (*Noise Reduction*) toma una ráfaga de imágenes que son luego unidas para reducir el ruido. DRO (*Dynamic Range Optimization*) optimiza el rango dinámico<sup>19</sup> disponible para la imagen, al aumentar el brillo de las regiones más oscuras, de forma algorítmica, en una foto. HDR (*High Dynamic Range Imaging*) también busca aumentar el rango dinámico, pero lo logra a partir de la unión de tres fotos, una con los ajustes preestablecidos, uno con la máxima exposición<sup>20</sup> y una con la mínima.

---

<sup>19</sup> El rango dinámico es la capacidad de captar detalles en las luces y sombras de una imagen.

<sup>20</sup> La exposición refiere al tiempo que el diafragma permanece abierto (y permitiendo el ingreso de luz a los fotorreceptores de la cámara) durante la toma de una fotografía.

El software no permite tomar una foto sin aplicar alguno de los modos descritos anteriormente. Sin embargo, también es posible adquirir la imagen mediante la captura de pantalla del equipo. En este caso el modo en que se encuentre la aplicación no afecta el resultado final, dado que la aplicación de estos parámetros se realiza luego o durante la adquisición de la foto. Durante la optimización se determinó que la captura de pantalla es la mejor opción para la toma de la imagen.

ISO: La sigla debe su nombre al *International Standard Organization*, pero corresponde a la sensibilidad a la luz de los receptores fotónicos de la cámara. Su nombre se debe a que el valor de intensidad de luz sigue una escala o estándar internacional. Un aumento de la sensibilidad permite una mayor captación de luz sin modificar la velocidad del obturador. Dado que los cambios en iluminación afectan la medida, este parámetro no puede quedar en automático. Diferentes valores cambiarán el color de los píxeles que componen la imagen, pero ninguno es necesariamente mejor; en este dispositivo se fija este valor a 100.

Valor de exposición: Este parámetro se relaciona con el tiempo de exposición a la luz y la apertura del obturador, siendo un cambio de 1 EV (*exposition value*) correspondiente a un cambio del tiempo de exposición en un factor de dos. Para las mediciones se debe fijar manualmente en 0, correspondiente a un tiempo de exposición de 1 s (Jones & Condit, 1941).

Reductor de parpadeo: Esta función modifica la velocidad del obturador para no registrar parpadeos y las líneas que aparecen cuando se fotografían luces de neón. Esta función se apaga manualmente (*Open Camera Help v1.48.3*, 2020).

Balance de blancos: Este set de opciones establece la forma en que la cámara trata con el balance de blancos<sup>21</sup>. Este parámetro es fundamental dado que afecta en gran medida el color resultante de la foto, pudiendo obtener imágenes que ni siquiera sean de color azul. Se probaron diferentes opciones hasta determinar visualmente que la opción “luz día” permitía obtener imágenes del color más similar al percibido por observación directa.

Modo de escena: Estos son paquetes de configuraciones predefinidas que optimizan la toma de imagen para escenas específicas. En esta configuración específica, “asd” determina automáticamente la escena mientras que “auto” por defecto no utiliza ninguno de los paquetes. Dado que estos paquetes modifican algunos de los parámetros anteriores como los valores del tiempo de exposición o el ISO, la velocidad de

---

<sup>21</sup> El balance de blancos es el ajuste de los colores en función de la temperatura de la luz ambiente.

obtención, entre otros parámetros, se optó por utilizar el modo “auto”, que por defecto emplea los parámetros fijados previamente por defecto o manualmente.

Distancia focal: La distancia focal es la distancia entre el lente y el foco, este último siendo el punto en que convergen los haces de luz provenientes de un objeto que atraviesan el objetivo. Modificar la distancia cambia el punto en los objetos en la imagen pasan a estar enfocados y nítidos. En este dispositivo se fija la distancia focal al máximo valor posible.

Efectos de color: Cada una de estas opciones modifica la imagen para tener algún efecto misceláneo como ser blanco y negro, sepia o emulación de un estilo artístico. Es necesario fijar este parámetro en “ninguno” (*Open Camera Help v1.48.3, 2020*).

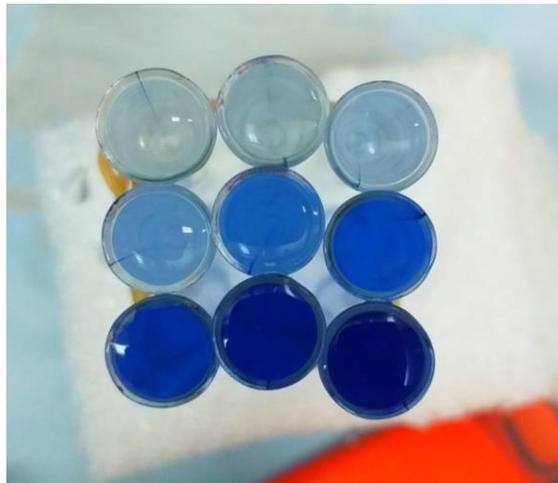
Finalmente, es necesario evitar que el balance de blancos y exposición no genere variabilidad. Para esto se bloquea manualmente estos parámetros. Esta forma de operar, sin embargo, conduce a problemas ya que, si se bloquea la cámara en diferentes condiciones de iluminación, las fotos resultantes serán también diferentes. Bloquear esta función estando la cámara encendida en la oscuridad del dispositivo tampoco es una opción, ya que la exposición será máxima, dando valores consistentes, pero demasiado luminosos como para obtener buenas medidas. Dadas estas limitaciones, las condiciones de mayor reproducibilidad apropiadas para la medida se obtienen encendiendo la cámara y la lámpara LED con la luz apagada. Las condiciones de encendido de la cámara siguen siendo importantes dado a que pueden afectar el valor en que se estabilizarán la exposición y balance de blancos. Para asegurarse que el operador no pueda tomar la foto previo a la estabilización de la imagen se agrega un período de espera de 5 s luego de oprimido el botón de captura.

### **9.2.7. Determinación de parámetros de medida de color**

Dada la fácil conversión entre sistemas de colores, se considera el uso de los sistemas RGB, HSV, CYMK y sus derivados. Se toman fotos en iguales condiciones de iluminación de tubos de vidrio en que ocurre la reacción de azul de molibdato, pero con diferentes concentraciones de fósforo. Se mide luego el color promedio de los píxeles del cuadrado inscripto al círculo que rodea cada tubo y se grafican diferentes parámetros en función de la concentración.

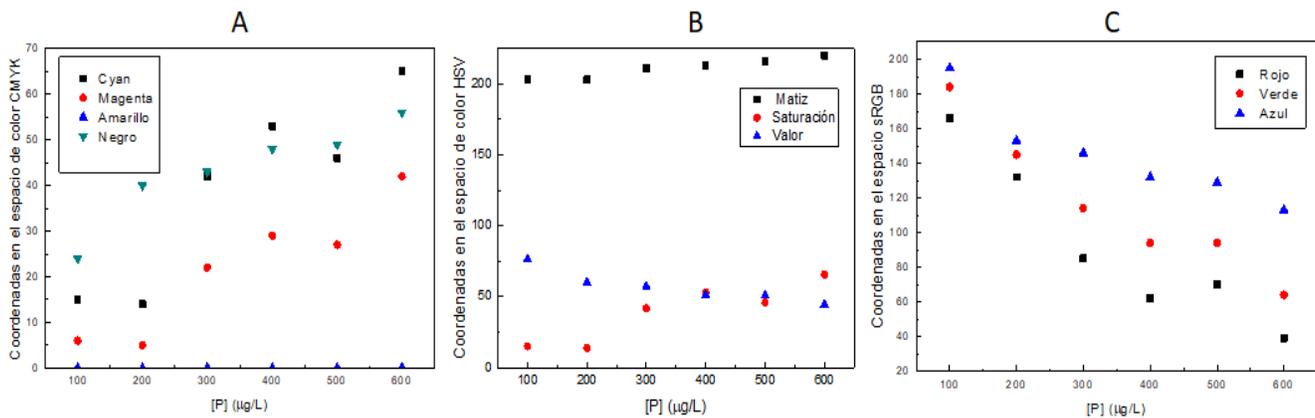
### 9.3. Resultados y discusión

La reacción del molibdato de amonio con el ortofosfato, en medio ácido, genera un complejo característico de color azul, distinguible a simple vista para concentraciones entre 0 y 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 9.5). Esta distinción motiva el desarrollo de un dispositivo que permita medir de forma objetiva y cuantitativa y la concentración del fósforo.



**Figura 9.5.** Colores obtenidos a partir de los tubos de ensayo de 10 cm para concentraciones de 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Uno de los pasos claves para la determinación de la concentración de fósforo consiste en determinar el mensurando que se empleará para correlacionarlo con la concentración. La Figura 9.6 muestra los resultados de la comparación de los sistemas CMYK, HSV y RGB obtenidos de un mismo juego de fotografías.



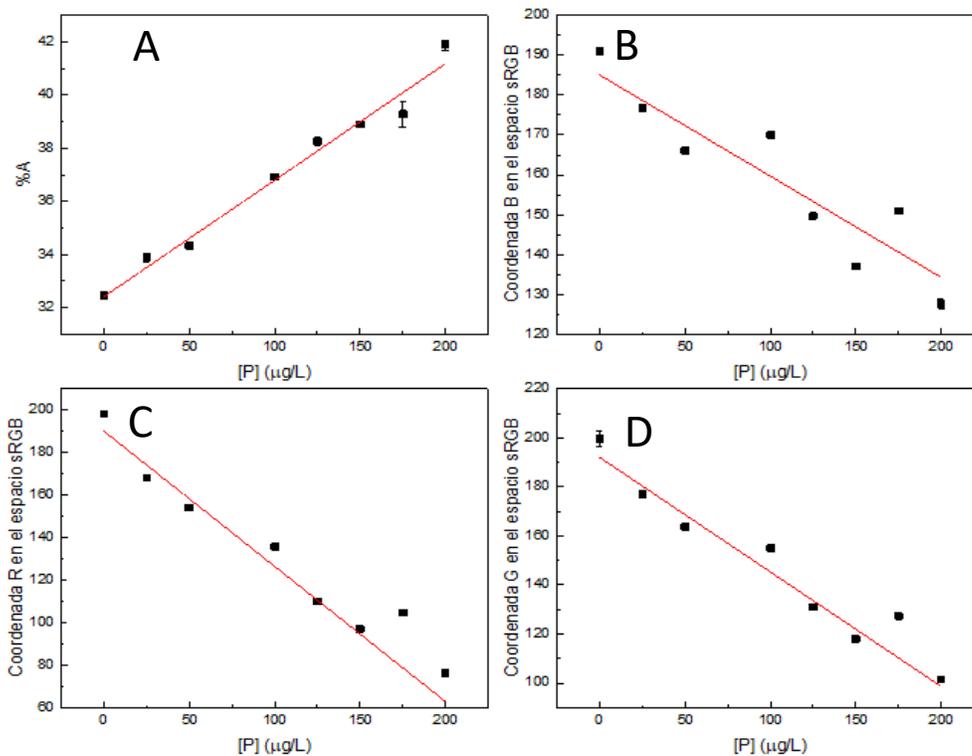
**Figura 9.6.** Gráficas de las coordenadas en los espacios de color CMYK (A), HSV (B), y sRGB (C) obtenidos a partir del mismo conjunto de fotografías de tubos con diferentes concentraciones de fósforo sometidos a la reacción de azul de molibdato.

A partir de estas gráficas es posible descartar el sistema CMYK en todas sus coordenadas (con la excepción del canal Y, el cual se mantiene constante) dado que no permite generar un buen ajuste lineal. Asimismo, este es un sistema sustractivo, por lo que conceptualmente sería más apropiado para el trabajo con pigmentos.

En el sistema HSV, el matiz mostró un comportamiento lineal con la concentración creciente de fósforo. Sin embargo, esta coordenada refiere a la identidad del color de base y los cambios en concentración de un mismo compuesto, generan muy pocos cambios en esta propiedad, resultando en una muy baja sensibilidad. Otras aplicaciones como la determinación del grado de maduración de una fruta hacen mejor uso de este parámetro ya que miden el cambio de un color de base respecto a otro (verde a rojo en el caso de frutillas y algunas manzanas) y no tanto el grado de intensidad de ese color. La saturación y el valor puede dar lugar a resultados erróneos dado que no consideran la identidad del color que está siendo medido.

Finalmente se considera la gráfica basada en el modelo RGB. El espacio de color generado para este modelo es el sRGB dado que es el espacio con el que esta versión de Android trabaja por defecto. En los trabajos discutidos en el capítulo 5, el canal B (azul) de este sistema es el que suele ser utilizado por defecto. Esto tiene sentido conceptual, ya que se está midiendo la aparición del color azul. Sin embargo, bajo el modelo RGB, el matiz está determinado por los tres canales simultáneamente y cada uno de ellos colaboran en la determinación de los demás parámetros visuales de la imagen, incluyendo luminosidad y saturación. Como resultado, el seguimiento del canal azul por si solo resulta insuficiente. De hecho, el

canal verde ajusta mejor al modelo lineal que el canal azul, como se muestra en la Figura 9.7. También se intentó utilizar los sistemas hexadecimal y decimal basados en RGB. No obstante, dado que no son más que formas de escribir los valores de forma consecutiva, las mediciones de decimal y hexadecimal son equivalentes a las de la primera coordenada (rojo) con una muy ligera variación causada por los demás valores.



**Figura 9.7.** Gráficas de porcentaje de azul (%A) (A) y coordenadas B (B), R (C) y G (D) del color obtenido para el mismo conjunto de imágenes de tubos conteniendo diferentes cantidades de fósforo reaccionando con molibdato de amonio y ácido ascórbico. Las barras de error representan dos desviaciones estándar en el conjunto de datos generado obteniendo diferentes agrupaciones de puntos para la misma imagen. Los  $R^2$  de los ajustes lineales son 0.994 para el %A, 0.875 para el canal azul, 0.937 para el canal verde y 0.981 para el canal rojo.

La reacción entre el molibdato de amonio y el fósforo genera un complejo color azul, no obstante, los valores del canal azul disminuyen en lugar de aumentar. Esta aparente inconsistencia se justifica con el hecho de que en el sistema RGB cada canal no solamente da cuenta del color sino también de la luminosidad de la imagen. En otras palabras, si bien el color azul se hace más intenso, la imagen se hace más oscura y por tanto los tres canales RGB disminuyen (Figura 9.7. d). Este efecto no se observa en los sistemas HSV donde la iluminación está asociada al canal V, el cual disminuye (Figura 9.7. b). Sin embargo, como se mencionaba antes, los canales de iluminación, saturación o *value* por sí solos no tienen

información sobre el matiz de la imagen y si se incluye el matiz, la sensibilidad sufre considerablemente ya que por la forma de definirlo en esos sistemas todas las medidas deberían tener el mismo matiz.

Dentro de este contexto, para cuantificar el “aumento de azul” de la imagen se propone considerar la variación relativa del valor del canal B respecto al resto de los canales en el espacio sRGB. Se define el “porcentaje de azul” (%A) como:

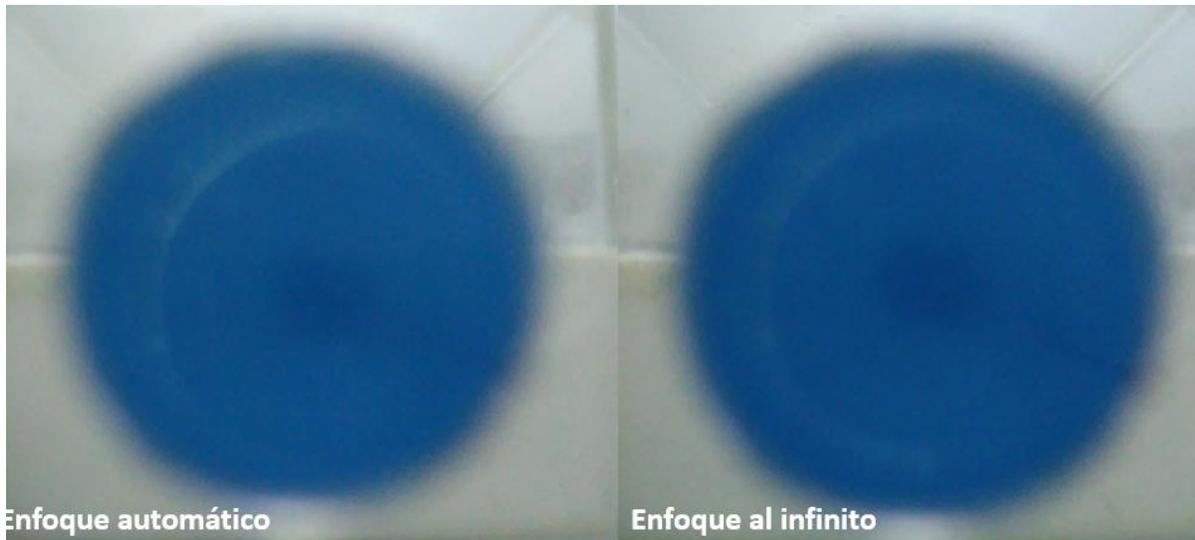
$$\%A = \frac{B}{R+G+B} \quad (9.1)$$

donde R, G y B son los valores rojo, verde y azul respectivamente. Esta medida es comparable a determinar el porcentaje de la contribución del azul en la totalidad de la luz captada. Gracias a que la escala es porcentual y no absoluta, las diferencias en color causadas por un cambio en la iluminación se verán parcialmente compensadas, si asumimos que la iluminación de la imagen se logra con una combinación de los tres canales. Por las razones explicadas en el capítulo 5, los valores posibles para cada una de las coordenadas van de 0 a 255, por lo que un %A de 1 sería una imagen en la que solamente se utiliza el canal azul, mientras que un %A de 0 correspondería a una imagen donde no hay contribución de ese canal.

Para poner a prueba el seguimiento del %A como parámetro, se utiliza otro set de imágenes en un rango de trabajo similar al esperado para muestras reales. Como se esperaba, el porcentaje de azul resulta en datos que se ajustan mejor al modelo lineal y se observa como el valor aumenta con la concentración de fósforo. Dada esta evidencia, es razonable utilizar este parámetro para la determinación de fósforo por encima de los presentados en experimentos similares en la literatura.

### **9.3.1. Determinación de la distancia focal óptima**

El cambio en la distancia focal es una de las fuentes de error a considerar. El enfoque automático no es una opción, dado que dependiendo del color de la muestra y de su opacidad la aplicación puede determinar que el borde del tubo, el líquido o el fondo de la caja sean enfocados, haciendo que se pierda la reproducibilidad. Para evitarlo se determina una distancia focal manualmente y se utiliza siempre la misma configuración en todas fotos. Se elige la opción de “enfoque infinito” (mayor distancia focal posible). En particular se tomó esta opción porque la pérdida de nitidez hace que algunos reflejos de luz en la superficie (que podrían llegar generar artefactos en la medida) se reduzcan considerablemente (Figura 9.8.).



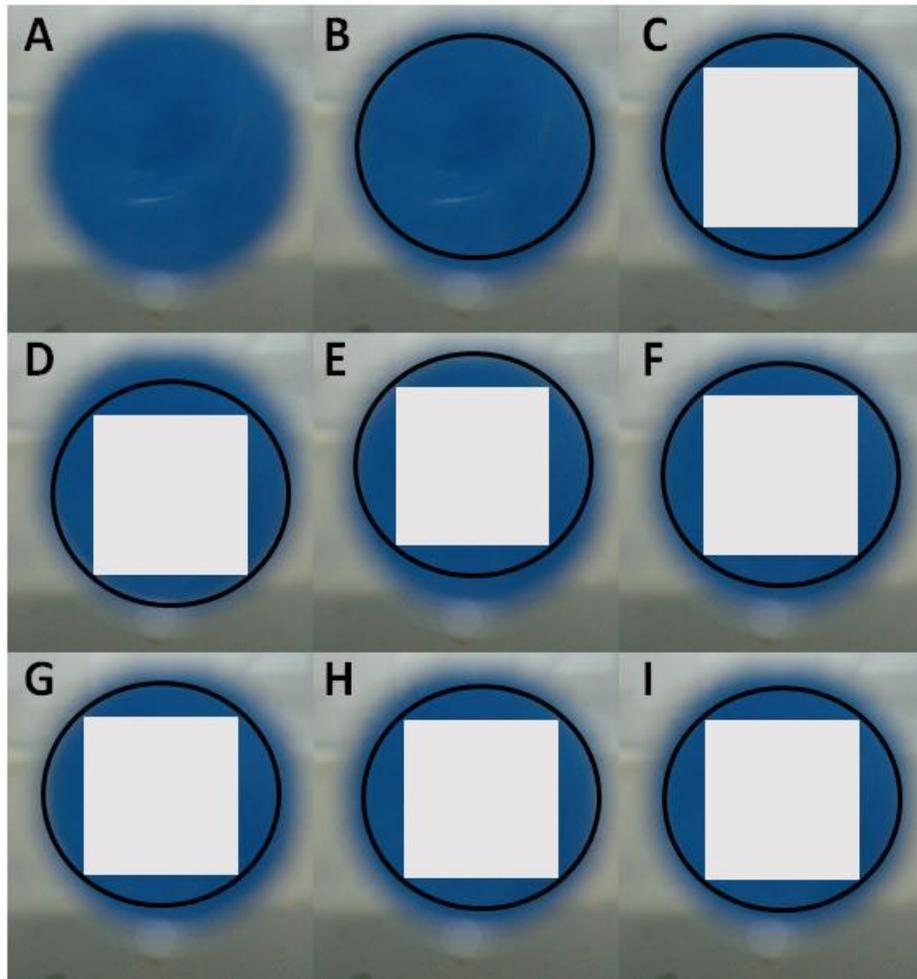
**Figura 9.8.** Fotos de una misma muestra tomadas en el mismo dispositivo con enfoque automático y con la distancia focal máxima.

### 9.3.2. Determinación de las coordenadas de los píxeles medidos

Uno de los problemas con los programas gratuitos para obtención de datos RGB de una imagen es que no necesariamente se sabe cuáles y cuantos píxeles están siendo considerados para determinar el color de la imagen. Asimismo, operar con esta información requeriría coordinar dos aplicaciones diferentes, lo cual tiene sus propias dificultades de implementación. Se determina entonces que se generará una aplicación que obtenga los valores RGB y opere directamente con ellos. Para determinar los píxeles de los que se obtendrá información la aplicación determina un círculo calibrado para coincidir con el tamaño del tubo y luego toma todos los valores de RGB de los píxeles del cuadrado inscripto al círculo<sup>22</sup> (Figura 9.9.).

---

<sup>22</sup> Un cuadrado circunscrito en una circunferencia es el cuadrado cuya diagonal sea de igual al diámetro del círculo.



**Figura 9.9.** A: Imagen de una muestra sin modificaciones, B: con el círculo de selección de píxeles, C, D, E, F, G, H, I: con una representación en gris de los píxeles que estarían siendo considerados para la obtención del porcentaje de azul para diferentes posiciones del círculo.

Uno de los aspectos a evaluar en la selección de píxeles es si esta puede o no afectar el porcentaje de azul, dado que al variar ligeramente la posición del círculo se evalúan distintos píxeles de la imagen. Se maximiza el diámetro del círculo sin que toque el borde del tubo. Se puede entonces utilizar la desviación estándar de los porcentajes de azul en diferentes posiciones como medida de la variabilidad de la curva producto de la correspondiente a la selección de píxeles.

En la Tabla 9.1 se observa se observan medidas de un mismo grupo de muestras con tres posiciones diferentes de la cámara, así como la desviación estándar para cada el porcentaje de azul de una misma muestra. Con excepción de la muestra de  $166 \mu\text{g L}^{-1}$  las fotos en distintas posiciones son concordantes.

**Tabla 9.1.** Tabla mostrando los porcentajes de azul obtenidos para tres posiciones diferentes de una misma imagen y la desviación estándar de las fotos; se utilizan imágenes de tres muestras independientes para cada una de las concentraciones utilizadas (30, 83.3 y 166.6  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). El valor marcado en rojo pasa la prueba de Q, por lo que se lo descarta por no ser concordante con los otros dos valores.

[P] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	% de azul en posición 1	% de azul en posición 2	% de azul en posición 3	Desviación estándar de las distintas posiciones de una misma foto
30.0	22.07	21.88	22.73	0.44
	21.22	19.66	20.76	0.80
	17.45	16.94	19.95	1.61
83.3	56.08	57.74	57.31	0.86
	63.21	64.00	64.03	0.46
	62.07	59.38	61.88	1.50
166.6	116.41	115.32	115.97	0.54
	116.87	117.28	115.86	0.73
	105.02	114.46	104.88	5.49

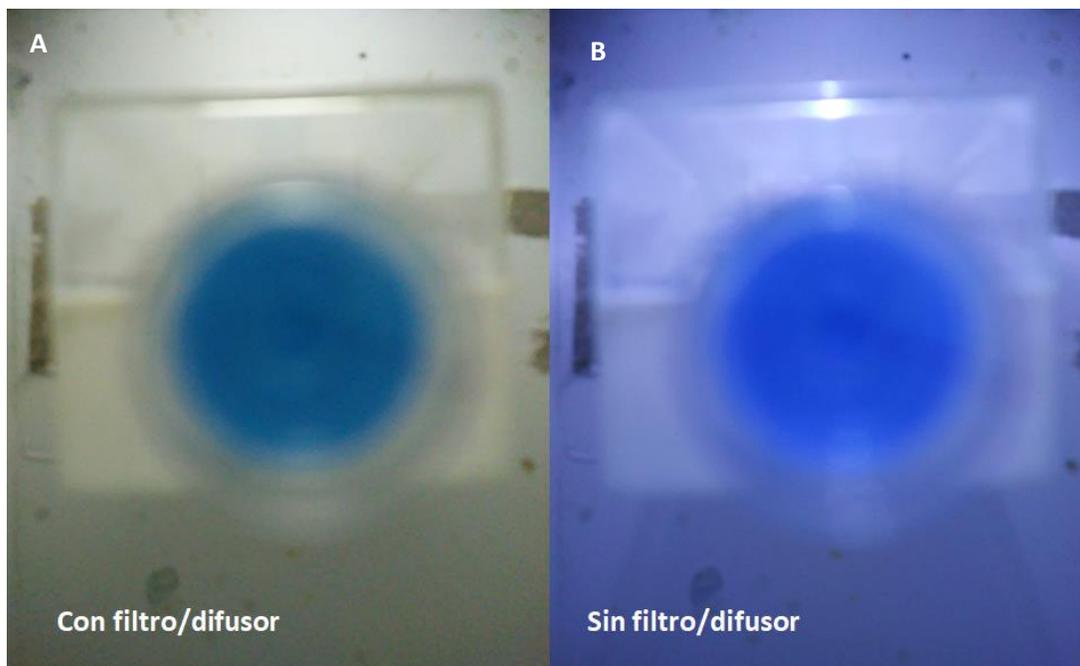
La primera conclusión que puede obtenerse de estos datos es que la posición del círculo no afecta de forma significativa valores obtenidos. Sin embargo, la aparición de reflejos en la imagen debe ser tenidos en cuenta mediante una inspección visual antes de tomar la foto. En este sentido, para el protocolo optimizado se fijan las coordenadas del círculo y el tubo debe ser llenado hasta desborde para minimizar los reflejos en la imagen. También es necesaria una inspección visual para descartar la presencia de reflejos no deseados. Como se mencionó previamente, el ligero desenfoque de la imagen contribuye en este sentido. Adicionalmente, mantener las coordenadas fijas asegura que el operador no ingrese sesgos personales a la hora colocar el círculo, aumentando la reproducibilidad de la técnica para diferentes operadores.

En la Tabla 9.1, también se muestra la necesidad de realizar repeticiones de las medidas. Pese a que la técnica presenta una robustez considerable para sistemas de este tipo, esta no es lo suficientemente alta como para poder tomar una sola medida a la hora de realizar pruebas de campo. Este problema puede mitigarse obteniendo el valor reportado a partir de tres repeticiones promediadas. Tomar más medidas también ayudaría a evitar registrar resultados anómalos. Si se hacen varias medidas, un criterio de selección como la prueba Q puede utilizarse para determinar si los datos que se tiene son o no anómalos. El protocolo resultante implica entonces la toma de medidas hasta que se obtengan tres valores

concordantes a partir de una prueba Q. Estos valores son entonces promediados para obtener el resultado reportado para el análisis. (Conover, 1998).

### 9.3.3. Necesidad de un difusor de luz

La necesidad de colocar un filtro y difusor delante de la lámpara surge por varios motivos. Por un lado, las lámparas blancas tienen un tinte azulado. Esto disminuye la sensibilidad ya que la muestra adquiere un color azulado extra que apantalla el valor de porcentaje de azul debido a la formación del complejo entre el molibdato y el fósforo. Por otro lado, la luz directa refleja y refracta en el tubo generando sombras y punto de fuerte iluminación que aumentan la variabilidad de las medidas. Ejemplos de fotos con y sin el difusor se encuentran la Figura 9.10.



**Figura 9.10.** Imágenes de una misma muestra tomadas con el prototipo original del dispositivo con el filtro/difusor (A) y sin él (B).

### 9.3.4 Determinación del modo de captura de imagen

La reducción de la variabilidad a la hora de la toma de las imágenes a procesar es necesario para que la curva de calibración generada en el laboratorio pueda utilizarse para la interpolación de las medidas obtenidas en el campo. El modo de toma de imagen es una fuente de variabilidad que no puede

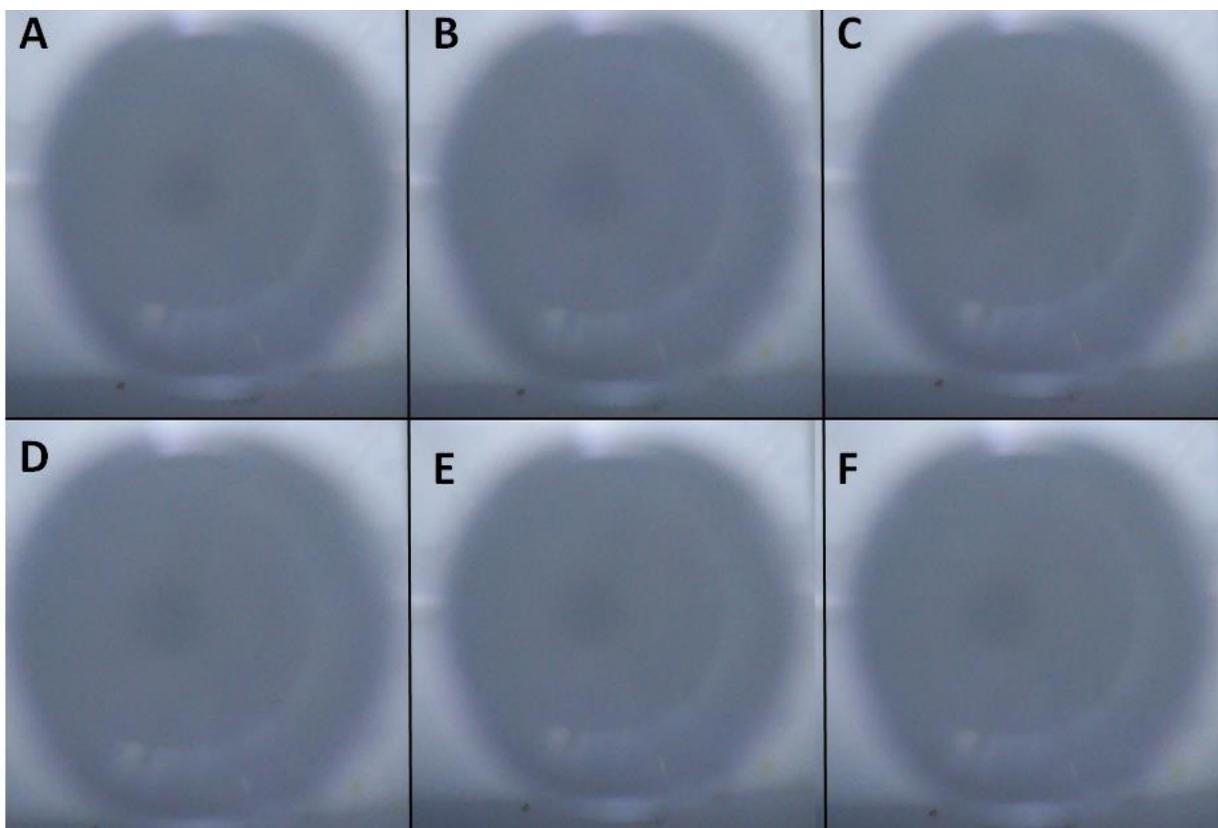
despreciarse. Diferentes combinaciones de *software* y *hardware* pueden llegar a modificar la imagen. A modo de ejemplo, las condiciones utilizadas no soportan el modo NR, por lo que no fue considerado.

La primera prueba exploratoria necesaria para definir el modo óptimo de toma de imagen es una medida de la dispersión de los valores obtenidos. Para esto se toman diez fotos de una misma solución con cada uno de los métodos. Dado que la reacción depende del tiempo, se utilizó un colorante azul en lugar del complejo de fósforo para poder utilizar la misma muestra durante la totalidad del experimento. La tabla 9.2 describe los resultados obtenidos.

**Tabla 9.2.** Promedio de los porcentajes de azul de un colorante y sus correspondientes desviaciones estándar simple (*SD*) y relativa (*rSD*) empleando distintos modos de obtención de imágenes de una muestra de diez fotos de las tomadas a partir de capturas de pantalla (SSH), fotos en modo por defecto (STD), *High Dynamic Range* (HDR) y *Dynamic Range Optimizer* (DRO).

	SSH	HDR	DRO	STD
Promedio de los %Azul	54.34	49.53	49.29	54.16
<i>SD</i>	0.33	0.11	0.09	0.54
<i>rSD</i>	0.01	0.00	0.00	0.01

Un de análisis estadístico de Student revela que las imágenes tomadas con diferentes métodos de captura de imagen pertenecen a poblaciones diferentes. La excepción son las capturas de pantalla y las fotos tomada con la modalidad por defecto, pudiéndose encontrar los p-valores apropiados en la Tabla 12.3 del anexo. Tanto HDR como DRO presentan la menor desviación estándar, así como la menor desviación estándar relativa, lo cual sugiere que son los métodos con menor variabilidad. Sin embargo, luego de realizar varias medidas, se notó que durante en la captura de las fotos, de una misma muestra, algunas de ellas mostraban imágenes visiblemente diferentes. No se encontró una explicación para estas imágenes anómalas. Un ejemplo de esto se presenta en la Figura 9.11. Un operador entrenado puede llegar a distinguir estas sutiles diferencias, sin embargo, es poco clara a simple vista por lo que su identificación y descarte manual es dificultoso.



**Figura 9.11.** Secuencia de fotos de una misma muestra tomadas con el modo HDR de *open camera*, la imagen B constituye una foto aberrante. Se puede distinguir cierta coloración rojiza en varios de los píxeles centrales de la imagen, en comparación al resto de las fotografías.

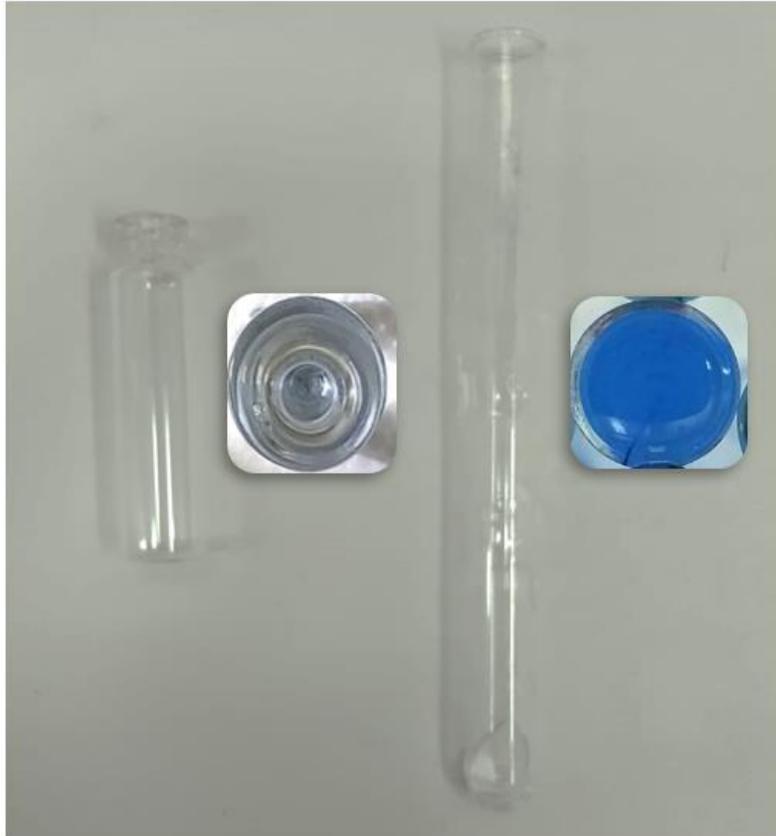
Es posible que estas diferencias estén causadas por ligeros cambios en la iluminación percibida durante el encendido de la cámara y o fluctuaciones en la intensidad de luz de la LED. Sin embargo, no se logró distinguir las causas. Independientemente de la fuente, estas fotos anormales tienen valores de %A sumamente diferentes lo cual lleva a resultados erróneos. Como consecuencia, existe la posibilidad de que dos o tres de las imágenes del set sean aberrantes, lo cual causaría una medida errónea, si no se tiene especial cuidado. Asimismo, tanto DRO como HDR requieren de un procesamiento algorítmico de la imagen, lo cual puede incorporar sesgos difíciles de controlar. Esto es especialmente importante dado que estos procesamientos utilizan píxeles de toda la imagen en lugar de solamente la sección correspondiente al tubo, lo que lleva a que pequeñas manchas de la caja puedan afectar los resultados obtenidos. Una posible solución de este problema podría ser modificando el software para que se realicen varias fotografías y de forma automática mediante algún algoritmo de comparación se discrimine las

imágenes anormales. Sin embargo, la implementación de este sistema complejiza el procesamiento de datos. A los efectos prácticos del presente trabajo se optó por emplear el modo de captura de pantalla.

Tanto la obtención de la foto por captura de pantalla como la foto tomada de la forma usual parecen ser equivalentes. Sin embargo, la captura de pantalla permite hacer un control cualitativo manual de la imagen antes de tomarla, mientras que la toma tradicional tiene un paso de procesamiento que puede generar diferencias entre el color observado y el color de la imagen. La capacidad de controlar manualmente, la inexistencia de fotos aberrantes y la ligera dispersión hacen a la captura de pantalla la mejor forma de obtener las imágenes.

### **9.3.5. Determinación los tubos de medición**

Con el fin de mejorar la sensibilidad de la medida se modifica el largo de los tubos en donde se coloca la muestra. El uso de tubos de mayor longitud intensifica el color. Esto es equivalente a incrementar el paso óptico de una celda espectrofotométrica. Se determina que el punto óptimo entre sensibilidad y facilidad de manipulación corresponde a tubos de 1cm de diámetro y 10 cm de largo. El efecto de modificar el paso óptico puede verse ejemplificado en la Figura 9.12. Desde un punto de vista de la complejidad del análisis, el medir directamente en el tubo Falcon en que se realiza la mezcla sería lo mejor. Desafortunadamente, las dimensiones de estos tubos, así como la refracción de luces que produce el plástico los hacen inadecuados.

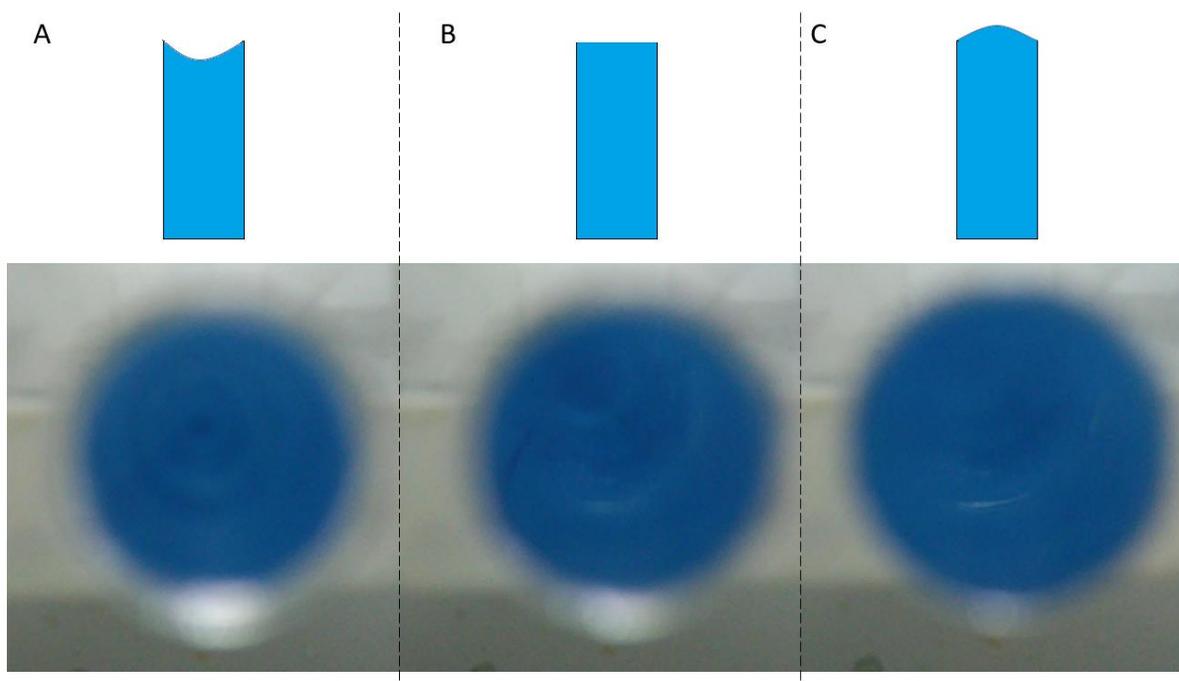


**Figura 9.12.** Tubos de 4 y 10 cm de largo junto a imágenes de una misma solución de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de fósforo obtenidas utilizando esos tubos en iguales condiciones de iluminación

### 9.3.6. Nivel de llenado del tubo de vidrio

Uno de los factores que genera más variabilidad en el porcentaje de azul de la imagen son las sombras y luces producto de la refracción de la luz. Estos se suelen traducir como puntos negros de  $RGB \approx (0,0,0)$  o blancos de  $RGB \approx (255, 255, 255)$ . El efecto de estos puntos es parcialmente mitigado por el uso de un gran número de píxeles cuyo promedio definen el porcentaje de azul de la imagen. Sin embargo, si aparecen en grandes cantidades puede afectar la medida de forma considerable. El borde superior del tubo y la forma de superficie del líquido son los factores que más peso tienen en la aparición de sombras y luces. Se determinan entonces distintos niveles de llenado del tubo y se comparan las sombras y luces resultantes de cada uno. Cuando la superficie del agua en el borde del tubo adquiere forma cóncava (Figura 9.13. A), el fondo del tubo es visible reduciendo las sombras, pero generando círculos negros concéntricos producto de la refracción de la luz en la parte cóncava del tubo. Esto aumentará el porcentaje de azul a bajas concentraciones sin afectar demasiado a altas. Como resultado, se pierde precisión. Dependiendo de la concentración de fósforo, estas líneas pasan a ser más o menos visibles. Cuando el tubo se llena al ras (Figura 9.13.B) siguen apareciendo los círculos concéntricos, pero empiezan a aparecer

también sombras y luces que interferirían con la medida de la imagen. Finalmente, cuando se aprovecha la tensión superficial para obtener una superficie convexa (Figura 9.13. C) las líneas negras desaparecen, quedando solo algunas sombras y luces. El llenado al ras se descarta dado que no es la condición que genera más interferencias lumínicas. Cuando se deja una gota sobre el tubo, aparecen algunas luces, pero estas son más sutiles que las líneas del fondo del tubo por lo que el uso del promedio del porcentaje de azul de cada píxel puede moderar su efecto en mayor medida.

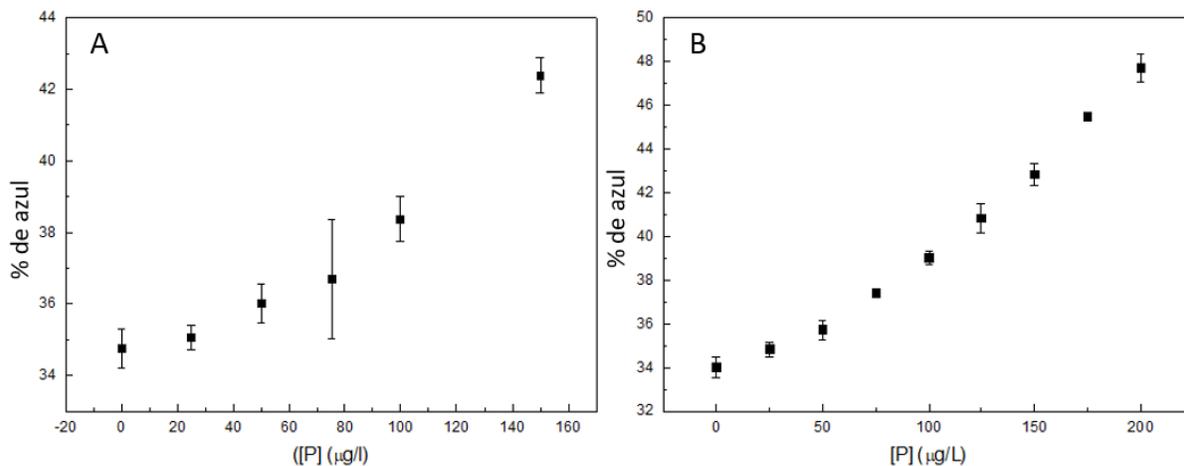


**Figura 9.13.** Esquemas de formas de llenado en función de la forma de la superficie del líquido, acompañados de imágenes representativas tomadas en la caja para cada condición. Se muestran llenados con superficie cóncava (**A**), llenados al ras (**B**), y llenados de superficie convexa (**C**).

### 9.3.7. Control del tiempo

Los análisis de la sección 8.3 muestran la importancia de controlar el tiempo entre medidas. Durante las primeras etapas de optimización de la técnica, en el protocolo inicial de la curva de calibración, se generaban todas las diluciones, se esperaba un cierto tiempo (ca. 10 min) y luego se tomaban las imágenes. Un ejemplo de estas curvas de calibración se observa en la Figura 9.16 A. Si bien la curva muestra el incremento del porcentaje de azul con la concentración del reactivo, tanto el comportamiento

lineal como la desviación estándar de cada punto es mayor a la obtenida con medidas a tiempo constante (Figura 9.14). Este proceso tiene como desventaja un mayor tiempo de espera para construir la curva de calibración, pero mejora de forma significativa la respuesta analítica.

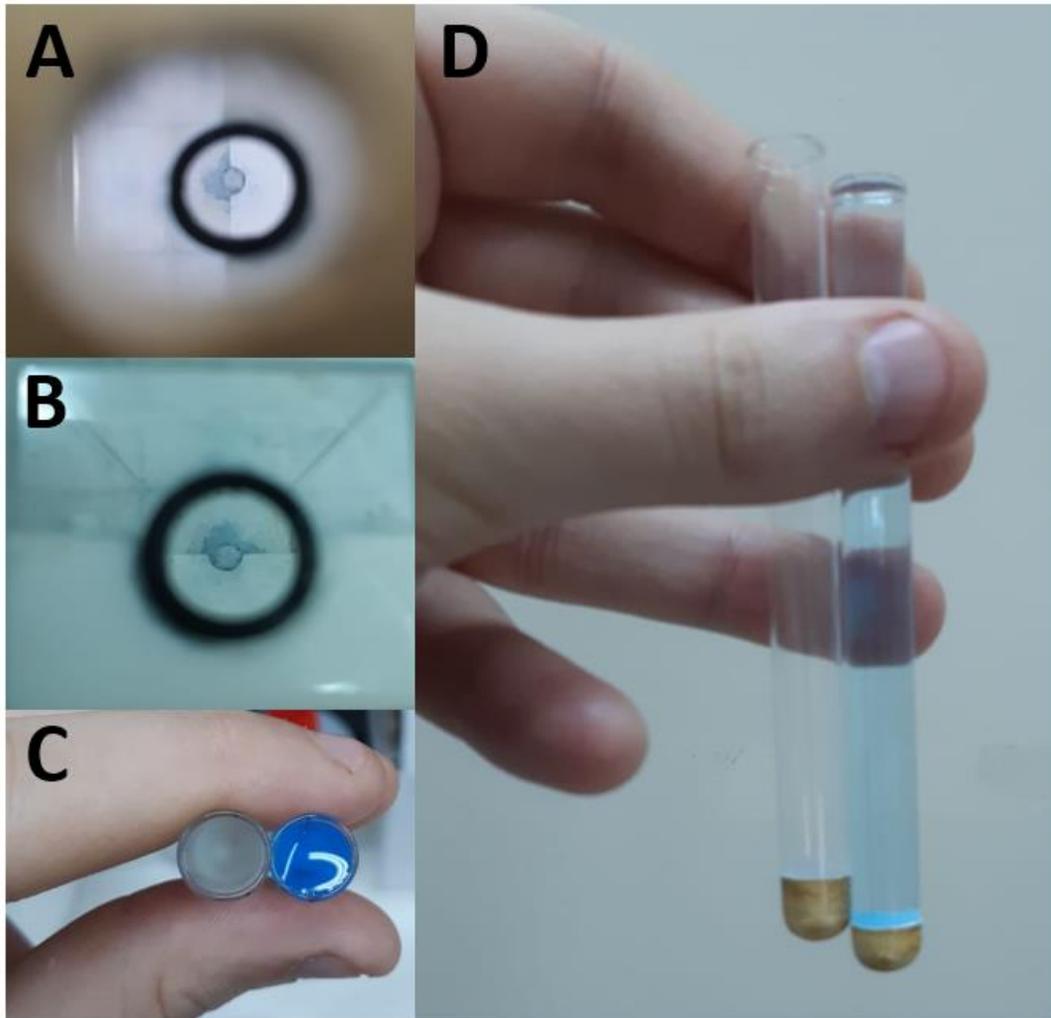


**Figura 9.14.** Curvas de calibración construidas generando todos los puntos primero **(A)** y generando un set de puntos de igual concentración por vez **(B)**.

### 9.3.8. Factores que afectan la linealidad de la técnica a bajas concentraciones

En la imagen 9.14. B se observa que, si bien existe un aumento en el porcentaje de azul, la linealidad se pierde a concentraciones menores a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ . Después de varios ensayos se determina que esto se debe a que luego de varios ensayos, parte del complejo azulado queda adherido al tubo de vidrio mostrando un ligero color azul pálido en el tubo de muestra. Este color solamente es significativo para medidas a concentraciones bajas, ya que a mayor concentración de fósforo el color de la solución se torna más oscuro y azul siendo despreciable el efecto de la contaminación.

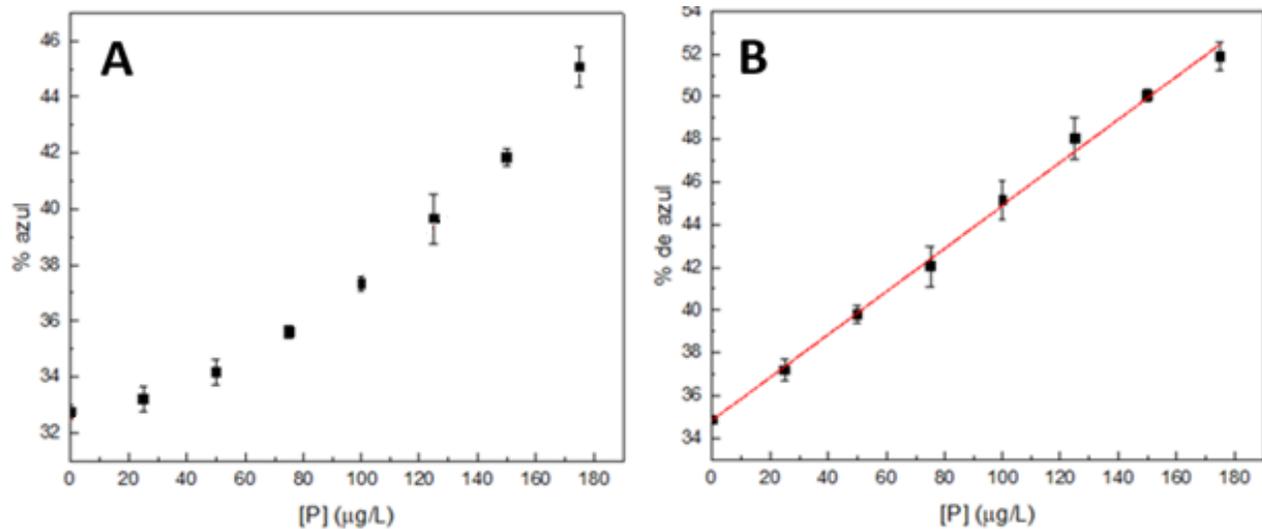
Originalmente, los primeros ensayos se realizaban empleando tubos de vidrio con su base transparente. Sin embargo, el llenado del tubo a desborde generaba que, inevitablemente, algunas gotas cayeran en el fondo de la caja generando el mismo comentado anteriormente. Como solución se opta por modificar los tubos de vidrio (Figura 9.15). Se pinta 1 cm desde el fondo del tubo con pintura blanca y luego se le añaden dos capas de barniz. El barnizado es una parte esencial del proceso ya que la pintura acrílica utilizada se degradaría con las inevitables salpicaduras de agua y muestra. Se optó por un barniz marrón claro, pero dado que el color expuesto a la muestra está dado por la pintura blanca y no por el barniz, sería posible utilizar otros colores.



**Figura 9.15.** Fotos del fondo del soporte de dos prototipos de caja manchados con complejos de fósforo **(A y B)**, vista desde arriba de dos prototipos de tubo modificados, uno de ellos lleno y el otro vacío **(C)** y vista lateral de los mismos tubos **(D)**.

Dado que la mayoría de los jabones utilizados en laboratorio contienen fósforos, se opta originalmente por limpiar los tubos por dilución infinita con agua miliQ. Como se mencionó anteriormente, esta forma de limpieza deja rastros del complejo azul en el tubo, afectando el porcentaje de azul medido, especialmente para concentraciones de fósforo inferiores o iguales a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . Este cambio no es necesariamente visible por observación directa del tubo, pero puede generar diferencias importantes en el color de las imágenes a bajas concentraciones. Con el fin de solucionarlo se determina un protocolo de limpieza que en consiste en realizar cinco lavados con agua a  $100^\circ\text{C}$  y enjuagar con agua MiliQ. Durante este lavado del material es importante secar rápidamente la sección pintada del tubo, ya que el agua a altas temperaturas puede degradar el barniz. Luego de aplicados ambos métodos de remoción de

interferencia, las curvas de calibración pueden ajustarse ahora al modelo lineal en todo el rango de trabajo (Figura 9.16.).

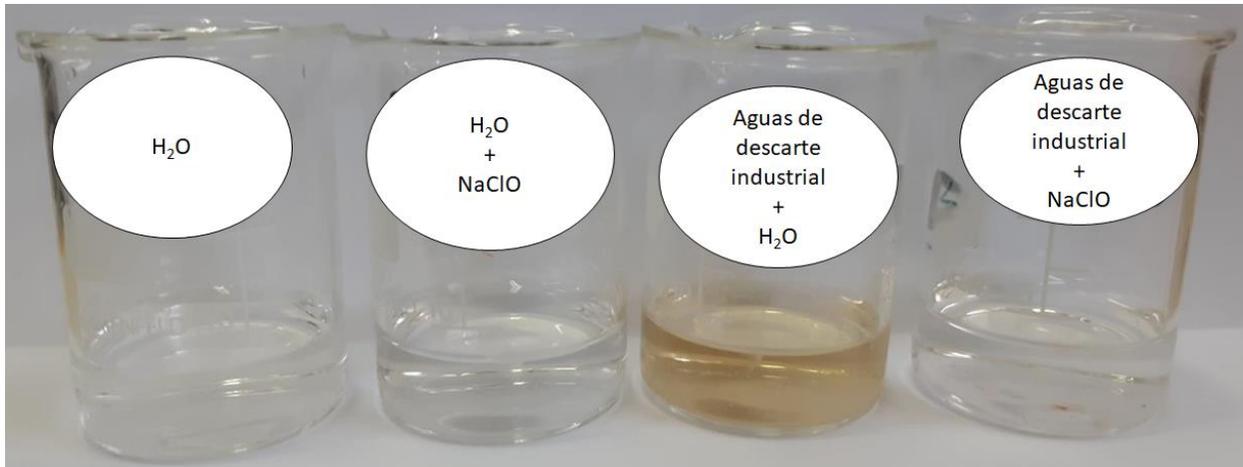


**Figura 9.16.** Curva de calibración generada a partir de las mismas concentraciones con el mismo prototipo sin los métodos de eliminación de interferencia por muestras anteriores (A) y con tubo modificado y limpieza con agua caliente (B). Se utilizan dos desviaciones estándar como error. Si se toma todo el rango de trabajo, la gráfica B se ajusta a la recta  $[P] = 0.07(\%A) + 40.30$  y tiene un  $R^2$  de 0.991. La gráfica A tiene una apariencia parabólica por lo que no se la ajusta a una recta.

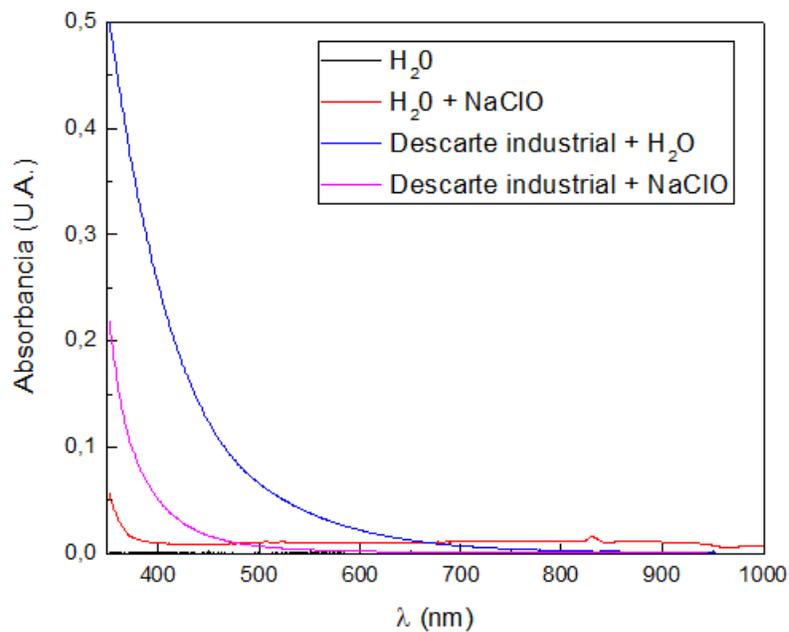
El rango de trabajo para el cual se cumple la linealidad es entre 0 y 175 µg/L (Figura 9.18.). Este rango se encuentra muy por debajo de los límites establecidos para la contaminación de aguas en aguas naturales e industriales (Capítulo 1.2.), por lo que sería posible realizar las medidas de campo con este sistema. Cuando se trabaja con aguas con concentraciones particularmente altas de fosfatos, como pueden ser residuos industriales es probable que haya que hacer diluciones para que las concentraciones de fosfatos entren en el rango de trabajo de la técnica.

### 9.3.9. Tratamiento de muestras coloreadas

Un problema que surge durante la medición de muestras de residuos industriales es que estas aguas pueden tener colores amarillentos. Como resultado, la solución adquiere un color verdoso durante la reacción con molibdato, interfiriendo con la medida y requiriendo un paso de blanqueo. Se intentó realizar una decoloración por medio de hipoclorito de sodio con el fin eliminar la coloración de las muestras. Las imágenes obtenidas luego del blanqueo y los espectros correspondientes se muestran en las Figuras 9.17 y 9.18.



**Figura 9.17.** Muestras de agua y aguas de descarte industrial tratadas con NaClO.



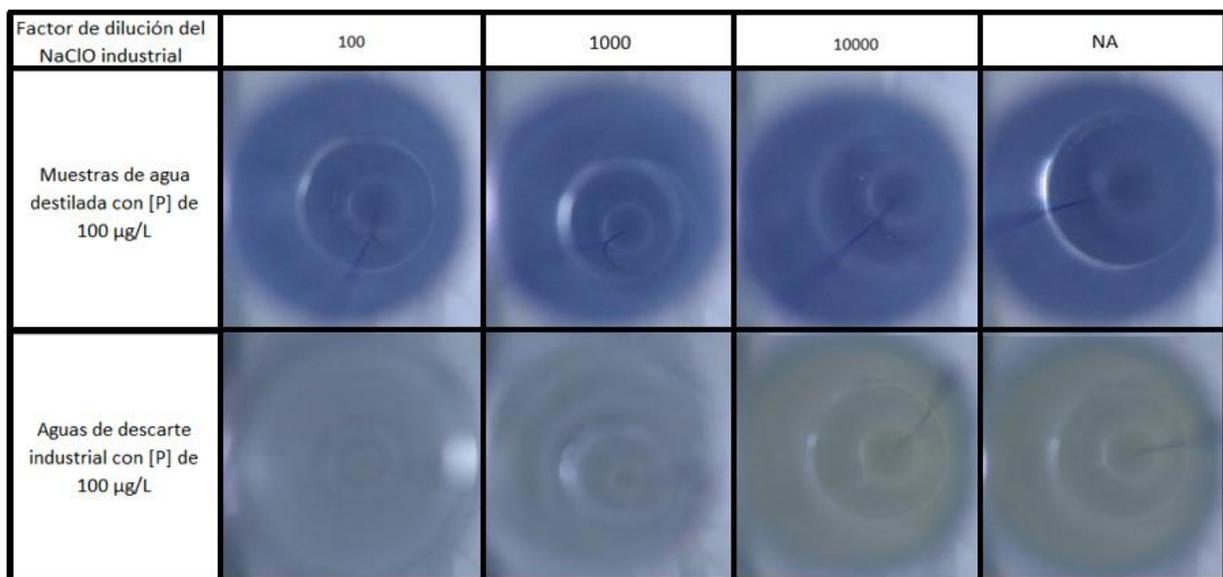
**Figura 9.18.** Espectros de absorbancia de 350 a 1000 nm para muestras de agua, agua con NaClO, aguas de descarte industrial y aguas de descarte industrial con NaClO.

Pese a que los espectros de absorbancia indican que el color no desaparece por completo, es difícil distinguir a simple vista el blanco de las muestras residuales tratadas con hipoclorito. Asimismo, el NaClO modifica el espectro del agua, por lo que es razonable pensar que puede llegar a afectar la muestra.

Para verificar el efecto del NaClO sobre el reactivo combinado se realizan diluciones seriadas de hipoclorito de sodio industrial y se agregan 100 µL de estas diluciones a 5.9 mL de muestras de aguas

industriales amarillas y soluciones de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de fósforo —concentraciones similares a las esperadas para la muestra de aguas industriales—. Se le aplica luego la metodología de medición a estas preparaciones (Tabla 9.3 y 9.4). Desafortunadamente, se observa que, al utilizar hipoclorito de sodio ocurre no solamente una decoloración del amarillo de la muestra, sino que también del complejo de molibdato. Como consecuencia, si se utilizara este blanqueador, se estaría subvalorando la presencia de fósforo en las aguas. En caso de cometer este tipo de errores, existe la posibilidad de que no se realicen intervenciones en un curso de agua que lo requería. Po esta razón, en caso de querer encontrar una forma de blanquear la muestra es necesario probar otro tipo de agente blanqueadores o buscar una forma de neutralizarlos luego de haber terminado el proceso de blanqueado, pero antes de agregar el reactivo combinado.

**Tabla 9.3.** Imágenes obtenidas a partir de una muestra de aguas de descarte industrial y estándar de agua con concentración de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de fósforo, con agregados de 0.1 mL de NaClO industrial a diferentes concentraciones.



**Tabla 9.4.** Valores de porcentaje de azul obtenidos a partir de las muestras de aguas de descarte industrial y estándar de agua con fósforo de la Tabla 9.3.

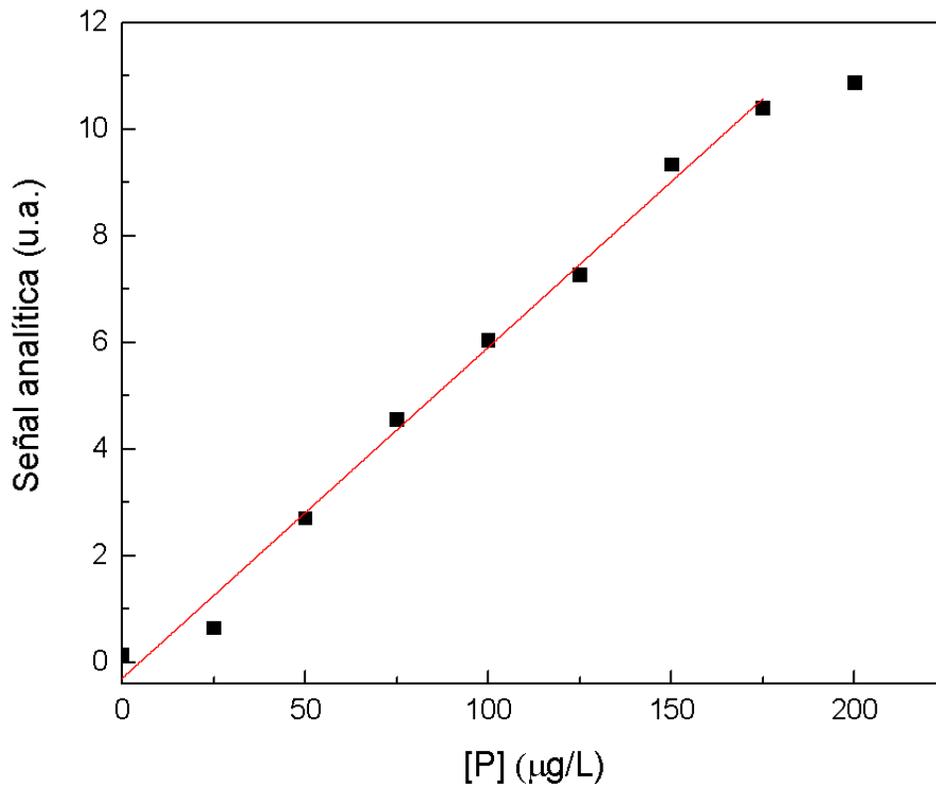
Factor de dilución del NaClO industrial	100	1000	10000	Control
Porcentaje de azul de las muestras de agua destilada con [P] de $100 \mu\text{g/L}$	47.38	47.60	47.19	46.80
Porcentaje de azul de aguas de descarte industrial con [P] de $100 \mu\text{g/L}$	39.06	38.80	35.65	35.28

### 9.3.10. Límite de detección y cuantificación

Como se mostraba en el capítulo 6, existen distintas formas de calcular el límite de detección y cuantificación. La elección del método dependerá de las condiciones experimentales y del criterio arbitrario del analista. Para el caso concreto del presente objeto de estudio se optó por comparar el límite de detección empleando los parámetros de la curva de calibración y el método de repetición de 10 blancos descrito en el capítulo 6.

Es importante señalar que hasta este punto durante las mediciones los puntos de concentración cercano a 0 se han considerado de forma explícita en lugar de ser tratados como un blanco que puede ser restado de la totalidad de la curva. Pese a que el tratamiento de datos utilizado normalmente es el segundo, se considera que no es apropiado en este caso dadas las características de la técnica. Esta metodología tiene una variabilidad considerable pero los puntos de más baja concentración —0 a 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ — son particularmente susceptibles. Esto se debe no solamente a que los errores relativos aumentan cuanto menor es una medida, sino al problema con la limpieza del tubo mencionado en el apartado 9.3.8. Pese a tener un protocolo de limpieza, si este fue exitoso o no es imposible de determinar a simple vista. Independientemente del efecto de la limpieza, la naturaleza misma de la técnica y del uso del porcentaje de azul incrementa el error de las medidas a estas bajas concentraciones. La tabla 9.4 da cuenta de esto, ya que puede observarse cómo el promedio de los blancos da valores distintos de 0 para la señal analítica. Restar el valor a concentración 0 en todos los puntos de la curva implicaría poder medir este valor. No obstante, esta metodología no está adaptada para medir el blanco con precisión. En su lugar se emplea la regresión lineal válida como método de cuantificación en el intervalo entre 50 y 175  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Comparando los valores obtenidos (Figuras 9.19 y 9.20 y Tabla 9.5) se observa que los límites calculados a partir de la curva de calibración son muy similares a los obtenidos a partir de la réplica de blancos — 11.35  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 37.45  $\mu\text{g L}^{-1}$  contra 14.30  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 47.2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente—. La mayor diferencia se encuentra en el límite de detección, siendo un poco menor el obtenido a partir de la curva de calibración. Esta diferencia se atribuye en parte al aumento de la incertidumbre de la medida a bajas concentraciones que introduce una fuente de error adicional que afecta la linealidad de la curva como se describía en el capítulo 9.3.8. En este sentido la medida de las 10 repeticiones del blanco es más representativa del valor real del límite de detección y cuantificación, dado que solamente toma en cuenta la relación entre la señal y el ruido medida para 10 muestras blanco conteniendo el reactivo combinado sin el fósforo.

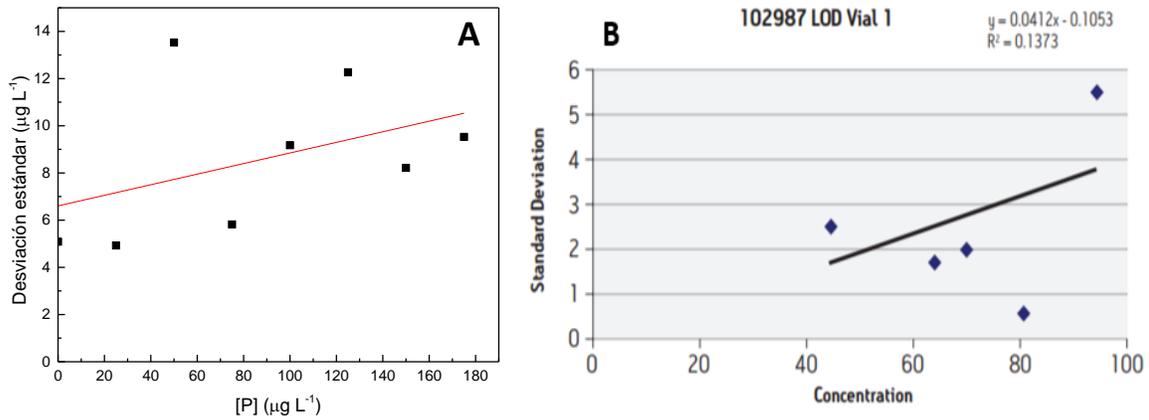


**Figura 9.19.** Curva de calibración empleada para el cálculo del límite de detección y cuantificación, empleando las medidas promedio de 3 muestras. La señal analítica arbitraria se calcula como el porcentaje de azul menos el porcentaje de azul del promedio de 3 medidas de una muestra blanco. El límite de detección y cuantificación, calculado según la ecuación 6.6, empleando la ordenada en el origen como estimativo del blanco, es 11.35 y 37.45  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. La curva sigue un comportamiento lineal cuya ecuación se define como:  $y = (-0.30 \pm 0.24) + (0.0621 \pm 0.0023)x$  y un  $R^2 = 0.992$

**Tabla 9.5.** Medidas de 10 repeticiones del reactivo combinado en ausencia de fósforo, empleadas como blanco para la determinación del límite de detección y cuantificación, empleando la ecuación 6.5.

<b>Concentración de fósforo interpolado en la curva de calibración (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	
	4.82
	3.02
	3.91
	0.35
	0.18
	1.65
	6.24
	-0.02
	9.01
	1.86
<b>Promedio</b>	3.10
<b>SD</b>	2.79
<b>LD</b>	<b>14.30</b>
<b>LC</b>	<b>47.20</b>

La metodología planteada por la ERA da resultados similares a los anteriores  $19.8 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $66 \mu\text{g L}^{-1}$  para el límite de detección y cuantificación, respectivamente. Puede pensarse que el valor de  $R^2 = 0.046$  es alarmantemente bajo (Figura 9.20.A), no obstante, este valor no es tenido en cuenta por el método, de forma similar al mostrado en la curva de ejemplificación dada por la ERA (Figura 9.20.B). Independientemente del resultado empírico razonable, no queda clara la ventaja analítica de este método. Si bien la determinación de la desviación del blanco es más representativa dado que se emplean muchos más puntos y a distintas concentraciones la baja correlación lineal hace que el valor de la ordenada en el origen sea muy sensible a cambios en los valores de la curva. En otras palabras, la pendiente de la regresión lineal puede variar de forma significativa si se modifica un solo valor.



**Figura 9.20. A)** Gráfica de desviación estándar en función de la concentración de fósforo. Para mantener la coherencia de los resultados, se utiliza la misma curva de calibración que para la figura 9.19.; se ignora sin embargo el punto de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  dado que no es considerado en esa figura y dificulta la lectura de este gráfico. La recta obtenida por mínimos cuadrados tiene la ecuación:  $y = (0.022 \pm 0.019) x + (6.6 \pm 2.0)$  y un  $R^2 = 0.189$ . Utilizando la metodología de la ERA, estos valores se corresponden con un  $LD = 20 \mu\text{g L}^{-1}$  y un  $LC = 66 \mu\text{g L}^{-1}$ . **B)** Gráfica mostrada por la ERA a modo de ejemplo en la ficha de descripción de su método de cálculo de  $LD$  y  $LC$ , adaptada de (McHale, 2012).

La mayoría de los métodos descritos para el cálculo de  $LC$  y  $LD$  pueden realizarse directamente, sin embargo, esto no ocurre para la metodología de la EPA. Las técnicas oficiales de la DINAMA desprecian el efecto matriz, sin embargo, sigue siendo necesario determinar la relación señal/ruido. Partiendo del valor de  $LD$  de  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ , se utiliza la señal analítica de ese punto como el valor de señal (Tabla 9.6). Esta relación es de 9.50, por lo que se utilizan los valores de la tabla 9.5 y se aplica la ecuación 6.7 para obtener el nuevo  $LD$ , tomando  $S = 2.79$ ,  $\bar{X} = 3.10$  y  $t_{(n-1, \alpha-1=0.99)} = 2.821$ , se calculan los valores:  $LD = 10.97 \mu\text{g L}^{-1}$  y un  $LC = 32.91 \mu\text{g L}^{-1}$ . Estos límites son razonables, sin embargo, para muchas aplicaciones un valor  $p$  de 0.01 para la elección del valor de la prueba de Student puede ser demasiado estricto. Asimismo, el valor de  $10.97 \mu\text{g L}^{-1}$  para el límite de detección puede abrir las puertas a falsos positivos, dada la variabilidad de la técnica a bajas concentraciones. Si bien un buen criterio para elegir el valor del límite de cuantificación y detección sería el valor más grande de todos, teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se opta por tomar como referencia los valores calculados a partir de la repetición de los blancos siendo estos  $14.30 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $47.20 \mu\text{g L}^{-1}$  para el  $LD$  y  $LC$  respectivamente.

En el capítulo 12.3. anexo se resumen los diferentes métodos empleados conjuntamente con el cálculo estimativo a partir del método basado en el error relativo de la regresión. Estos valores no se incluyeron en la discusión porque suelen emplearse simplemente como estimativos (Rajacović et al., 2012). Su cálculo puede encontrarse en el capítulo 12.3. y muestra como los valores similares a los obtenidos por el método de la ERA, posiblemente sobrevalorando ligeramente la respuesta del sensor.

**Tabla 9.6.** Promedio de señal analítica de tres valores de una muestra de  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ , la desviación estándar de esas medidas y la relación señal ruido.

Promedio de la señal analítica	Desviación estándar	Relación: señal/ruido
2.32	0.24	9.50

### 9.3.11. Validación

En conjunto con comparación de las medidas con la técnica espectrofotométrica, se participó del ejercicio de validación de la ERA con uno de los prototipos iniciales de la caja de medición. Dado el vencimiento de las muestras implicadas, los datos de la validación son solamente aplicables a ese prototipo y no al dispositivo final. De forma paralela se realizaron medidas por UV-Vis empleando la técnica oficial de la DINAMA descrita en el capítulo 8 y medidas electroquímicas siguiendo un protocolo previamente desarrollado por el Laboratorio de Biomateriales.

Los ensayos de recuperación arrojaron un resultado aceptable, respecto a la medida de control de la ERA, pero cerca del rango límite y por eso lleva la leyenda de “Warning”, pero es satisfactorio analíticamente (Figura 9.21). Este ensayo también puede utilizarse como una forma de evaluar la exactitud de la técnica a partir del cálculo del porcentaje de recuperación (Tabla 9.7). Con respecto a los demás laboratorios participantes estuvo una recuperación relativa del 114%. Lo cual indica que la técnica, aunque satisfactoria, tiene un sesgo positivo, es decir que en el peor de los casos estaría sobrevalorando la concentración de fósforo. Desde un punto de vista práctico esto es preferible a un falso negativo, por las causas ya mencionadas en el capítulo 6.

**Figura 9.21.** Resultados del ejercicio de evaluación conjunta de la ERA para un prototipo de la caja de medición colorimétrica.

Group Summary		Method Details	
<b>Your Reported PT Result</b>	<b>2.43</b>	<b>Other</b>	
<b>Your z Score</b>	<b>2.53</b>	Robust Mean	2.12
<b>Your Performance Evaluation</b>	<b>Warning</b>	SDPA	0.105
<b>Relative Recovery</b>	<b>114 %</b>	Data Points	30
<b>Reported Method</b>	BIOM-COLOR-101	Satisfactory Range	1.91 - 2.33
Formulation/Certified Value	2.13 mg/L	Average Percent Recovery	99.5%
Uncertainty of Certified Value	0.257 %	Relative Standard Deviation	4.96%
Assigned Value (X)	2.14	Percent Acceptable	86.7%
Robust Mean	2.14	<b>Your Method z Score</b>	<b>2.96</b>
SDPA	0.114	<b>Your Method Evaluation</b>	<b>Warning</b>
Satisfactory Range	1.91 - 2.37		
Average Relative Recovery	101 %		
Relative Standard Deviation	5.33 %		
Percent Acceptable	92.7 %		
Number of Data Points	152		

**Tabla 9.7.** Concentración de fósforo determinada por colorimetría durante en ejercicio de evaluación conjunta de la ERA, valor reportado por la ERA y porcentaje de recuperación durante el ejercicio.

[P] determinada por colorimetría (mg L <sup>-1</sup> )	[P] de la muestra (mg L <sup>-1</sup> )	Porcentaje de recuperación
2.43	2.14	114%

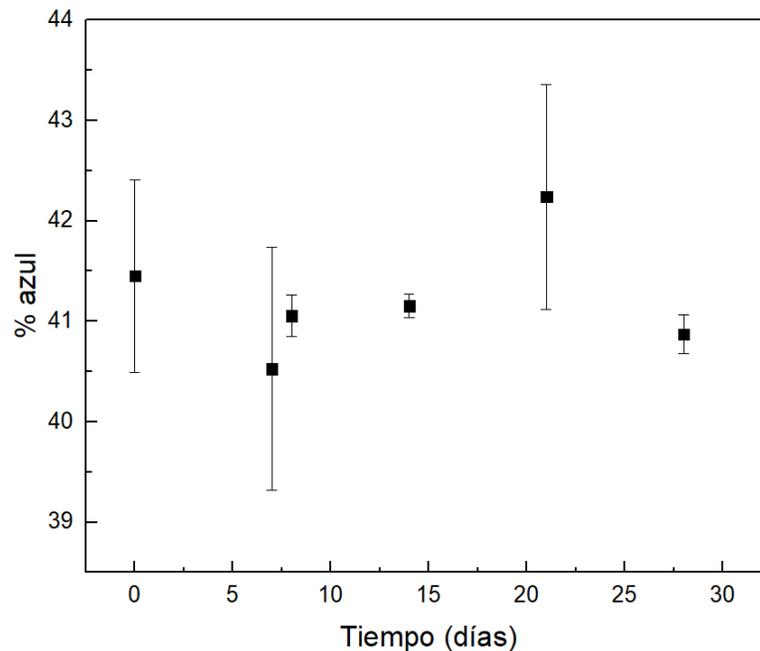
Por su parte la comparación con las medidas electroquímicas y por UV-Vis, empleando la misma muestra problema, mostraron una coincidencia en los resultados si se considera un intervalo de dos veces el valor de la desviación estándar de cada medida (Tabla 9.8.).

**Tabla 9.8.** Comparación de las medidas de fósforo de una misma muestra compleja empleando 3 técnicas diferentes

	<b>UV-Vis</b>	<b>Electroquímica</b>	<b>Smartphone</b>
	<b>[P] (mgL<sup>-1</sup>)</b>	<b>[P] (mgL<sup>-1</sup>)</b>	<b>[P] (mgL<sup>-1</sup>)</b>
	2.1295	2.1642	2.6426
	2.1226	2.3554	2.2841
	1.9647	2.0950	2.3585
<b>Promedio</b>	2.07	2.20	2.43
<b>SD</b>	0.14	0.09	0.19

### 9.3.12. Estabilidad del reactivo combinado

Un factor que aumenta considerablemente la variabilidad es la preparación del reactivo combinado. Dentro de este proceso, la poca estabilidad del ácido ascórbico es probablemente uno de los factores que más error aportan a la medida. Una forma de reducir drásticamente estos errores es la preparación de un solo lote de reactivo combinado para cada curva de calibración. Esta mezcla tiene una estabilidad de no más de cuatro horas a temperatura ambiente (EPA, 1978), sin embargo no se encontraron estudios de la estabilidad de este reactivo estando congelado. Para esto se preparó una partida de reactivo combinado manteniendo las mismas concentraciones, pero con el volumen de la técnica original (diez veces superior al utilizado para el resto de las mediciones). Esta partida fue alícuotada de a 1.1 mL y congelada en tubos Eppendorf. En paralelo se prepara una solución estándar de fósforo de  $90 \mu\text{g L}^{-1}$  que se conserva en heladera. Cada semana realizan tres medidas de la solución de fósforo utilizando el reactivo congelado. Los resultados de la Figura 9.23 muestran los porcentajes de azul obtenidos para la misma muestra de fósforo en el correr de un mes. Originalmente, se esperaba poder realizar este experimento durante un período de tiempo más extenso, pero dificultades relacionadas a la situación sanitaria por el COVID forzaron la interrupción de estas medidas.



**Figura 9.23.** Porcentaje de azul alícuotas de una misma muestra medida en diferentes días utilizando alícuotas congeladas de reactivo combinado del mismo lote.

Pese a que la variabilidad de las medidas varía con el día, todas las barras de error se superponen. Asimismo, no se observa una tendencia descendiente significativa. Esto indica que todas las alícuotas de reactivo combinado utilizadas son equivalentes. Se puede entonces decir que el RC se mantiene estable congelado por un mínimo de un mes. Es difícil estimar cuanto puede llegar a durar este reactivo en buen estado, sin embargo, el hecho de poder realizar una curva de calibración cada mes es una mejora significativa con respecto a los métodos que requieren hacer para cada análisis.

### **9.3.13. Limitantes de la técnica**

Pese a todas sus ventajas, la técnica sigue teniendo limitaciones. En particular su dificultad para la medición de muestras coloreadas. Se observó que el NaClO industrial es capaz de blanquear las muestras, sin embargo, interfiere con la medida al interactuar con el complejo de fósforo y molibdato. En el futuro sería deseable explorar otros agentes blanqueadores o encontrar formas de neutralizarlos luego de haber eliminado la coloración de la muestra, pero antes del agregado de reactivo combinado.

Asimismo, sería posible modificar esta técnica para poder detectar otros analitos. Aquellos que puedan ser identificados a partir de reacciones que den coloraciones verdes o rojas son particularmente prometedoras, ya que la medida de porcentaje de azul utiliza es muy fácilmente intercambiable por medidas de porcentaje de rojo o verde. La portabilidad del equipo abre también la posibilidad a la medición en lugares remotos, donde transportar un espectrofotómetro no es una opción posible.

## 10. Conclusiones y perspectivas futuras

Se desarrolló una técnica de medición de fósforo descentralizada a partir de un teléfono celular inteligente. Se utilizó la cámara del teléfono como colorímetro para seguir la reacción de azul de molibdato e interpolar los resultados en una curva de calibración fijada previamente.

Las imágenes son procesadas a partir de una aplicación prototipo que determina los valores RGB promedio de un conjunto predeterminado de píxeles de la imagen. A partir de estos valores se calcula el porcentaje de azul de cada pixel y los resultados se promedian para determinar el color de la imagen.

El porcentaje de azul promedio de la imagen es directamente proporcional a la concentración de fósforo en la muestra entre los  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $175 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los parámetros de esta curva de calibración se cargan a la aplicación con la preparación de cada tanda de reactivo combinado, el cual sobrevive congelado por lo menos 30 días a partir de su preparación. En conjunto con la aplicación creada, se utiliza un programa open source (*open camera*) para poder fijar los parámetros pertinentes durante la toma de fotografías, aumentando la robustez de la técnica.

Se construye una caja acrílica a prueba de agua, en la que el visor de la cámara del *Smartphone* queda alineado con la boca del tubo de vidrio en el que ocurrirá la reacción, permitiendo mantener fija la posición de la cámara en relación con la muestra.

Finalmente, se diseña un protocolo para el uso del dispositivo, que incluye el tratamiento *in situ* de la muestra, control del tiempo de reacción y forma de llenado apropiada del tubo de vidrio. Se incluye también el lavado con agua caliente del tubo de vidrio para impedir que restos de muestra permanezcan unidos al tubo, sobreestimando los resultados de las siguientes mediciones.

El resultado de este proceso es un sistema de muy bajo costo para la toma de medidas de fósforo en lagos y cursos de agua en el rango de trabajo y con la exactitud necesaria para estudios de control ambiental. Hoy en día, la mayoría de las técnicas para la medición de fósforo *in situ* requieren la preparación de curvas de calibración en para cada día de medida o controles regulares a partir de la medición de un punto intermedio. El primer caso implica un costo operativo considerable, dado el mayor gasto de reactivos en comparación con este sistema. Asimismo, el no requerir curvas de calibración, este sistema permite que la medición sea realizada por personas sin entrenamiento en laboratorios, aumentando la accesibilidad del método. Los equipos actuales resuelven este problema a través de la automatización, la cual requiere incluso menos trabajo por parte del operador, pero aumenta en gran medida los costos iniciales y de mantenimiento del equipo.

Dada su sencillez, esta técnica también tiene potencial a nivel educativo, ya sea secundario o terciario, donde análisis rápidos y de bajo costo pueden facilitar diversas prácticas y trabajos de campo. Asimismo, existe una potencial veta comercial en la venta de la caja y aplicación, las cuales son fáciles de producir y almacenar.

## 11. Referencias

- Achkar, M., Domínguez, A., & Pesce, F. (2013). *Cuencas hidrográficas del Uruguay: Situación y perspectivas ambientales y territoriales*. Programa Uruguay Sustentable, Redes Amigos de la Tierra.
- Alicia, F., Peralta, A. G., Ibáñez, F., & Rodríguez, P. (2014). Calidad sensorial y físico-química de manzana Mondial Gala proveniente de producción integrada, orgánica y convencional. *Serie de Actividades de Difusión, INIA Las Brujas, N°*.
- Alvarado, C. E. (2010). *Validación de un método espectroforométrico para la cuantificación de fósforo disponible en muestras de suelo* [Tesina de Grado]. Facultad de Ciencias y Tecnologías, UNAN, Nicaragua.
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*, 25(4), 704-726.
- Ansín, A., Galiotta, G., Botasini, S., & Méndez, E. (2019). Lead analysis in paints for high impact control in homes. *Analytical Methods*, 11(33), 4254-4259.
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews*, 29(Suppl 1), S49-S52.
- Asheim, J., Kvittingen, E. V., Kvittingen, L., & Verley, R. (2014). A simple, small-scale Lego colorimeter with a light-emitting diode (LED) used as detector. *Journal of chemical education*, 91(7), 1037-1039.
- Athanasopoulos, P., Dering, B., Wiggett, A., Kuipers, J.-R., & Thierry, G. (2010). Perceptual shift in bilingualism: Brain potentials reveal plasticity in pre-attentive colour perception. *Cognition*, 116(3), 437-443.
- Aubriot, L. E., Delbene, L., Haakonsson, S., Somma, A., Hirsch, F., & Bonilla, S. (2017). Evolución de la eutrofización en el Río Santa Lucía: Influencia de la intensificación productiva y perspectivas. *INNOTEC*, 14 jul-dic, 07-16. <https://doi.org/10.26461/14.04>
- Baadenhuijsen, H., Seuren-Jacobs, H., & Jansen, A. (1977). Continuous-flow determination of serum inorganic phosphate with a single reagent—The vanadomolybdate method re-evaluated. *Clinical chemistry*, 23(7), 1275-1280.
- Barberis, E., Ajmone-Marsan, F., & Arduino, E. (1998). Determination of phosphate in solution at different ionic composition using malachite green. *Communications in soil science and plant analysis*, 29(9-10), 1167-1175.
- Barnett, W. B., & Kahn, H. L. (1972). Comparison of atomic fluorescence with atomic absorption as an analytical technique. *Analytical Chemistry*, 44(6), 935-939.
- Barrows, J. N., Jameson, G. B., & Pope, M. T. (1985). Structure of a heteropoly blue. The four-electron reduced. Beta.-12-molybdophosphate anion. *Journal of the American Chemical Society*, 107(6), 1771-1773.
- Baykov, A. A., Evtushenko, A., & Avaeva, S. M. (1987). *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 171,266-270 (1988) A Malachite Green Procedure for Orthophosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme Immunoassay*.

- Bazzano, A. (2017). 4015UY: Determinación de fósforo disponible en suelos. En *Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales*. DINAMA.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (s. f.). *Neuroscience: Exploring the Brain, 3rd Edition*.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2016). *Neuroscience: Exploring the Brain*. Wolters Kluwer.
- Berlin, B., & Kay, P. (1991). *Basic Color Terms: Their Universality and Evolution*. University of California Press.
- Bernal, C., Palacin, C., Boronat, A., & Imperial, S. (2005). A colorimetric assay for the determination of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase activity. *Analytical Biochemistry*, 337(1), 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.10.011>
- Boers, P., Van Ballegooijen, L., & Uunk, J. (1991). Changes in phosphorus cycling in a shallow lake due to food web manipulations. *Freshwater Biology*, 25(1), 9-20.
- Bonilla, S. (2009). *Cianobacterias planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión*. Programa hidrológico Internacional de la UNESCO para América Latina y el Caribe.
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., León, L. D., Brena, B., Pérez, M., Piccini, C., Escalera, G. M. de la, Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F., & Aubriot, L. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *INNOTEC, 10 ene-dic*, 9-22.
- Broggi, E. (2017). 4014UY: Determinación de fósforo total en aguas y efluentes. En *Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales*. DINAMA.
- Buss, J. E., & Stull, J. T. (1983). [2] Measurement of chemical phosphate in proteins. En *Methods in enzymology* (Vol. 99, pp. 7-14). Elsevier.
- Bustos López, O. N., Coto Fuentes, H., Valdés Perezgasga, F., & Alonso Chamarro, J. (2013). Microsistema para la determinación colorimétrica de cobalto utilizando tecnología LTCC. *Ingeniería Electrónica, Automática y Comunicaciones*, 34(2), 76-85.
- Cacho, C., Rodríguez, A., Navatta, M., Risso, J., Saona, G., & Yafalián, M (2019). *Programa de Monitoreo de Cuerpos de Agua de Montevideo. Informe Anual 2019*. IMM.
- Caivano, J. L., & López, M. A. (2009). *Color: Ciencia, artes, proyecto y enseñanza. Argencolor 2004*. Editorial Nobuko.
- Carey, P. (2009). *New Perspectives on Creating Web Pages with HTML, XHTML, and XML*. Cengage Learning.
- Carrasco Leister, L., Berreta Blanco, A., & Eguren, G. (2014). Primer mapa nacional de la calidad de agua de Uruguay. *Revista INIA, N° 39*, 67.
- Castillo Aguilar, B., & González Hernández, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1), 0-0.
- Chapman, H. D., Pratt, P. F., Vanselow, A., Bradford, G., Whiting, L. D., & Contin, A. (1973). *Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas*.

- Chorro, E., Perales, E., Viqueira, V., Gómez, O., Martínez-Verdú, F. M., Ferrero, A., & Campos Acosta, J. (2016). *Caracterización colorimétrica de muestras fluorescentes con un espectrofluorímetro modular con irradiación/emisión direccional*. <https://doi.org/10.13039/501100003329>
- Clausen, D. F., & Shroyer, J. H. (1948). Molybdenum Blue Reaction. *Analytical Chemistry*, 20(10), 925-926. <https://doi.org/10.1021/ac60022a016>
- Clinton-Bailey, G. S., Grand, M. M., Beaton, A. D., Nightingale, A. M., Owsianka, D. R., Slavik, G. J., Connelly, D. P., Cardwell, C. L., & Mowlem, M. C. (2017). A lab-on-chip analyzer for in situ measurement of soluble reactive phosphate: Improved phosphate blue assay and application to fluvial monitoring. *Environmental science & technology*, 51(17), 9989-9995.
- Cochlan, W. P., Herndon, J., & Kudela, R. M. (2008). Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae*, 8(1), 111-118.
- College of Natural Resources, University of Idaho. (2009). *Accuracy and Bias*. [https://www.webpages.uidaho.edu/veg\\_measure/Modules/Lessons/Module%20\(Sampling\)/2\\_3\\_Accuracy\\_and\\_bias.htm](https://www.webpages.uidaho.edu/veg_measure/Modules/Lessons/Module%20(Sampling)/2_3_Accuracy_and_bias.htm)
- Conover, W. J. (1998). *Practical nonparametric statistics* (Vol. 350). John Wiley & Sons.
- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. *Journal of environmental quality*, 27(2), 261-266.
- Cronin, T. W., & Marshall, N. J. (1989). Multiple spectral classes of photoreceptors in the retinas of gonodactyloid stomatopod crustaceans. *Journal of Comparative Physiology A*, 166(2), 261-275.
- Daily News. (2019). *Why are tigers orange?* Daily News. <http://www.dailynews.lk/2019/06/03/tc/187207/why-are-tigers-orange>
- Dartnall, H. J. A. (1953). THE INTERPRETATION OF SPECTRAL SENSITIVITY CURVES. *British Medical Bulletin*, 9(1), 24-30. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a074302>
- De Jonge, V. N., Elliott, M., & Orive, E. (2002). Causes, historical development, effects and future challenges of a common environmental problem: Eutrophication. En E. Orive, M. Elliott, & V. N. De Jonge (Eds.), *Nutrients and Eutrophication in Estuaries and Coastal Waters* (pp. 1-19). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2464-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2464-7_1)
- De Nigris, A. (2017). 4012UY: Determinación de Fósforo reactivo suspendido o disuelto en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales. En *Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales*. DINAMA.
- Delgado-González, M., Carmona-Jiménez, Y., Rodríguez-Dodero, M., & García-Moreno, M. (2018). *Color Space Mathematical Modeling Using Microsoft Excel*.
- Dick, W., & Tabatabai, M. (1977). Determination of orthophosphate in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. *Journal of Environmental Quality*, 6(1), 82-85.
- DINAMA. (2019). *Indicadores*. Observatorio Ambiental I MVOTMA. <https://www.dinama.gub.uy/oan/indicadores/>

- Ding, C., Gu, J., Ma, X., Gao, F., & Li, Y. (2013). *Target recognition in different color spaces*. 151-155.
- Dodds, W. K., Bouska, W. W., Eitzmann, J. L., Pilger, T. J., Pitts, K. L., Riley, A. J., Schloesser, J. T., & Thornbrugh, D. J. (2009). *Eutrophication of US freshwaters: Analysis of potential economic damages*.
- Dosal, M. A., & Villanueva, M. (2008). Introducción a la metrología química: Curvas de calibración en los métodos analíticos. *Antología De Química Analítica Experimental*, 18-25.
- Duarte, C. M., Conley, D. J., Carstensen, J., & Sánchez-Camacho, M. (2009). Return to Neverland: Shifting baselines affect eutrophication restoration targets. *Estuaries and Coasts*, 32(1), 29-36.
- Duffy, G., & Reagan, F. (2012). Recent Developments in Sensing Methods for Eutrophying Nutrients with a Focus on Automation for Environmental Applications. *Analyst*. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>
- Ebuele, V. O., Congrave, D. G., Gwenin, C. D., & Fitzsimmons-Thoss, V. (2018). Development of a cobalt electrode for the determination of phosphate in soil extracts and comparison with standard methods. *Analytical Letters*, 51(6), 834-848.
- Ekman, P., & Jager, O. (1993). Quantification of Subnanomolar Amounts of Phosphate Bound to Seryl and Threonyl Residues in Phosphoproteins Using Alkaline Hydrolysis and Malachite Green. *Analytical Biochemistry*, 214(1), 138-141. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1468>
- El Observador. (2019). Internet móvil en Uruguay: Cuántos se conectan desde el celular y los que quedan afuera. *El Observador*. <https://www.elobservador.com.uy/nota/internet-movil-en-uruguay-cuantos-se-conectan-desde-el-celular-y-los-que-quedan-afuera-201935144359>
- El País. (2019). *El avance de la marea verde*. Diario EL PAIS Uruguay. <https://www.elpais.com.uy/informacion/politica/avance-marea-verde.html>
- EPA. (1978). *Method 365.3: Phosphorus, all forms (colorimetric, ascorbic acid, two reagents)*. EPA.
- Failde, A., Lanzilotta, B., Perdomo, C., Bidegain, M. P., & Rosas, F. (2015). *INSTRUMENTOS FISCALES PARA EL CONTROL Y LA REDUCCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN EN CURSOS DE AGUA Estudio aplicado a la Cuenca del Río Santa Lucía*.
- Feng, J., Chen, Y., Pu, J., Yang, X., Zhang, C., Zhu, S., Zhao, Y., Yuan, Y., Yuan, H., & Liao, F. (2011). An improved malachite green assay of phosphate: Mechanism and application. *Analytical Biochemistry*, 409(1), 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.10.025>
- Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem*, 66(2), 375-400.
- Fogg, A. G., Bsebsu, N. K., & Birch, B. J. (1981). Differential-pulse anodic voltammetric determination of phosphate, silicate, arsenate and germanate as  $\beta$ -heteropolymolybdates at a stationary glassy-carbon electrode. *Talanta*, 28(7), 473-476. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(81\)80071-9](https://doi.org/10.1016/0039-9140(81)80071-9)
- Frank, C., Schroeder, F., Ebinghaus, R., & Ruck, W. (2006). A fast sequential injection analysis system for the simultaneous determination of ammonia and phosphate. *Microchimica Acta*, 154(1-2), 31-38.
- Galano, A., & Rojas, A. (2017). *Sustancias patrones para estandarización de ácidos y base*. Universidad Autónoma Metropolitana.

[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOCUMENTOPATRONESPRIMARIOSACIDOBASE\\_34249.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/DOCUMENTOPATRONESPRIMARIOSACIDOBASE_34249.pdf)

García de Souza, M., Rocha, B., Gallo, A., Galván, G., Borjes, A., & Zaccari, F. (2012). Comportamiento agronómico y calidad de poblaciones locales de zanahoria en el sur del Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 16.

Gegenfurtner, K. R., Bloj, M., & Toscani, M. (2015). The many colours of 'the dress'. *Current Biology*, 25(13), R543-R544. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.043>

Gibbons, R. D. (1996). The problem with US EPA's method detection limit. *American Environmental Laboratory*, 8, 4-42.

Giedrė Vaičiulaitytė. (2017). You'll Be Amazed How People With Color Blindness See The World (57 Pics). *Bored Panda*. <https://www.boredpanda.com/different-types-color-blindness-photos/>

Granzier, J. J., & Gegenfurtner, K. R. (2012). Effects of memory colour on colour constancy for unknown coloured objects. *i-Perception*, 3(3), 190-215.

Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., & Eaton, A. D. (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. Published by American public health association 18th edition Washington, DC. *Library congress ISBN 0-87553-207-1*.

Grupo Altavista Lab & Trend. (2015, octubre 22). ILUSIONES ÓPTICAS. *Grupo Altavista Lab & Trend*. <https://www.grupoaltavista.com.uy/ilusiones-opticas/>

Guanghan, L., Xiaogang, W., Yanhua, L., & Shenlai, Y. (1999). Studies on 1: 12 phosphomolybdic heteropoly anion film modified carbon paste electrode. *Talanta*, 49(3), 511-515.

Hamilton, S. K., Bruesewitz, D. A., Horst, G. P., Weed, D. B., & Sarnelle, O. (2009). Biogenic calcite-phosphorus precipitation as a negative feedback to lake eutrophication. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 66(2), 343-350.

Hansen, T., & Gegenfurtner, K. R. (2006). Color scaling of discs and natural objects at different luminance levels. *Visual neuroscience*, 23(3-4), 603.

Harden, S. M., & Nonidez, W. K. (1984). Determination of Orthophosphate by Flow Injection analysis with Amperometric Detection. *Analytical Chemistry*, 56, 2218-2223.

Hardy, J. L., Frederick, C. M., Kay, P., & Werner, J. S. (2005). Color naming, lens aging, and grue: What the optics of the aging eye can teach us about color language. *Psychological science*, 16(4), 321-327.

harrysgoldbootsyndrome. (2015). *Whoa wow wow!*  
<https://web.archive.org/web/20150227014959/http://swiked.tumblr.com/post/112073818575/guys-please-help-me-is-this-dress-white-and>

Haygarth, P. M., & Sharpley, A. (2000). Terminology for phosphorus transfer. *Journal of environmental quality*, 29(1), 10-15.

- He, Z., & Honeycutt, C. W. (2005). A Modified Molybdenum Blue Method for Orthophosphate Determination Suitable for Investigating Enzymatic Hydrolysis of Organic Phosphates. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(9-10), 1373-1383. <https://doi.org/10.1081/CSS-200056954>
- Heisler, J., Gilbert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dorch, q., Gobler, C. J., Heil, C. A., humphrites, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H. G., Sellner, K., Stockwell, D. a., Stoeker, D. K., & Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmfull Algae*, 8(1). <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.006>
- Holman, W. (1943). A new technique for the determination of phosphorus by the molybdenum blue method. *Biochemical Journal*, 37(2), 256-259.
- Hosker, B. S. (2018). Demonstrating Principles of Spectrophotometry by Constructing a Simple, Low-Cost, Functional Spectrophotometer Utilizing the Light Sensor on a Smartphone. *Journal of Chemical Education*, 95(1), 178-181.
- Huang, X.-L., & Zhang, J.-Z. (2008). Kinetic spectrophotometric determination of submicromolar orthophosphate by molybdate reduction. *Microchemical Journal*, 89(1), 58-71.
- Hunter, R. S. (1942). Photoelectric Tristimulus Colorimetry with Three Filters\*. *Journal of the Optical Society of America*, 32(9), 509-538. <https://doi.org/10.1364/JOSA.32.000509>
- International Electrotechnical Commission. (1999). IEC 61966-2-1, 1999. *Multimedia systems and equipment—Colour measurements and management—Part, 2-1*.
- Irving, H. M. N. H., Freiser, H., & West, T. S. (2017). *Compendium of Analytical Nomenclature: Definitive Rules 1977* (Pergamon Press Ltd.). Elsevier.
- ISO. (2008). *ISO 11664-1: Colorimetry—Part 1: CIE standard colorimetric observers* (p. 34).
- Jones, L. A., & Condit, H. R. (1941). The brightness scale of exterior scenes and the computation of correct photographic exposure. *JOSA*, 31(11), 651-678.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Jessell, D. of B. and M. B. T., Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. J. (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4). McGraw-hill New York.
- Khaled, E., Hassan, H. N. A., Girgis, A., & Metelka, R. (2008). Construction of novel simple phosphate screen-printed and carbon paste ion-selective electrodes. *Talanta*, 77(2), 737-743.
- Kılıç, V., Alankus, G., Horzum, N., Mutlu, A. Y., Bayram, A., & Solmaz, M. E. (2018). Single-image-referenced colorimetric water quality detection using a smartphone. *ACS omega*, 3(5), 5531-5536.
- Knagge, K., & Raftery, D. (2002). Construction and evaluation of a LEGO spectrophotometer for student use. *The Chemical Educator*, 7(6), 371-375.
- Konica Minolta. (2018, septiembre 14). What is CIE 1976 Lab Color Space? *Konica Minolta Color, Light, and Display Measuring Instruments*. <https://sensing.konicaminolta.asia/what-is-cie-1976-lab-color-space/>
- Konica Minolta. (2020). *Medidor Konica Minolta CR-200 Chroma*. eBay. <https://www.ebay.es/itm/Konica-Minolta-CR-200-Chroma-Meter-/232216584216>

- Kościelniak, P. (1999). Nonlinear calibration by the standard addition method. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 47(2), 275-287.
- Kröckel, L., Lehmann, H., Wieduwilt, T., & Schmidt, M. A. (2014). Fluorescence detection for phosphate monitoring using reverse injection analysis. *Talanta*, 125, 107-113.
- Kuehni, R. G. (2002). The early development of the Munsell system. *Color Research & Application: Endorsed by Inter-Society Color Council, The Colour Group (Great Britain), Canadian Society for Color, Color Science Association of Japan, Dutch Society for the Study of Color, The Swedish Colour Centre Foundation, Colour Society of Australia, Centre Français de la Couleur*, 27(1), 20-27.
- Kuntzleman, T. S., & Jacobson, E. C. (2016). Teaching Beer's law and absorption spectrophotometry with a smart phone: A substantially simplified protocol. *Journal of Chemical Education*, 93(7), 1249-1252.
- Lado, J., Vicente, E., Manzoni, A., Ghelfi, B., & Ares, G. (2012). Evaluación de calidad de fruta y aceptabilidad de diferentes cultivares de frutilla. *Agrociencia Uruguay*, 16(1), 51-58.
- Lagos, P. S. (2015). *Cómo motivar a los estudiantes mediante actividades científicas atractivas: Construcción de un espectroscopio*. IES Vicenta Ferrer Escribá.  
<https://www.cac.es/cursomotivar/resources/document/2010/4.pdf>
- Landa, E., & Fairchild, M. (2005). Charting Color from the Eye of the Beholder. *American Scientist - AMER SCI*, 93. <https://doi.org/10.1511/2005.55.975>
- Legiret, F.-E., Sieben, V. J., Woodward, E. M. S., Bey, S. K. A. K., Mowlem, M. C., Connelly, D. P., & Achterberg, E. P. (2013). A high performance microfluidic analyser for phosphate measurements in marine waters using the vanadomolybdate method. *Talanta*, 116, 382-387.
- Ma, J., Li, Q., & Yuan, D. (2014). Loop flow analysis of dissolved reactive phosphorus in aqueous samples. *Talanta*, 123, 218-223.
- Maeda, K., Himeno, S., Osakai, T., Saito, A., & Hori, T. (1994). A voltammetric study of Keggin-type heteropolymolybdate anions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 364(1-2), 149-154.  
[https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)02936-C](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)02936-C)
- Matuszewski, B., Constanzer, M., & Chavez-Eng, C. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical chemistry*, 75(13), 3019-3030.
- McHale, W. (2012). *A better approach to calculation limits of detection and limits of quantitation*. Era, A Waters Company.
- Meija, J., Pagliano, E., & Mester, Z. (2014). Coordinate swapping in standard addition graphs for analytical chemistry: A simplified path for uncertainty calculation in linear and nonlinear plots. *Analytical chemistry*, 86(17), 8563-8567.
- Midgley, D. (1986). Sulfate and phosphate ion-selective electrodes. *Ion-Selective Electrode Reviews*, 8(1), 3-54.
- Milligan, P. R., Morse, M. P., & Rajagopalan, S. (1992). Pixel map preparation using the HSV colour model. *Exploration Geophysics*, 23(1-2), 219-223.

Moonrungssee, N., Pencharee, S., & Jakmunee, J. (2015). Colorimetric analyzer based on mobile phone camera for determination of available phosphorus in soil. *Talanta*, *136*, 204-209.

Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, *27*, 31-36.

Murphy, T., Hall, K., & Yesaki, I. (1983). Coprecipitation of phosphate with calcite in a naturally eutrophic lake. *Limnology and Oceanography*, *28*(1), 58-69.

Murray, P. R., Kobayashi, G. S., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (1998). *Medical Microbiology*. Mosby.

MVOTMA. (2015). *Plan de acción para la protección del agua en la cuenca del Santa Lucía*. MVOTMA.

Myers, W. (1979). Interactive Computer Graphics: Flying High-Part I. *Computer*, *7*, 8-17.

Nagul, E. A., McKelvie, I. D., Worsfold, P., & Kolev, S. D. (2015). The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Analytica Chimica Acta*, *890*, 60-82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.030>

Nausch, M., Nausch, G., Lass, H. U., Mohrholz, V., Nagel, K., Siegel, H., & Wasmund, N. (2009). Phosphorus input by upwelling in the eastern Gotland Basin (Baltic Sea) in summer and its effects on filamentous cyanobacteria. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *83*(4), 434-442.

Newman, E. A., & Hartline, P. H. (1982). The infrared "vision" of snakes. *Scientific American*, *246*(3), 116-127.

Newton, I. (1952). *Opticks, or, a treatise of the reflections, refractions, inflections & colours of light*. Courier Corporation.

Nikerson, D. (1946). *Color Measurement and It's Applications to the Grading of Agricultural Products*.

Nixon, M., Outlaw, F., MacDonald, L. W., & Leung, T. S. (2019). *The importance of a device specific calibration for smartphone colorimetry*. *2019*(1), 49-54.

Observador, E. (2019). *Hubo 29% menos de turistas que en enero de 2018*. El Observador. <https://www.elobservador.com.uy/nota/hubo-29-menos-de-turistas-que-en-enero-de-2018-pero-gastaron-mas--201921111441>

Ohta, N., & Robertson, A. (2006). *Colorimetry: Fundamentals and Applications* (Wiley). <https://www.wiley.com/en-us/Colorimetry%3A+Fundamentals+and+Applications-p-9780470094730>

Olano, H., Martigani, F., Somma, A., & Aubriot, L. (2019). Wastewater discharge with phytoplankton may favor cyanobacterial development in the main drinking water supply river in Uruguay. *Environmental monitoring and assessment*, *191*(3), 146.

*Open Camera Help v1.48.3*. (2020). [https://opencamera.sourceforge.io/help.html#dro\\_vs\\_hdr](https://opencamera.sourceforge.io/help.html#dro_vs_hdr)

Patey, M. D., Rijkenberg, M. J., Statham, P. J., Stinchcombe, M. C., Achterberg, E. P., & Mowlem, M. (2008). Determination of nitrate and phosphate in seawater at nanomolar concentrations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *27*(2), 169-182.

- Plataniotis, K., & Venetsanopoulos, A. N. (2000). *Color Image Processing and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Prensa UDELAR. (2020). *Cianobacterias: Estudios del Este al Litoral Norte | Portal Universidad de la República*. <http://www.universidad.edu.uy/prensa/renderItem/itemId/44122>
- Prien, R. D. (2007). The future of chemical in situ sensors. *Marine Chemistry*, *107.3*, 422-432. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2007.01.014>
- Rajaković, L. V., Marković, D. D., Rajaković-Ognjanović, V. N., & Antanasijević, D. Z. (2012). The approaches for estimation of limit of detection for ICP-MS trace analysis of arsenic. *Talanta*, *102*, 79-87.
- Rao, D. S., Quilliam, M. A., & Pocklington, R. (1988). Domoic acid—A neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, *45(12)*, 2076-2079.
- RAPAL Uruguay. (2010). *Contaminación y eutrofización del agua: Impactos del modelo de agricultura industrial*. RAPAL Uruguay.
- Ritchie, R. J., Trautman, D. A., & Larkum, A. (1997). Phosphate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* R-2 PCC 7942. *Plant and cell physiology*, *38(11)*, 1232-1241.
- Roberson, D., Hanley, J. R., & Pak, H. (2009). Thresholds for color discrimination in English and Korean speakers. *Cognition*, *112(3)*, 482-487.
- Rodríguez, S. C. (2016). Variaciones estacionales de las concentraciones de fosfatos y nitratos en distintas fuentes de aguas de pequeños productores hortícolas. *Agrotecnica*, *24*, 30-34.
- Rodríguez, E. M. (2005). Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario jurídico y económico escurialense*, *38*, 315-331.
- Rubin, A. (2009). *Statistics for Evidence-Based Practice and Evaluation*. Cengage Learning.
- Schanda, J. (2007). CIE colorimetry. *Colorimetry: Understanding the CIE system*, 25-78.
- Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L. R., & van Nes, E. H. (1997). On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology*, *78(1)*, 272-282.
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, *195(4275)*, 260-262.
- Schindler, David W. (2006). Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *Limnology and oceanography*, *51(1part2)*, 356-363.
- Servisaberlo. (2017). Pese a la presencia de cianobacterias, playas de Punta del Este y Maldonado están habilitadas. *PuntaDelEsteInternacional.com*. <https://puntadelesteinternacional.com/pese-a-la-presencia-de-cianobacterias-playas-de-maldonado-estan-habilitadas/>
- Sharma, G., & Bala, R. (2017). *Digital Color Imaging Handbook*. CRC Press.
- Sharpe, L. T., Stockman, A., Jägle, H., & Nathans, J. (1999). Opsin genes, cone photopigments, color vision, and color blindness. *Color vision: From genes to perception*, 3-51.

- Simone, P. (2017). 4013UY: Determinación de fósforo total en aguas naturales y tratadas, aguas residuales domésticas e industriales; método espectrofotométrico. En *Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales*. DINAMA.
- Song, Y., Bian, C., Yang, L., Tong, J., & Xia, S. (2016). Electrochemical Determination of Phosphate in freshwater Free of Silicate Interference. *Journal of Biomedical Sciences*, 5(2:13). <https://doi.org/10.21767/2254-609X.100027>
- Stadler, P., Loken, L., Crawford, J., Schramm, P., Sorsa, K., Kuhn, C., Savio, D., Striegl, R., Butman, D., & Stanley, E. (2017). Ship-borne measurements of microbial enzymatic activity: A rapid biochemical indicator for microbial water quality monitoring. *EGUGA*, 4014.
- Stone, M. (2016). *A Field Guide to Digital Color*. CRC Press.
- Subrayado. (2019, febrero 22). Con las cianobacterias, cae venta de pescado en Montevideo. *subrayado.com.uy*. <https://www.subrayado.com.uy/con-las-cianobacterias-cae-venta-pescado-montevideo-n527157>
- Taha, S., Rafat, G., Aboshosha, F., & Mansour, F. R. (2017). A simple homemade spectrophotometer. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(2), 239-242. <https://doi.org/10.1134/S1061934817020113>
- Toledo, F. (2018, noviembre 13). La importancia en la selección de colores mostrada con una ilusión óptica. *Federico Toledo*. <https://www.federico-toledo.com/la-importancia-en-la-seleccion-de-colores-mostrada-con-una-ilusion-optica/>
- Torre, R. D. de la. (2007). *Probabilidad y Estadística para Ciencias e Ingenierías*. Delta Publicaciones.
- Trainer, V. L., Eberhart, B.-T. L., Wekell, J. C., Adams, N. G., Hanson, L., Cox, F., & Dowell, J. (2003). Paralytic shellfish toxins in Puget Sound, Washington state. *Journal of Shellfish Research*, 22(1), 213-223.
- USEPA. (2016). *Definition and procedure for the determination of the method detection limit, Rrevision 2*. Office of Water Washington, DC, USA.
- Van Dolah, F. M. (2000). Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental health perspectives*, 108(suppl 1), 133-141.
- Vashist, S. K., & Luong, J. H. (2018). Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. En *Handbook of Immunoassay Technologies* (pp. 81-95). Elsevier.
- Wisconsin Department of Natural Resources. (1996). *Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits (1996) Wisconsin Department of Natural Resources, Laboratory Certification Program*. PUBL-TS-056-96, Madison, WI.
- Witzel, C., & Gegenfurtner, K. R. (2018). Color Perception: Objects, Constancy, and Categories. *Annual Review of Vision Science*, 4(1), 475-499. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034231>
- Woods, J., & Mellon, M. (1941). Molybdenum Blue Reaction: A Spectrophotometric Study. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 13(11), 760-764. <https://doi.org/10.1021/i560099a003>
- X-rite. (2018). *Tolerancing Part 3: Color Space vs. Color Tolerance*. X-Rite. <https://www.xrite.com/blog/tolerancing-part-3>

Xu, W., Sandford, R. C., Worsfold, P. J., Carlton, A., & Hanrahan, G. (2005). Flow injection techniques in aquatic environmental analysis: Recent applications and technological advances. *Critical reviews in analytical chemistry*, 35(3), 237-246.

Yeh, T., & Tseng, S. (2006). A low cost LED based spectrometer. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53(5), 1067-1072.

Zaccari, F., Del Puerto, M., Vignale, B., & Pritsch, C. (2017). Parámetros colorimétricos y contenido de pigmentos en cinco colores de cáscara de fruto de guayabo [*Acca sellowiana* (Berg) Burret]. *Agrociencia Uruguay*, 21, 2:23-30.

Zalud, L., & Horak, K. (2012). *IPSC Shooting Laser Trainer*.

Zorn, M. E., Gibbons, R. D., & Sonzogni, W. C. (1999). Evaluation of approximate methods for calculating the limit of detection and limit of quantification. *Environmental science & technology*, 33(13), 2291-2295.

## 12. Anexo

### 12.1. Contenido de fósforo en gaseosas

**Tabla 12.1.** Valores de absorbancia a 880 nm de blancos de la medida de azul de molibdato, con sus respectivos valores de concentración de fósforo interpolados a partir de la curva de calibración mostrada en la imagen 9.21, la desviación estándar y los límites de detección y cuantificación correspondientes.

Absorbancia a 880 x 10 <sup>-4</sup>	Valor extrapolado	Desviación estándar	LD	LC
19	7.57	0.94	2.83	9.43
21	7.86			
9	6.13			
6	5.69			
8	5.98			
12	6.56			
20	7.72			
12	6.56			
26	8.59			
16	7.14			

Se realizó a modo de verificación el análisis de fósforo de una muestra de gaseosa (Coca Cola®). El análisis encuentra una concentración de fósforo de 190.6 mgL<sup>-1</sup>, mientras que el valor reportado por el fabricante corresponde con 182 mgL<sup>-1</sup>. Si bien este resultado es un valor aproximado, dado que se desconoce el lote, las condiciones de medida y el error relativo del análisis del fabricante, los resultados se encuentran en sintonía con el valor esperado.

**Tabla 12.2.** Medidas de fósforo en coca cola por lo técnica oficial de la ERA. Un porcentaje de recuperación podría calcularse, pero dada la variabilidad de estas muestras este resultado no permite una correcta evaluación de la exactitud de la técnica.

	Absorbancia a 880 nm	Concentración (µg L <sup>-1</sup> )	Concentración tomando en (µg L <sup>-1</sup> )	Concentración reportada por el fabricante (µg L <sup>-1</sup> )
Coca Cola® dilución 1/1000	0.0984	190,60344	190603	182000

## 12.2. Comparación de distintos algoritmos empleados en la adquisición de las imágenes

**Tabla 12.2.3** Valores de porcentaje de azul (%A) determinados para diez imágenes de la misma muestra obtenidos por captura de pantalla (SSH), fotografía por defecto (STD), HDR y DRO; incluyendo desviación estándar (SD), promedio y desviación estándar relativa (rSD) de las poblaciones resultantes. Estos datos fueron utilizados para la elaboración de la Tabla 9.2.

Método	SSH	HDR	DRO	STD
%A	54.94	49.38	49.21	54.40
	54.81	49.56	49.26	53.34
	54.30	49.50	49.39	53.08
	53.84	49.43	49.29	54.37
	54.20	49.61	49.24	54.29
	54.23	49.49	49.31	54.24
	54.31	49.59	49.44	54.42
	54.04	49.57	49.14	54.81
	54.40	49.64	49.32	54.51
	54.27	49.76	49.33	54.49
SD	0.33	0.11	0.085	0.55
Promedio	54.34	49.53	49.29	54.16
rSD	0.006	0.002	0.002	0.01

**Tabla 12.2.4.** p-valor asociado a la prueba de Student de dos colas para poblaciones pareadas entre todos dos. Hipótesis nula: media (A)  $\neq$  media (B). Se acepta la hipótesis nula para un valor de significancia menor a 0.05.

	p-valor
SSH-HDR	$1.3 \times 10^{-11}$
SSH-DRO	$5.3 \times 10^{-12}$
<b>SSH-STD</b>	<b><math>5.6 \times 10^{-1}</math></b>
HDR-DRO	$5.4 \times 10^{-10}$
HDR-STD	$5.4 \times 10^{-10}$
DRO-STD	$6.9 \times 10^{-10}$

### 12.3. Cálculo del error estándar residual de la regresión lineal y comparación de los límites de detección y cuantificación por distintos métodos

**Tabla 12.3.1.** Datos empleados para estimación del límite de detección y cuantificación mediante el error estándar residual de la regresión lineal

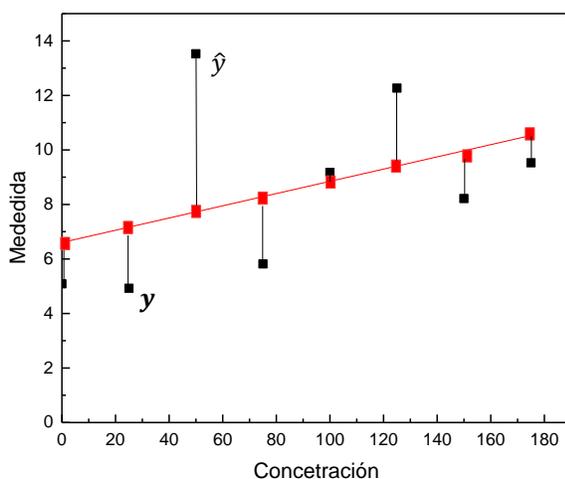
Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Valor de la curva promedio $y$ (u.a.)	Valor de la regresión $\hat{y}$ (u.a.)
0	0.10	-0.30
25	0.63	1.25
50	2.21	2.83
75	4.62	4.38
100	5.84	5.92
125	7.26	7.47
150	9.25	9.03
175	10.28	10.58

$$\text{Error estándar residual} = S_y = \sqrt{\frac{\sum(y - \hat{y})^2}{n-2}}$$

$$LD = 3 \frac{S_y}{a} = 20.13 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$LC = 10 \frac{S_y}{a} = 67.10 \mu\text{g L}^{-1}$$

$a$  = pendiente de la curva de calibración.



**Figura 12.3.2.** Representación gráfica de los valores medidos y estimados, empleados para el cálculo del error estándar residual.

**Tabla 12.3.2.** Comparación de los límites de detección y cuantificación obtenidos por distintos métodos.

Técnica	Datos empleados	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Formula
EPA o IUPAC	10 repeticiones del blanco	10.97	32.92	$LD = \bar{X} + SD * t_{(n-1, \alpha-1=0.99)}$ $LC = 3 LD$
Método tradicional, Norma Europea	10 repeticiones del blanco	14.30	47.20	$LD = 2t_{n,a}SD \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{n_B}}$ $LC = 3.3 LD$
Método tradicional a partir de la curva de calibración	Desviación estándar de la ordenada en el origen	11.35	37.45	$LD = 3 \frac{SD_0}{a}$ $LC = 3.3 LD$ <p>SD<sub>0</sub> corresponde a la desviación estándar del valor de la ordenada en el origen de la curva de calibración.</p>
Método estimativo a partir de la desviación estándar residual de la curva de calibración	Error estándar residual	20.13	67.10	$LD = 3 \frac{S_y}{a}$ $LC = 10 \frac{S_y}{a}$
Método de la ERA	Extrapolación de la desviación estándar	20	66	$LD = 3 * SD_0$ $LC = 10 SD$ <p>SD<sub>0</sub> corresponde a la desviación estándar del valor de la ordenada en el origen de la curva determinada por la desviación estándar de cada medida vs. la concentración.</p>

## 12.4. Protocolo de cuantificación de fósforo mediante el método electroquímico

### 12.4.1. Reactivos

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M
- Molibdato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O
- H<sub>2</sub>O desionizada
- Fosfato de potasio monobásico anhidro. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 12.4.2. Materiales

- Filtros de 45 um o 0.22 um
- Potenciostato
- Celda electroquímica
- Electrodo de carbono vítreo, de platino y de plata cloruro de plata (1M KCl).

#### Soluciones stock

- Solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M: Diluir 2.805 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado en 50 mL de H<sub>2</sub>O. (La solución es estable por 6 meses).
- Solución estándar de fósforo (P) 50 mg L<sup>-1</sup>: Disolver 219.5 mg de fosfato de potasio monobásico anhidro en 1L de agua ultrapura. La solución es estable por 6 meses.
- Solución de Molibdato de amonio 100 mM: Pesar 12.359 g y disolver en 100 mL de agua (La disolución puede llevar un par de horas, alternativamente se puede acidificar levemente la solución con unas gotas de ácido para mejorar su dilución). La solución es estable por 6 meses.

### 12.4.3. Método

- Realizar una toma de 10 mL de agua y colocarla en la celda con un agitador magnético.
- Colocar 80  $\mu\text{L}$  de la disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M, agitar, y agregar 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de Molibdeno.
- Pulir durante ca. 10 s el electrodo de trabajo de carbono vítreo con alúmina 0.05  $\mu\text{m}$  y enjuagar con abundante agua ultrapura.
- Lavar con abundante agua los tres electrodos.
- Encender el agitador magnético entre 1400-1500 rpm (de forma que minimice el ruido de la señal). Cargar el programa de detección amperométrica (cronoamperometría) estableciendo un potencial de 0.425 V (vs. Ag/AgCl).
- Esperar el tiempo necesario para que se equilibre la corriente (entre 5 y 10 min).
- Agregar entre 10 y 100  $\mu\text{L}$  de analito y observar la caída de corriente. Repetir este paso al menos 3 veces.
- Realizar la adición de 10  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de fósforo. La determinación de fósforo se calcula por comparación de la diferencia de corriente registrada entre el analito y las adiciones estándar.
- Al finalizar lavar todo el material con abundante agua pura y repetir los pasos 5-11 un mínimo de 3 veces.
- Una vez concluida toda la experiencia lavar los electrodos y la celda con agua y pulir el electrodo durante ca. 20 min y luego sonicar durante 10 min.
- Guardar el electrodo de referencia en una disolución de KCl 1M y el electrodo de trabajo y el auxiliar en un vaso con agua ultrapura.

## 12.5. Código Java del programa prototipo para la determinación de fósforo

```
package org.appinventor;
import
com.google.appinventor.components.runtime.HandlesEventDispatching;
import com.google.appinventor.components.runtime.EventDispatcher;
import com.google.appinventor.components.runtime.Form;
import com.google.appinventor.components.runtime.Component;
import com.google.appinventor.components.runtime.HorizontalArrangement;
import com.google.appinventor.components.runtime.TableArrangement;
import com.google.appinventor.components.runtime.Button;
import com.google.appinventor.components.runtime.Label;
import com.google.appinventor.components.runtime.VerticalArrangement;
import com.google.appinventor.components.runtime.ImagePicker;
import com.google.appinventor.components.runtime.TextBox;
import com.google.appinventor.components.runtime.Canvas;
import com.google.appinventor.components.runtime.Sound;
import com.google.appinventor.components.runtime.Camera;
import com.google.appinventor.components.runtime.TinyDB;
import com.google.appinventor.components.runtime.Clock;
import com.google.appinventor.components.runtime.Notifier;
import java.util.ArrayList;
import java.util.List;
class Screen1 extends Form implements HandlesEventDispatching {
    private HorizontalArrangement HorizontalArrangement1;
    private TableArrangement TableArrangement1;
    private Button Iniciar;
    private Label TImer;
    private HorizontalArrangement HorizontalArrangement2;
    private Button reset;
    private VerticalArrangement VerticalArrangement1;
    private int blanco;
    private HorizontalArrangement HorizontalArrangement3;
    private ImagePicker ImagePicker1;
    private HorizontalArrangement HorizontalArrangement4;
    private TableArrangement TableArrangement2;
    private Button ok;
    private Label Label1;
    private TableArrangement TableArrangement3;
    private Label ConcetracionP;
    private int resultado;
    private Label Unidades;
    private Label PorcentajeAzul;
    private Label FraccionAzul;
    private TableArrangement TableArrangement4;
    private Button Button1;
    private TextBox TextBox1;
    private TextBox TextBox2;
    private HorizontalArrangement HorizontalArrangement5;
    private Canvas Canvas1;
```

```

private Label Ordeneada;
private Label Pendiente;
private Label R;
private Sound Sound1;
private Camera Camera1;
private TinyDB TinyDB1;
private Clock DisplayTemporizador;
private Clock Medir;
private Clock Clock3;
private Clock Cronometro;
private Clock MedidaBlanco;
private Clock Clock6;
private Notifier Notifier1;
private Notifier Notifier2;
private Notifier Notifier3;
private int b;
private ArrayList<Object> listaCuadrante;
private int radio;
private int with;
private int c;
private int height;
private String time;
private int Yglobal;
private boolean flag;
private int Xglobal;
private String lastImage;
private int espera;
private int porcentajeAzul;
protected void $define() {
    this.AboutScreen("Fosforo");
    this.AppName("RGBDetector");
    this.Scrollable(true);
    this.Title("Laboratorio de Biomateriales");
    HorizontalArrangement1 = new HorizontalArrangement(this);
    HorizontalArrangement1.AlignVertical(2);
    TableArrangement1 = new TableArrangement(HorizontalArrangement1);
    TableArrangement1.Columns(10);
    Iniciar = new Button(TableArrangement1);
    Iniciar.Column(0);
    Iniciar.Row(0);
    Iniciar.Text("Iniciar");
    TImer = new Label(TableArrangement1);
    TImer.Column(2);
    TImer.Row(0);
    TImer.Text("00");
    HorizontalArrangement2 = new
HorizontalArrangement(TableArrangement1);
    HorizontalArrangement2.Column(4);
    HorizontalArrangement2.Row(0);
    reset = new Button(HorizontalArrangement2);
    reset.Text("Text for Button1");
    VerticalArrangement1 = new VerticalArrangement(TableArrangement1);

```

```

VerticalArrangement1.Column(7);
VerticalArrangement1.Row(0);
blanco = new Button(VerticalArrangement1);
blanco.Text("Blanco");
HorizontalArrangement3 = new HorizontalArrangement(this);
HorizontalArrangement3.Height(-1004);
HorizontalArrangement3.Width(LENGTH_FILL_PARENT);
ImagePicker1 = new ImagePicker(this);
ImagePicker1.Text("Abrir Imagen");
HorizontalArrangement4 = new HorizontalArrangement(this);
HorizontalArrangement4.Height(-1004);
HorizontalArrangement4.Width(LENGTH_FILL_PARENT);
TableArrangement2 = new TableArrangement(this);
TableArrangement2.Columns(3);
TableArrangement2.Width(LENGTH_FILL_PARENT);
TableArrangement2.Rows(1);
ok = new Button(TableArrangement2);
ok.Column(2);
ok.Row(0);
ok.Text("Medir");
Label1 = new Label(this);
Label1.Text("XY");
TableArrangement3 = new TableArrangement(this);
TableArrangement3.Columns(7);
TableArrangement3.Rows(1);
ConcetracionP = new Label(TableArrangement3);
ConcetracionP.Column(0);
ConcetracionP.Row(0);
ConcetracionP.Text("Concentraci3n de P:");
resultado = new Label(TableArrangement3);
resultado.Column(1);
resultado.Row(0);
resultado.Text("xx");
Unidades = new Label(TableArrangement3);
Unidades.Column(2);
Unidades.Row(0);
Unidades.Text("ug/L");
PorcentajeAzul = new Label(TableArrangement3);
PorcentajeAzul.Column(3);
PorcentajeAzul.Row(0);
PorcentajeAzul.Text("%Azul");
FraccionAzul = new Label(TableArrangement3);
FraccionAzul.Column(4);
FraccionAzul.Row(0);
FraccionAzul.Text("XX");
TableArrangement4 = new TableArrangement(this);
TableArrangement4.Columns(3);
TableArrangement4.Rows(1);
Button1 = new Button(TableArrangement4);
Button1.Column(0);
Button1.Row(0);
Button1.Text("Text for Button1");

```

```

TextBox1 = new TextBox(TableArrangement4);
TextBox1.Column(1);
TextBox1.Hint("Hint for TextBox1");
TextBox1.Row(0);
TextBox2 = new TextBox(TableArrangement4);
TextBox2.Column(2);
TextBox2.Hint("Hint for TextBox2");
TextBox2.Row(0);
HorizontalArrangement5 = new HorizontalArrangement(this);
Canvas1 = new Canvas(HorizontalArrangement5);
Canvas1.Height(-1090);
Canvas1.Width(-1090);
Ordeneada = new Label(this);
Ordeneada.Text("a");
Pendiente = new Label(this);
Pendiente.Text("b");
R = new Label(this);
R.Text("c");
Sound1 = new Sound(this);
Camera1 = new Camera(this);
TinyDB1 = new TinyDB(this);
DisplayTemporizador = new Clock(this);
Medir = new Clock(this);
Clock3 = new Clock(this);
Cronometro = new Clock(this);
MedidaBlanco = new Clock(this);
Clock6 = new Clock(this);
Notifier1 = new Notifier(this);
Notifier2 = new Notifier(this);
Notifier3 = new Notifier(this);
b = 0;
listaCuadrante = new ArrayList<Object>();
radio = 60;
with = 0;
c = 0;
height = 0;
time = "";
Yglobal = 0;
flag = true;
Xglobal = 0;
blanco = 0;
lastImage = "";
espera = 0;
porcentajeAzul = 0;
resultado = 0;
EventDispatcher.registerEventForDelegation(this, "ClickEvent",
"Click" );
EventDispatcher.registerEventForDelegation(this,
"ErrorOccurredEvent", "ErrorOccurred" );
EventDispatcher.registerEventForDelegation(this, "DraggedEvent",
"Dragged" );

```

```

        EventDispatcher.registerEventForDelegation(this, "TouchDownEvent",
"TouchDown" );
        EventDispatcher.registerEventForDelegation(this, "TimerEvent",
"Timer" );
        EventDispatcher.registerEventForDelegation(this, "LongClickEvent",
"LongClick" );
        EventDispatcher.registerEventForDelegation(this,
"BeforePickingEvent", "BeforePicking" );
        EventDispatcher.registerEventForDelegation(this, "InitializeEvent",
"Initialize" );
        EventDispatcher.registerEventForDelegation(this,
"AfterPickingEvent", "AfterPicking" );
    }
    public boolean dispatchEvent(Component component, String
componentName, String eventName, Object[] params){
        if( component.equals(Iniciar) && eventName.equals("Click") ){
            IniciarClick();
            return true;
        }
        if( component.equals(ok) && eventName.equals("Click") ){
            okClick();
            return true;
        }
        if( component.equals(this) && eventName.equals("ErrorOccurred") ){
            thisErrorOccurred();
            return true;
        }
        if( component.equals(Canvas1) && eventName.equals("Dragged") ){
            Canvas1Dragged();
            return true;
        }
        if( component.equals(Canvas1) && eventName.equals("TouchDown") ){
            Canvas1TouchDown();
            return true;
        }
        if( component.equals(DisplayTemporizador) &&
eventName.equals("Timer") ){
            DisplayTemporizadorTimer();
            return true;
        }
        if( component.equals(Clock3) && eventName.equals("Timer") ){
            Clock3Timer();
            return true;
        }
        if( component.equals(Cronometro) && eventName.equals("Timer") ){
            CronometroTimer();
            return true;
        }
        if( component.equals(Iniciar) && eventName.equals("LongClick") ){
            IniciarLongClick();
            return true;
        }
    }

```

```

        if( component.equals(MedidaBlanco) && eventName.equals("Timer") ){
            MedidaBlancoTimer();
            return true;
        }
        if(
            component.equals(ImagePicker1)
eventName.equals("BeforePicking") ){
            ImagePicker1BeforePicking();
            return true;
        }
        if( component.equals(this) && eventName.equals("Initialize") ){
            thisInitialize();
            return true;
        }
        if( component.equals(Medir) && eventName.equals("Timer") ){
            MedirTimer();
            return true;
        }
        if(
            component.equals(ImagePicker1)
eventName.equals("AfterPicking") ){
            ImagePicker1AfterPicking();
            return true;
        }
        return false;
    }
    public void IniciarClick(){
        Iniciar.BackgroundColor(Integer.valueOf(COLOR_GREEN));
        TImer.Text(String.valueOf(String.valueOf(0)));
        espera = (Integer) 0;
        DisplayTemporizador.TimerEnabled(true);
        Medir.TimerEnabled(true);
        espera = (Integer) ;
    }
    public void okClick(){
        if(!lastImage.equals("")){
            ok.BackgroundColor(Integer.valueOf(COLOR_ORANGE));
            Clock3.TimerEnabled(true);
        }
    }
    public void thisErrorOccurred(){
    }
    public void Canvas1Dragged(){
    }
    public void Canvas1TouchDown(){
    }
    public void DisplayTemporizadorTimer(){
        if(900>=Integer.valueOf(TImer.Text())){
            DisplayTemporizador.TimerEnabled(false);
        }
    }
    public void Clock3Timer(){
    }
    public void CronometroTimer(){

```

```

        Timer.Text(String.valueOf(String.valueOf(Math.round(((espera
Integer.valueOf()) / 1000)))));
    }
    public void IniciarLongClick(){
        espera = (Integer) 0;
        Timer.Text(String.valueOf(String.valueOf(0)));
        Iniciar.BackgroundColor(0);
        Cronometro.TimerEnabled(false);
        DisplayTemporizador.TimerEnabled(false);
        espera = (Integer) ;
        COLOR_LIGHT_GRAY
    }
    public void MedidaBlancoTimer(){
        MedidaBlanco.TimerEnabled(false);
        medidaPromedio();
        blanco = (Integer) (100 * porcentajeAzul);
        FraccionAzul.Text(String.valueOf(porcentajeAzul));
        draw();
        ok.BackgroundColor(Integer.valueOf(COLOR_LIGHT_GRAY));
        blanco.BackgroundColor(Integer.valueOf(COLOR_GREEN));
    }
    public void ImagePicker1BeforePicking(){
        Canvas1.Visible(true);
        HorizontalArrangement5.Visible(true);
    }
    public void thisInitialize(){
        blanco = (Integer) ;
        Sound1.Source("");
        c = (Integer) ;b = (Integer) ;
    }
    public void MedirTimer(){
        Medir.TimerEnabled(false);
        medida();
    }
    public void ImagePicker1AfterPicking(){
        lastImage = (String) ImagePicker1.Selection();
        Canvas1.Visible(true);
        Canvas1.BackgroundImage(lastImage);
        ok.BackgroundColor(Integer.valueOf(COLOR_ORANGE));
    }
    public void cuadrante4(){
        for(int number1 = 1; number1<=Integer.valueOf(radio);number1+=1){
            for(int number2 = 1; number2<=Integer.valueOf(radio);number2+=1){
                listaCuadrante.add(COLOR_SPLIT_COLOR);
                if(((Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(1 - 1)) +
Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(2 - 1))) != 0){
                    porcentajeAzul = (Integer) (porcentajeAzul +
(Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(3 - 1)) /
(Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(1 - 1)) +
Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(2 - 1))));
                }
            }
        }
    }
}

```

```

    }
    listaCuadrante = (ArrayList<Object>) new ArrayList<Object>();
}
public void draw(){
    Canvas1.BackgroundImage(String.valueOf(lastImage));
    Canvas1.DrawCircle(false, Xglobal, Float.valueOf(Yglobal),
Math.sqrt((float)(2 * Math.pow(radius, 2))));
}
public void medida(){
    medidaPromedio();
    FraccionAzul.Text(String.valueOf(String.valueOf(porcentajeAzul)));
ConcetracionP.Text(String.valueOf(String.valueOf(String.valueOf())));
    resultado = (Integer) (porcentajeAzul * 100);
}
public void medidaPromedio(){
    resetRGB();
    Canvas1.BackgroundImage(String.valueOf(lastImage));
    cuadrante1();
    cuadrante2();
    cuadrante3();
    cuadrante4();
    porcentajeAzul = (Integer) ((Math.pow(2, radius) * 4) /
porcentajeAzul);
}
public void resetRGB(){
    porcentajeAzul = (Integer) 0;
}
public void areaImagen(){
    Canvas1.HeightPercent(height);
    Canvas1.WidthPercent((float) (Float.valueOf(with)));
    Canvas1.BackgroundImage(String.valueOf(lastImage));
}
public void cuadrante1(){
    for(int number1 = 1; number1<=Integer.valueOf(radius);number1+=1){
        for(int number2 = 1; number2<=Integer.valueOf(radius);number2+=1){
            listaCuadrante.add(COLOR_SPLIT_COLOR);
            if((Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(1 - 1)) +
Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(2 - 1))) != 0){
                porcentajeAzul = (Integer) (porcentajeAzul +
(Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(3 - 1)) /
(Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(1 - 1)) +
Integer.valueOf((int) ((List) listaCuadrante).get(2 - 1))));
            }
        }
    }
    listaCuadrante = (ArrayList<Object>) new ArrayList<Object>();
}
public void cuadrante2(){
    for(int number1 = 1; number1<=Integer.valueOf(radius);number1+=1){
        for(int number2 = 1; number2<=Integer.valueOf(radius);number2+=1){
            listaCuadrante.add(COLOR_SPLIT_COLOR);

```

```

        if((Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(1 - 1)) +
Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(2 - 1))) != 0){
            porcentajeAzul = (Integer) (porcentajeAzul +
(Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(3 - 1)) /
(Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(1 - 1)) +
Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(2 - 1))));
        }
    }
}
listaCuadrante = (ArrayList<Object>) new ArrayList<Object>();
}
public void cuadrante3(){
    for(int number1 = 1; number1<=Integer.valueOf(radius);number1+=1){
        for(int number2 = 1; number2<=Integer.valueOf(radius);number2+=1){
            listaCuadrante.add(COLOR_SPLIT_COLOR);
            if((Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(1 - 1)) +
Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(2 - 1))) != 0){
                porcentajeAzul = (Integer) (porcentajeAzul +
(Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(3 - 1)) /
(Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(1 - 1)) +
Integer.valueOf((int)((List)listaCuadrante).get(2 - 1))));
            }
        }
    }
    listaCuadrante = (ArrayList<Object>) new ArrayList<Object>();
}
}
}

```

