

**Desarrollo de un analizador ambiental basado en un *smartphone* y su aplicación para la
detección de fosfatos en muestras acuosas**

Samuel Josué Bedoya Duque

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencias y Tecnologías Ambientales

Directora

Alix Yusara Contreras Gómez

Magíster en Ingeniería Ambiental

Codirectora

Angélica María Candela Soto

PhD en Ciencias

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Facultad de Química Ambiental

2024

A mi familia, con renovado cariño y aprecio

Agradecimientos

Al universo, por permitirme esta expresión.

A mi directora, la profesora Yusara Contreras, y a mi codirectora, la profesora Angélica Candela, por su paciencia, dedicación y guía.

A mi familia, por su apoyo y acompañamiento.

Contenido

1. Objetivos.....	18
1.1 Objetivo general	18
1.2 Objetivos específicos.....	18
2. Marco teórico.....	19
2.1. Espectroscopía.....	19
2.1.1. Origen y generalidades del estudio científico de la luz	19
2.1.2. Aspectos fundamentales de la espectrofotometría de absorción ultravioleta visible ..	21
2.2. Análisis del color en imágenes digitales	25
2.2.1. Aspectos fundamentales de las imágenes digitales	25
2.2.2. Espacio de color RGB	28
3. Marco legal	33
4. Estado del arte.....	35
5. Metodología	42
5.1 Diseño y construcción del lector colorimétrico alternativo basado en un <i>smartphone</i>	42
5.2 Ajustes de funcionamiento, reactivos, materiales, equipos y muestras para la determinación de fósforo soluble	43
5.2.1 Ajuste de los parámetros de exposición fotográfica.....	43
5.2.2 Reactivos para la determinación de fósforo soluble.....	43
5.2.3 Materiales y equipos para la determinación de fósforo soluble	45
5.2.4 Muestras para la determinación de fósforo soluble	46
5.3 Comparación del método colorimétrico propuesto con el método convencional	46

5.3.1 Espectrofotómetro UV-Vis para la medición colorimétrica convencional	46
5.3.2 Análisis digital de imagen (ADI) con ImageJ para la medición alternativa.....	46
5.3.3 Validación del método colorimétrico ADI con el método UV-Vis.....	49
6. Resultados y discusión.....	50
6.1 Diseño y construcción del lector colorimétrico alternativo basado en un <i>smartphone</i>	50
6.2 Ajustes de funcionamiento, solución patrón, estándares y muestras para la determinación de fósforo soluble	52
6.2.1 Ajuste de los parámetros de exposición fotográfica.....	52
6.2.2 Solución patrón y estándares para la determinación de fósforo soluble.....	55
6.2.3 Muestras de acuicultivo para la determinación de fósforo soluble	55
6.3 Comparación del método colorimétrico propuesto con el método convencional	56
6.3.1 Determinación de fosfatos usando el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60	56
6.3.2 Determinación de fosfatos por análisis digital de imagen (ADI) usando ImageJ	60
6.3.3 Validación del método colorimétrico ADI con el método UV-Vis.....	65
6.3.4 Análisis estadístico para los resultados de las muestras de acuicultivo usando ambos métodos.....	71
7. Conclusiones	74
Referencias.....	75

Lista de tablas

Tabla 1. <i>Unidades de codificación de las imágenes digitales</i>	26
Tabla 2. <i>Relación entre bits por píxel (BPP) y rango dinámico.....</i>	27
Tabla 3. <i>Parámetros fotográficos definidos para el análisis digital</i>	54
Tabla 4. <i>Lecturas de absorbancia por cuadruplicado a 685 nm de los estándares de calibración obtenidas con el espectrofotómetro Cary 60</i>	58
Tabla 5. <i>Datos promedio de la curva de calibración con el espectrofotómetro Cary 60.....</i>	58
Tabla 6. <i>Concentración de fosfatos en muestras con el espectrofotómetro Cary 60</i>	59
Tabla 7. <i>Lecturas de absorbancia por cuadruplicado de los estándares de calibración obtenidas mediante el colorímetro alternativo.....</i>	62
Tabla 8. <i>Datos promedio de la curva de calibración mediante el colorímetro alternativo</i>	62
Tabla 9. <i>Concentración de fosfatos en muestras mediante el colorímetro alternativo</i>	64
Tabla 10. <i>Absorbancias obtenidas al analizar 12 veces el blanco con ambos métodos.....</i>	66
Tabla 11. <i>Absorbancias obtenidas al analizar 12 veces una disolución de referencia a 0,250 mg/L con ambos métodos.....</i>	69
Tabla 12. <i>Comparación de las figuras de mérito de ambos métodos</i>	71
Tabla 13. <i>Comparación de las determinaciones de fosfatos en las muestras con ambos métodos</i>	72

Lista de figuras

Figura 1. <i>Huella hídrica global relacionada al fósforo.....</i>	14
Figura 2. <i>Ejemplo de un espectrofotómetro comercial.....</i>	15
Figura 3. <i>Analizador ambiental basado en un smartphone para determinaciones de colorimetría, fluorimetría y bioluminiscencia</i>	17
Figura 4. <i>Pintura de Isaac Newton y sus descubrimientos</i>	19
Figura 5. <i>Espectro electromagnético ordenado según la longitud de onda</i>	20
Figura 6. <i>Estructura general de un espectrofotómetro UV-Vis</i>	22
Figura 7. <i>Atenuación de la intensidad de luz por una muestra coloreada</i>	23
Figura 8. <i>Ejemplo de la matriz de píxeles en una imagen digital.....</i>	25
Figura 9. <i>Sensibilidad de la retina humana a los colores rojo, verde y azul</i>	28
Figura 10. <i>Esquema del espacio de color RGB</i>	30
Figura 11. <i>Ejemplos de colores formados por diferentes combinaciones en el espacio RGB</i>	31
Figura 12. <i>Separación de cada uno de los canales del espacio RGB.....</i>	32
Figura 13. <i>Número de publicaciones en SciFinder por año relacionadas con colorimetría, sensores y smartphone para el periodo 2013 – 2022</i>	35
Figura 14. <i>Prototipo de microscopio de fluorescencia basado en un teléfono celular</i>	37
Figura 15. <i>Diferentes angulaciones para fotografías de seguimiento colorimétrico de fosfatos</i>	39
Figura 16. <i>Etapas del proceso de detección de nutrientes mediante colorimetría basada en un teléfono móvil.....</i>	40
Figura 17. <i>Esquema del lector colorimétrico alternativo.....</i>	42
Figura 18. <i>Kit colorimétrico API para la determinación de fosfatos</i>	44
Figura 19. <i>Proceso general del método colorimétrico propuesto</i>	49

Figura 20. <i>Vista lateral del lector colorimétrico alternativo.....</i>	50
Figura 21. <i>Vista superior del lector colorimétrico alternativo.....</i>	51
Figura 22. <i>Exploración de la variación en los parámetros de exposición fotográfica para un blanco de fosfatos</i>	52
Figura 23. <i>Comparación de fotografías en formatos RAW y JPEG</i>	54
Figura 24. <i>Estándares de calibración para la determinación de fósforo soluble</i>	55
Figura 25. <i>Acuicultura experimental en la sede El Limonal de la Universidad Santo Tomás.....</i>	56
Figura 26. <i>Espectro de absorción del kit API para fosfatos.....</i>	57
Figura 27. <i>Curva de calibración para fosfatos con el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60</i>	59
Figura 28. <i>Software ImageJ para análisis de imagen</i>	60
Figura 29. <i>Arreglo experimental del análisis digital de imagen</i>	61
Figura 30. <i>Curva de calibración para fosfatos con el colorímetro alternativo.....</i>	63
Figura 31. <i>Comparación entre las curvas de calibración para fosfatos de ambos métodos.....</i>	66

Resumen

La eutrofización puede causar una serie de problemas en los ecosistemas acuáticos y tener impactos negativos tanto en el medio ambiente como en la sociedad, por tanto, el monitoreo de este fenómeno es clave para mantener la calidad hídrica. Así mismo, actualmente existe un considerable interés en el desarrollo de dispositivos portátiles destinados al análisis de muestras ambientales. Un enfoque particularmente prometedor, y ampliamente reportado, son los sensores basados en teléfonos inteligentes (*smartphones*), debido a la ubicuidad, accesibilidad, y conectividad de estos dispositivos.

Por ende, el objetivo de esta investigación es desarrollar un prototipo de analizador ambiental basado en colorimetría digital, así como evaluar su funcionalidad para determinar la concentración de fosfatos en medio acuoso, con el fin de servir como herramienta para la detección temprana de potenciales procesos de eutrofización. Las muestras evaluadas provienen del acuicultivo experimental de la sede El Limonal de la Universidad Santo Tomás Seccional Bucaramanga, ubicada en el municipio de Piedecuesta, Santander. Para el análisis colorimétrico se empleó un *smartphone* (Xiaomi POCO X3) integrado con una cubierta oscura y una base lumínica hechas a medida. Y posteriormente, se realizó el procesamiento digital de las imágenes obtenidas mediante la extracción de las coordenadas del espacio de color RGB empleando el software de código abierto ImageJ.

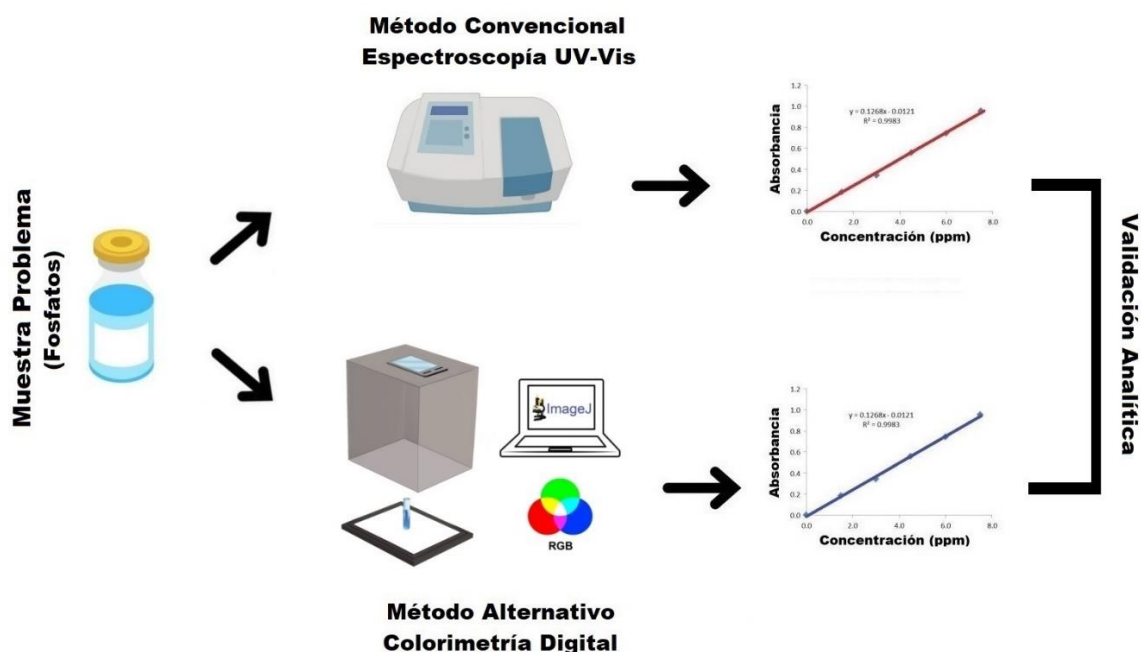
Los resultados obtenidos mediante el sistema colorimétrico propuesto se validaron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis convencional (Cary 60, Agilent). De este modo, se encontró que la determinación de fosfatos en las muestras analizadas presenta valores estadísticamente similares usando ambos métodos. De igual modo, también se compararon ambos

sistemas en su precisión, exactitud, linealidad, sensibilidad, límite de detección, y límite de cuantificación.

La linealidad y precisión de las mediciones que se realizaron con el analizador ambiental propuesto, junto a su practicidad, portabilidad y bajo costo, demuestra su aplicabilidad para la determinación de fosfatos en muestras acuosas, y destaca el considerable potencial de utilizar este dispositivo para llevar a cabo otras determinaciones colorimétricas. Por tanto, se espera que los resultados de esta investigación estimulen futuras aproximaciones para el análisis de muestras ambientales desde la fotometría digital.

Palabras clave: Smartphone, monitoreo ambiental, determinación de fosfatos, colorimetría digital, procesamiento digital de imagen, RGB, ImageJ.

Resumen gráfico



Abstract

Eutrophication can cause a series of problems in aquatic ecosystems and have negative impacts on both the environment and society. Therefore, monitoring this phenomenon is key to maintaining water quality. Additionally, there is currently considerable interest in the development of portable devices for the analysis of environmental samples. A particularly promising and widely reported approach is the use of smartphone-based sensors due to the ubiquity, accessibility, and connectivity of these devices.

Therefore, the objective of this research is to develop a prototype of an environmental analyzer based on digital colorimetry, as well as to evaluate its functionality in determining the concentration of phosphates in aqueous media, to serve as a tool for the early detection of potential eutrophication processes. The samples evaluated come from an experimental aquaculture at the Universidad Santo Tomás Seccional Bucaramanga, located in the municipality of Piedecuesta, Santander. A smartphone (Xiaomi POCO X3) integrated with a custom-made dark cover and a luminic base was used for the colorimetric analysis. Subsequently, the digital processing of the obtained images was carried out by extracting the RGB color space coordinates using the open-source software ImageJ.

The results obtained using the proposed colorimetric system were validated with a conventional UV-Vis spectrophotometer (Cary 60, Agilent). It was found that the determination of phosphates in the analyzed samples showed statistically similar values using both methods. Additionally, both systems were compared in terms of their precision, accuracy, linearity, sensitivity, detection limit, and quantification limit.

The linearity and precision of the measurements performed with the proposed environmental analyzer, along with its practicality, portability, and low cost, demonstrates its

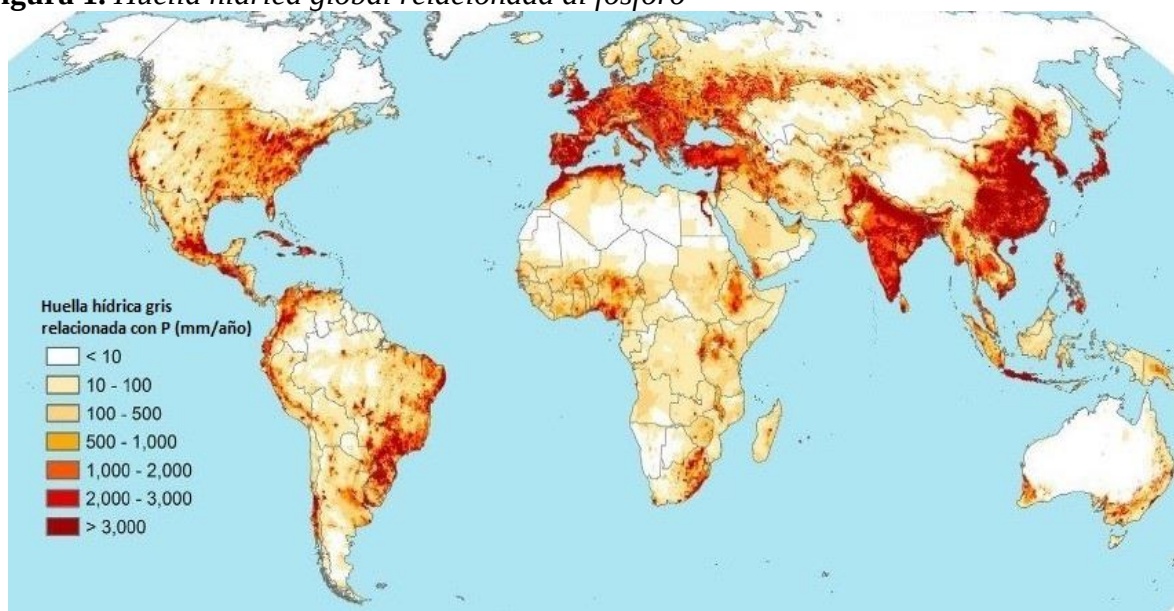
applicability for the determination of phosphates in aqueous samples, and highlights the considerable potential of using this device for other colorimetric determinations. Therefore, it is expected that the results of this research will stimulate future approaches for the analysis of environmental samples using digital photometry.

Keywords: Smartphone, environmental monitoring, phosphate determination, digital colorimetry, digital image processing, RGB, ImageJ.

Introducción

El recurso hídrico es crucial para la salud humana y del medio ambiente, por lo que las modificaciones de su calidad por el crecimiento demográfico y el desarrollo económico no sostenible son una gran preocupación ambiental. Estas alteraciones se deben principalmente a múltiples factores antrópicos (como vertidos urbanos, agrícolas e industriales) que provocan, entre otros impactos, un aumento en los aportes de nutrientes acuático. Este enriquecimiento forzado (principalmente en nitratos, amonio y fosfatos) es llamado “eutrofización cultural” y se manifiesta por una gran proliferación de fitoplancton y plantas acuáticas, seguida por fuertes caídas del oxígeno disuelto en agua con los consiguientes efectos perjudiciales para la fauna de los compartimientos hídricos, representando una seria amenaza para los ecosistemas acuáticos en todo el mundo. (Smith, 2003).

Entre las sustancias con riesgos potenciales para la calidad hídrica y la biota acuática, destaca el fósforo, contenido naturalmente en los suelos y que fluye hacia el agua por erosión. Adicionalmente, las principales fuentes antrópicas de este nutriente provienen de las aguas grises y negras de áreas urbanas, la utilización de jabones y detergentes fosforados, y el uso intensivo de fertilizantes en zonas agrícolas. El fósforo contenido en dichas fuentes llega a las aguas superficiales a través de la erosión, la escorrentía y la lixiviación, y eventualmente termina en los mares costeros (Bouwman et al., 2009) con profundos efectos sobre la calidad de las aguas receptoras debido a la eutrofización de lagos, ríos y aguas costeras (Seitzinger et al., 2010; Mekonnen y Hoekstra, 2018).

Figura 1. *Huella hídrica global relacionada al fósforo*

Tomado de (Mekonnen y Hoekstra, 2018).

Para ilustrar el alcance global de esta problemática, en la Figura 1 se muestra la distribución geográfica de la presión ejercida por las cargas antropogénicas de fósforo sobre los recursos de agua dulce, según estimaciones realizadas por investigadores de la Universidad de Nebraska. Esta modelación encontró que la huella hídrica relacionada al fósforo es más alta en áreas densamente pobladas y en regiones con agricultura intensiva. Se observan grandes valores de este indicador en China, India y Europa. Y también en otras áreas como la mitad oriental de los Estados Unidos, el norte de África y muchas de las zonas costeras de Suramérica (Mekonnen y Hoekstra, 2018).

Ante esta problemática, resulta fundamental implementar un monitoreo ambiental continuo, no solo por parte de las autoridades competentes, sino también en sintonía con la tendencia global de empoderamiento de las comunidades locales en actividades como la acuicultura. Este seguimiento ambiental de la calidad hídrica requiere el uso de herramientas precisas para evaluar los aspectos físicos, químicos y biológicos del sistema acuático. Entre los análisis químicos, una de las herramientas más utilizadas es la espectrofotometría de absorción

ultravioleta visible (UV-VIS), con amplia aplicación en varios parámetros, como por ejemplo para el análisis de fósforo, nitrógeno, flúor, amonio y metales pesados, entre otros. En el caso particular del fósforo, el método de análisis más empleado para su determinación (como fosfatos) en aguas es la reducción en medio ácido del molibdato de amonio con ácido ascórbico, o cloruro de estaño. La reducción produce un compuesto azul intenso llamado molibdeno azul, proporcional a la cantidad de fosfatos en la muestra. Se puede cuantificar la cantidad de fosfatos al medir por espectrofotometría la absorbancia del molibdeno azul. (Lasso, 2007).

En la Figura 2 se puede apreciar la imagen de un espectrofotómetro comercial (Matlock y Wilmington, 2017). La aplicación de este tipo de equipos en técnicas colorimétricas permite alcanzar límites de detección muy bajos y resultados confiables. Sin embargo, estos equipos tienen un precio elevado, dependiendo de sus especificaciones, versatilidad y rendimiento, que puede oscilar entre los 2,000 y 50,000 USD (Christodouleas et al., 2015), y frecuentemente su operación requiere de personal altamente capacitado. Muchas instituciones y laboratorios en países en desarrollo se ven afectados a la hora de adquirir este dispositivo analítico principalmente por la falta de recursos (Soldat et al., 2009). Por lo que existe una necesidad de encontrar una alternativa de bajo costo y resultados comparables.

Figura 2. *Ejemplo de un espectrofotómetro comercial*



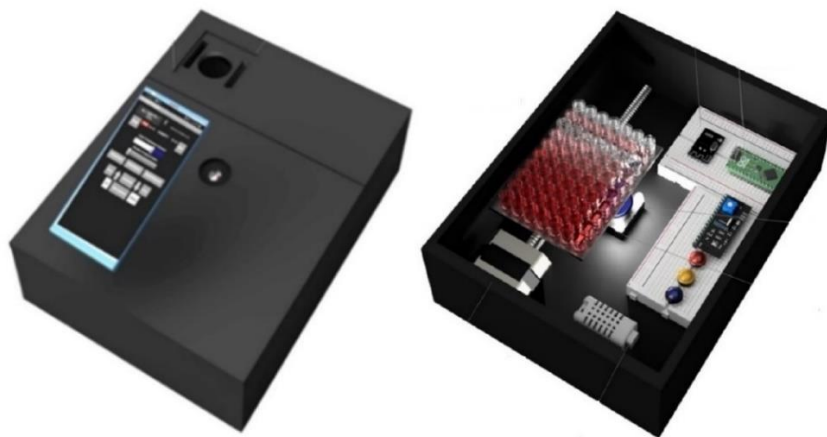
Tomado de (Matlock y Wilmington 2017)

Investigadores han desarrollado analizadores colorimétricos basados en imágenes digitales, obtenidas mediante diversos sensores electrónicos de captura, como los que se encuentran en escáneres, cámaras digitales y cámaras de teléfonos inteligentes (Christodouleas et al., 2015). Tales analizadores, en especial los que utilizan *smartphones*, han atraído una atención cada vez mayor en los últimos años. Varios artículos informan sobre este creciente interés en diversas áreas, como medicina (Oliveira et al., 2016), control de calidad ambiental (Li et al., 2022), control de calidad en alimentos (Peng et al., 2019), educación química (Hamer et al., 2021) y proyectos de ciencia ciudadana (Zheng et al., 2022).

Estos equipos alternativos permiten aprovechar diferentes características de los teléfonos inteligentes como su ubicuidad, portabilidad y capacidad de cómputo. En especial, la característica de mayor interés para la medición fotométrica son los sensores de alta resolución con los que funcionan sus cámaras. Estos son llamados semiconductores de óxido de metal complementario (CMOS, complementary metal oxide semiconductor en inglés), y han experimentado una serie de mejoras en los últimos años que posibilitan su empleo para la captura de imágenes de colorimetría, fluorimetría, e incluso bioluminiscencia (Xing et al., 2020; Bergua et al., 2022; Li et al., 2022).

Por lo general, las imágenes digitales se obtienen usando el sensor CMOS de la cámara del teléfono móvil, y luego se analizan con software especializado como ImageJ o Matlab para extraer la información cuantitativa que contienen los píxeles, especialmente sus valores en el espacio de color rojo (Red), verde (Green) y azul (Blue) (RGB por sus siglas en inglés). En la Figura 3 se observa la ilustración de un lector fotométrico de microplacas basado en un *smartphone* desarrollado recientemente por investigadores del instituto catalán de nanociencia y nanotecnología (Bergua et al., 2022).

Figura 3. *Analizador ambiental basado en un smartphone para determinaciones de colorimetría, fluorimetría y bioluminiscencia*



Adaptado de (Bergua et al., 2022)

Este proyecto de investigación se alinea con estas aproximaciones de medición alternativa, ya que pretende desarrollar un prototipo de analizador ambiental basado en un *smartphone*, que permita la cuantificación fotométrica de sustancias con riesgo potencial para el medio acuático, y demostrar su aplicabilidad para la determinación de fósforo. Dicha intención encuentra justificación en la importancia de desarrollar herramientas sensibles, de operación simple y bajo costo para la determinación rápida de analitos que amenacen la calidad hídrica, con el fin de ser usadas para monitorear cuerpos de agua y muestras acuosas potencialmente contaminadas con diferentes ecotóxicos como metales pesados, o con valores elevados de nutrientes como nitratos y fosfatos.

Finalmente, este proyecto de grado tiene como producción asociada una ponencia en modalidad póster en el Congreso Internacional de Investigación e Innovación Ambiental CAR 2023. De igual manera, está en proceso de registro de prototipo, y se tiene prevista su aplicación a revista científica.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Desarrollar un método analítico alternativo para la determinación y cuantificación de fosfatos en medio acuoso, usando un teléfono celular tipo *smartphone* y análisis digital de imagen.

1.2 Objetivos específicos

Diseñar y construir un fotómetro casero basado en un *smartphone*, para cuantificar la concentración de fosfatos en muestras acuosas durante la investigación.

Ajustar el funcionamiento del fotómetro alternativo usando un patrón de referencia, su curva de calibración, y análisis digital de imagen.

Aplicar el método desarrollado a la determinación de fosfatos en muestras acuosas, y validar los resultados obtenidos con los de referencia usando un espectrofotómetro comercial.

2. Marco teórico

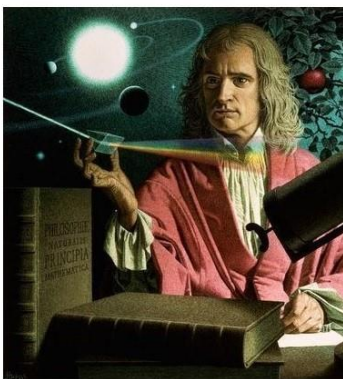
2.1. Espectroscopía

2.1.1. Origen y generalidades del estudio científico de la luz

La luz y su interacción con la materia están en el fundamento mismo de nuestra capacidad de observar y experimentar el universo. Esto lo ha intuido el ser humano desde la antigüedad, y por tal razón no es de extrañar que, dentro de la cosmogonía de muchas visiones míticas del mundo, entre ellas la judeocristiana, se le concediera un lugar esencial al origen de la luz. De este modo, como una serpiente mitológica que se muerde la cola, al interesarnos por la naturaleza de la luz, estamos estudiando la llave maestra que nos permite observar la naturaleza misma.

En 1666, Isaac Newton, en ese entonces de 23 años y confinado por una epidemia, descubrió que la luz blanca del sol se podía dividir en diferentes colores si se pasaba a través de una pieza de vidrio en forma de cuña llamada prisma. Este dispositivo se llamó espectroscopio, que literalmente significa “dispositivo para ver” (de las raíces latina y griega *spectrum* y *skopeo*) (Morris, 2015). En la Figura 4 se observa una reconocida pintura con la representación de Isaac Newton durante este experimento crucial para la historia de la ciencia (Sagan, 1980).

Figura 4. *Pintura de Isaac Newton y sus descubrimientos*

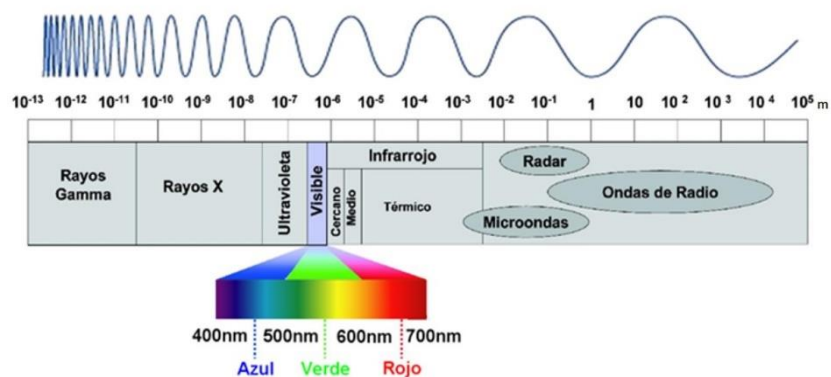


Tomado de (Sagan, 1980)

Luego, en el siglo XIX, James Maxwell descubrió que la luz estaba relacionada con el magnetismo y la electricidad. Sus teorías y su posterior validación experimental revelaron que la energía electromagnética podía propagarse a través del espacio, y que las ecuaciones que describían las leyes de Faraday, Gauss y Coulomb llevaban a predecir que la velocidad de esta radiación era igual a la velocidad de la luz. Dicha velocidad se representa con el símbolo c (del latín *celéritās*), y tiene un valor constante de aproximadamente $1 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ cuando viaja a través del vacío (Morris, 2015).

De hecho, la luz es solo la pequeña fracción del vasto espectro electromagnético que puede ser detectada por nuestros ojos. Dicho espectro engloba las diversas radiaciones electromagnéticas dispuestas según su longitud de onda, frecuencia o energía. Estas radiaciones son el resultado de la interacción de campos eléctricos y magnéticos alternantes que se propagan a través del espacio con un patrón ondulatorio (Martelo, 2014). En la Figura 5 se ilustran las distintas regiones del espectro electromagnético organizadas según sus longitudes de onda, que abarcan desde los rayos gamma y rayos X, hasta las zonas de ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas y ondas de radio.

Figura 5. Espectro electromagnético ordenado según la longitud de onda



Tomado de (Viera, 2014)

Para cada banda existe tecnología especializada en resolver y detectar dicha radiación, y para realizar observaciones espectroscópicas utilizando una amplia variedad de técnicas de medición. Sin embargo, todas estas técnicas se basan en inferir las propiedades de la materia a partir de una de las siguientes interacciones: reflexión, refracción, dispersión elástica, absorbancia, dispersión inelástica, y emisión. (Burgess, 2007).

2.1.2. Aspectos fundamentales de la espectrofotometría de absorción ultravioleta visible

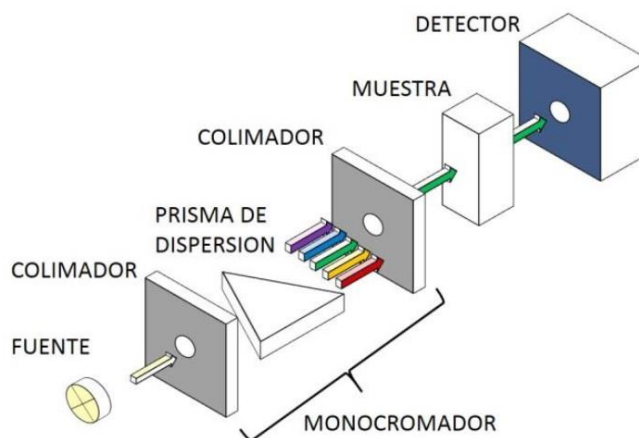
La absorbancia es la captura de energía lumínica por parte de un átomo o una molécula cuando se encuentran con un fotón. La espectrofotometría de absorción UV-Vis consiste en la medición de esta propiedad en los rangos ultravioleta y visible del espectro (longitudes de onda entre los 160 y 780 nm). Esta técnica se usa extensamente en química analítica para determinar la identidad y cantidad relativa de sustancias absorbentes en una muestra problema (Morris, 2015).

El analito de interés toma parte en una reacción química que provoca la formación de un producto coloreado llamado cromóforo (o cromógeno), que absorbe la radiación de manera específica. Por tanto, la medición se realiza usando un espectrofotómetro UV-Vis (Figura 2) en la longitud de onda en la que el cromóforo exhibe su máxima absorbancia. La cantidad de cromógeno generada en la reacción es proporcional a la cantidad de analito presente. En consecuencia, la cantidad de luz absorbida por el cromóforo guarda una proporción directa con la concentración del analito en la muestra (Bachmann y Miller, 2020).

La Figura 6 ilustra la estructura general de un espectrofotómetro UV-Vis. Este dispositivo consta de una fuente de radiación UV y visible, típicamente empleando lámparas de deuterio, wolframio y/o xenón. A continuación, se encuentra un monocromador compuesto por un colimador de entrada, un prisma dispersante y un colimador de salida, encargado de seleccionar la

longitud de onda que incidirá en la muestra. Por último, se localiza un fotodetector cuya función es cuantificar la intensidad de la radiación proveniente de la muestra, transformando la energía lumínica en una señal eléctrica. (Maldonado et al., 2018).

Figura 6. Estructura general de un espectrofotómetro UV-Vis



Tomado de (Maldonado et al., 2018)

La muestra se coloca en una cubeta en la trayectoria de la luz del espectrofotómetro. La cubeta se llena con una solución blanco que, idealmente, contiene todos los componentes de la reacción excepto el cromógeno, y se mide la cantidad de luz que llega al fotodetector (denominada I_0). Luego, la cubeta se llena con una solución que contiene todos los componentes de la reacción, incluido el cromógeno, y se mide nuevamente la cantidad de luz que incide en el fotodetector (denominada I). En este caso, como se observa en la Figura 7, la cantidad de luz que alcanza el fotodetector se reduce por la absorbancia de la luz a causa del cromógeno. La cantidad de cromóforo producido por la reacción y la correspondiente magnitud de absorbancia son proporcionales a la cantidad de analito presente en la cubeta. De este modo, un parámetro espectrofotométrico es la relación de I a I_0 y se denomina transmitancia (T) o porcentaje de

transmitancia (%T) cuando la relación se multiplica por 100 (Bachmann y Miller, 2020). La fórmula es:

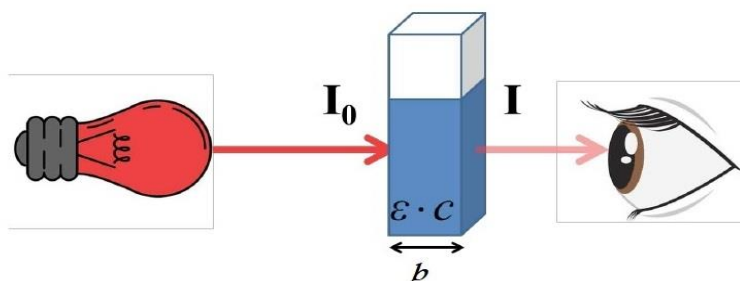
$$T = I/I_0 \text{ (Ecuación 1)}$$

La transmitancia tiene una relación semilogarítmica con la concentración del cromógeno. Por tal razón, comúnmente la transmitancia se convierte en absorbancia (A), que tiene una relación lineal con la concentración y es más fácil de usar. Cabe señalar que la transmitancia es el parámetro que realmente se mide y que la absorbancia correspondiente es un valor calculado (Morris, 2015).

La fórmula es:

$$A = -\log_{10} (I/I_0) = -\log_{10} T \text{ (Ecuación 2)}$$

Figura 7. Atenuación de la intensidad de luz por una muestra coloreada



Tomado (Cid y González, 2020)

Además, en disoluciones suficientemente diluidas, se evidencia que la absorbancia presenta una proporcionalidad lineal frente a la concentración de la especie absorbente, de acuerdo con la Ley de Lambert - Beer:

$$A = (\epsilon) (b) (C) \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde A es la absorbancia, ϵ es la absortividad molar [L/(mol.cm)] del cromógeno, b es la longitud de paso (cm) que recorre la luz a través de la cubeta y C es la concentración (mol/L) del cromógeno en la disolución (Figura 7). La absortividad molar es una propiedad física del

cromógeno. Esta propiedad se define como la cantidad de luz, a una longitud de onda específica, que absorbe una concentración de 1 mol/L del cromógeno, suponiendo que la longitud del paso de la cubeta es de 1 cm. La absortividad molar puede verse afectada por la temperatura, el pH y la matriz de la solución que contiene el cromógeno. Estas variaciones de temperatura, pH y matriz, así como errores en la longitud de onda y el paso de banda, pueden provocar un error al calcular la concentración mediante la ley de Lambert - Beer (Bachmann y Miller, 2020). Por esta razón, muchos métodos corrigen tales variaciones mediante calibración.

Se puede establecer una relación de calibración midiendo una serie de soluciones patrón (también llamadas soluciones estándar) y estableciendo la relación matemática entre la absorbancia y la concentración de analito en tales soluciones patrón. Estas se miden de la misma manera que las muestras problema y deben tener una matriz similar. El término "curva estándar" o "curva de calibración" se utiliza para referirse a esta relación de calibración. Para la mayoría de los ensayos espectrofotométricos, la relación entre la absorbancia y la concentración es lineal. El establecimiento de una relación de calibración elimina o reduce sustancialmente la influencia de sesgos de precisión en el pipeteado, la longitud de onda y absorbancia, así como sesgos por paso de banda y luz parásita, ya que estas variables se compensan al medir los patrones en las mismas condiciones espectrofotométricas que las muestras desconocidas (Bachmann y Miller, 2020).

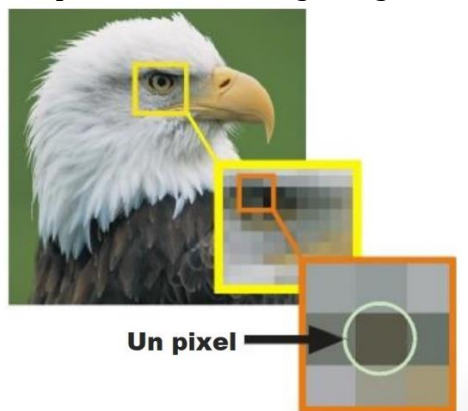
Finalmente, los análisis colorimétricos tienen múltiples aplicaciones en campos como medicina, control de calidad de alimentos, control de calidad ambiental, entre otros (Zheng et al., 2022). En particular, por ser un método robusto y preciso se utiliza para el análisis ambiental de muestras acuosas, como en las determinaciones de fluoruros, cloro residual, nitratos, nitritos, fosfatos, metales pesados, entre otros (Li et al., 2022).

2.2. Análisis del color en imágenes digitales

2.2.1. Aspectos fundamentales de las imágenes digitales

Una imagen digital se define como una representación en dos dimensiones de un objeto, creada a partir de una matriz numérica, comúnmente en formato binario (compuesta de unos y ceros) (Sánchez, 2006). Estas imágenes digitales son fácilmente capturadas y visualizadas mediante dispositivos electrónicos, como cámaras digitales, monitores, *smartphones*, tabletas, entre otros. Están compuestas por unidades gráficas conocidas como píxeles (del acrónimo en inglés de los términos *picture element*) dispuestos en una estructura de filas y columnas. Cada píxel representa distintos colores e intensidades de luz, permitiendo la reconstrucción de objetos reconocibles por la visión humana (Figura 8) (Gonzalez y Woods, 2018).

Figura 8. Ejemplo de la matriz de píxeles en una imagen digital



Tomado de (Cedillo y Palacios, 2021)

La organización de los píxeles en el espacio bidimensional de una imagen digital es fundamental para su posterior procesamiento, y generalmente es expresada en términos de columnas y filas (X, Y) (Sánchez, 2006). De este modo, el píxel en la posición inicial se ubica en

las coordenadas (0,0), que corresponden a la esquina superior izquierda de la imagen. De manera análoga, el píxel en la posición final corresponde a la última columna y fila en la esquina inferior derecha de la imagen (Gonzalez y Woods, 2018).

La información eléctrica dentro de cada píxel es almacenada en forma de bits, también conocidos como dígitos binarios (*binary digits*), los cuales determinan la profundidad de color de la imagen (Sánchez, 2006). Matemáticamente, cada bit puede tener uno de dos estados: encendido o apagado. En consecuencia, los bits encendidos se representan como 1 (verdadero), mientras que los apagados se representan como 0 (falso) (Portiansky, 2018).

En la actualidad, los sistemas informáticos utilizan estructuras de ocho bits como unidades básicas de información, conocidas como bytes, en dispositivos de almacenamiento (Tabla 1). Como el sistema numérico es binario, se generan un total de $2^8 = 256$ posibles combinaciones. En la primera combinación (que corresponde al valor 0), todos los bits son 0 (0000 0000), lo que representa un píxel negro. En la última combinación (que corresponde al valor 255), todos los bits son 1 (1111 1111), lo que representa un píxel blanco. Dentro del intervalo que abarca desde la primera hasta la última combinación, se encuentran todas las posibles combinaciones para generar una amplia gama de intensidades en un canal de color o de tonalidades de gris (Portiansky, 2018).

Tabla 1. Unidades de codificación de las imágenes digitales

Cantidad	Denominación de la unidad
1 <i>bit</i>	Bit
8 <i>bits</i>	Byte
10^3 Bytes	Kbyte (Kilobyte)
10^3 Kbytes	Mbyte (Megabyte)
10^3 Mbytes	Gbyte (Gigabyte)
10^3 Gbytes	Tbyte (Terabyte)

Adaptado de (Portiansky, 2018)

De este modo, un concepto clave en computación gráfica es la profundidad de bits por píxel (BPP), este término indica el número de dígitos binarios requeridos para representar la intensidad lumínica o el color de un píxel en una imagen digital. Dado que el sistema es de base dos, una profundidad de bits de "n" significa que cada píxel de la imagen puede presentar un total de 2^n valores posibles, lo que a su vez permite representar 2^n intensidades o colores diferentes (Portiansky, 2018). Este concepto se relaciona directamente con el rango dinámico, llamado rango tonal, que se refiere a la cantidad de tonos capturados con una cámara digital (Tabla 2) (Sánchez, 2006).

Tabla 2. Relación entre bits por píxel (BPP) y rango dinámico

BPP	Sistema binario	Rango dinámico
1	2^1	De 0 a 1
8	2^8	De 0 a 255
12	2^{12}	De 0 a 4095
16	2^{16}	De 0 a 65535
24	2^{24}	De 0 a $16,7 \times 10^6$
32	2^{32}	De 0 a $4,29 \times 10^9$
36	2^{36}	De 0 a $6,87 \times 10^{10}$
48	2^{48}	De 0 a $2,81 \times 10^{14}$

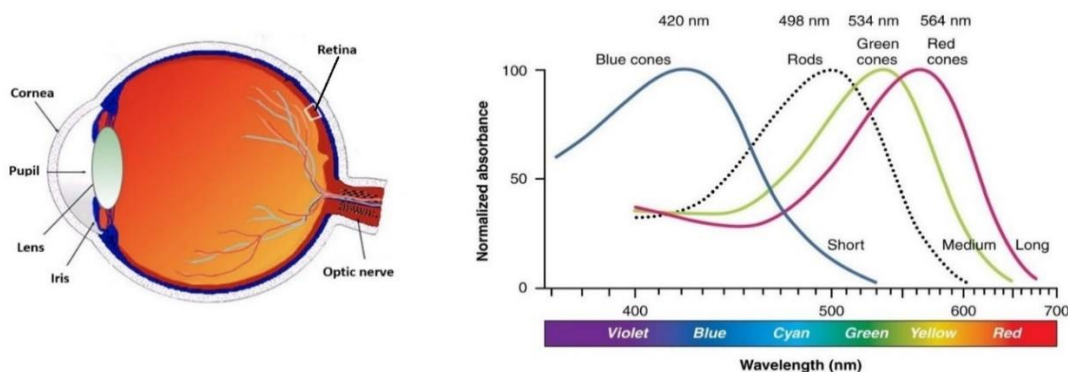
Adaptado de (Portiansky, 2018)

Tanto la ubicación espacial del píxel, que determina su posición dentro de la matriz que compone la imagen; como su profundidad de bits, que asigna un valor numérico al color o intensidad lumínica, son datos esenciales que forman la base del procesamiento digital de imágenes (Gonzalez y Woods, 2018).

2.2.2. Espacio de color RGB

El ojo humano responde a estímulos en tres longitudes de onda que corresponden a la luz roja, verde y azul. (Figura 9). Las células de la retina (llamadas conos y bastones) generan señales eléctricas que se mezclan en el cerebro para dar origen a diversas percepciones de color y luminosidad (Schaefer, 2014). Los colores producidos por experiencias visuales pueden emularse al cuantificar la distribución de la energía electromagnética que los origina. Para llevar a cabo esta emulación, las imágenes digitales utilizan disposiciones específicas de colores e intensidades de luz, fundamentadas en los tres colores primarios de la percepción humana: rojo, verde y azul (Linhardt, 2016).

Figura 9. Sensibilidad de la retina humana a los colores rojo, verde y azul



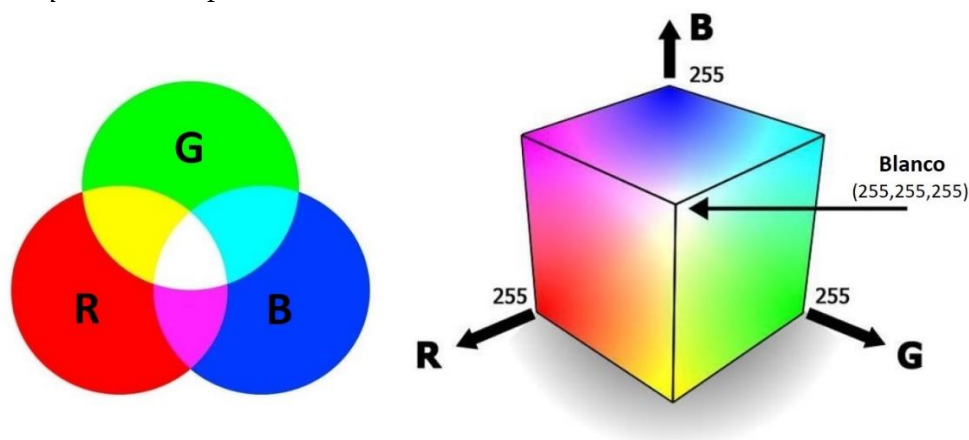
Adaptado de (Lary et al., 2021)

El color digital se define como una serie de valores que pueden ser ordenados de una forma establecida basándose en la potencia radiante de un estímulo lumínico. Esto se logra mediante la asignación de un vector numérico a un elemento dentro de un espacio de color. Por consiguiente, esta representación matemática sirve para organizar los colores con base en sus características, y para visualizarlos en diversos dispositivos electrónicos (Schaefer, 2014).

A su vez, un espacio de color es un marco que facilita la representación digital del color, siendo una estructura definida, específica y matemática que organiza los colores que se encuentran en una imagen (Portiansky, 2018). El espacio de color más utilizado es el espacio RGB, cuyo nombre proviene de las iniciales en inglés de los colores: rojo (Red), verde (Green) y azul (Blue). Este modelo matemático representa los colores como series numéricas, utilizando tres coordenadas para indicar la posición de cada color particular (Schaefer, 2014). En la Figura 10 se puede apreciar un esquema de dicho espacio de color.

Este método de representación se utiliza al referirse a imágenes de color verdadero, en las que los colores representados son una reproducción fiel de los colores reales del objeto. Dichas imágenes suelen estar codificadas en formato de 24 bits (Tabla 2), lo que equivale a 8 bits asignados a cada uno de los tres canales de color que componen el espacio RGB (Linhardt, 2016). Esto significa que cada píxel puede representar 256 posibles valores para el rojo, el verde y el azul, lo que permite representar más de 16 millones (256^3) de colores distintos en las pantallas de los dispositivos electrónicos. Esta amplia gama de colores es fundamental para la visualización precisa de imágenes y gráficos en alta calidad (Portiansky, 2018).

En la Figura 10 se observa como la combinación de los colores primarios o aditivos (rojo, verde y azul) da como resultado la formación de los colores secundarios o substractivos (cian, magenta y amarillo). Así mismo, se aprecia como la intersección entre los tres colores primarios produce la manifestación de la luz, el color blanco. También se aprecia como la mezcla de estos colores básicos, en las diferentes proporciones posibles dentro del espacio RGB, origina los tonos de la gama del espectro de colores (Ortiz-Gómez, 2014).

Figura 10. Esquema del espacio de color RGB

Adaptado de (Linhardt, 2016)

El modelo RGB se fundamenta en un sistema de coordenadas cartesianas (r,g,b), en el que cada eje corresponde a uno de los tres colores básicos. Además, los valores posibles para cada eje se encuentran entre 0 y 255, y son empleados para indicar en qué medida se combina cada color primario en una imagen digital (Linhardt, 2016). Así, un valor de 0 en un eje específico indica que dicho eje no tiene influencia en el color de la mezcla, y al aumentar ese valor, se interpreta que contribuye con una mayor intensidad a la combinación (Portiansky, 2018). Por consiguiente, el color rojo en su estado más puro se representa mediante las coordenadas (255, 0, 0), el verde en su máxima intensidad con (0, 255, 0), y el azul en su máxima pureza con (0, 0, 255).

De igual modo, si dos de los colores básicos presentan el valor máximo (255), y el tercer color presenta el valor mínimo (0), entonces se generan los colores secundarios. De este modo, el amarillo se representa como (255, 255, 0), el cian como (0, 255, 255), y el magenta como (255, 0, 255) (Friedman-Berg et al., 2008).

Por otra parte, el color negro, caracterizado por la ausencia de color, se alcanza cuando las tres coordenadas tienen valor cero, y se sitúa en el origen del espacio RGB (0, 0, 0). En tanto, el color blanco está en el vértice opuesto de dicho espacio, concretamente en las coordenadas (255,

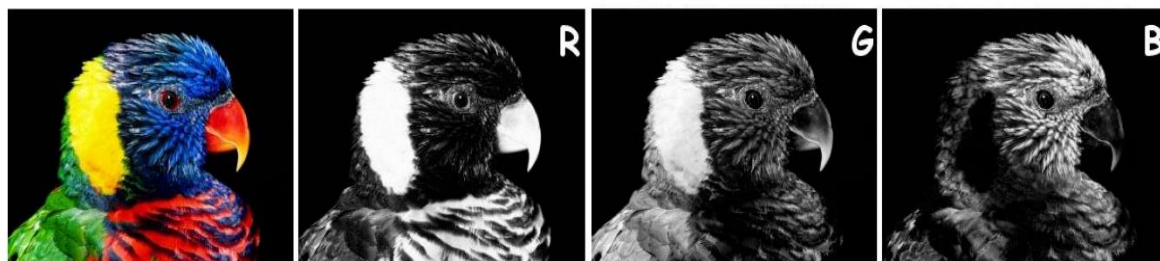
255, 255), (Figura 10). De este modo, la escala de grises se define mediante una diagonal que conecta el punto de origen con su vértice opuesto en el espacio de color (Gonzalez y Woods, 2018). Las anteriores combinaciones, y otros ejemplos de efectos cromáticos obtenidos al combinar distintos niveles de los tres colores primarios en el espacio RGB, se aprecian en la Figura 11.

Figura 11. Ejemplos de colores formados por diferentes combinaciones en el espacio RGB

Black 0,0,0	Gray 38 97,97,97	Green 4 0,139,0	Search Target Blue 30,120,255	Purple 102,0,153
White 255,255,255	Orange 4 139,90,0	Deep Sky Blue 0,191,255	History Blue 1 30,80,200	Xing Brown 153,75,0
Red 255,0,0	Orange Red 205,55,0	Brown 172,90,0	History Blue 2 70,70,170	Orange 255,165,0
Green 0,255,0		Reddish Brown 240,48,0	History Blue 3 50,50,130	Xing Cyan 0,155,255
Blue 0,0,255			History Blue 4 40,40,110	Xing Black 25,25,25
Yellow 255,255,0			History Blue 5 30,30,90	Medium Gray 192,192,192
Cyan 0,255,255			Dim Gray 140,140,140	Yellow Green 153,204,51
Magenta 255,0,255			Dark Gray Blue 57,115,115	Pink 255,192,203

Adaptado de (Friedman-Berg et al., 2008)

El sistema de coordenadas (r,g,b) implica que una imagen de color puede ser separada matemáticamente en cada uno de sus tres canales, extrayendo el valor correspondiente al canal de interés para cada píxel perteneciente a la imagen. Por tanto, se generan tres imágenes monocromáticas distintas, que pueden volverse a acoplar para restituir la imagen inicial (Portiansky, 2018). En la Figura 12 se puede apreciar un ejemplo de una imagen a color junto a las tres imágenes monocromáticas que se generarían al extraer los canales R, G y B.

Figura 12. *Separación de cada uno de los canales del espacio RGB*

Adaptado de (Portiansky, 2018)

El RGB es el modelo de representación del color más extendido, se usa en dispositivos como televisores, monitores, proyectores de vídeo, videograbadoras, celulares y escáneres, entre otros. Así, la mayoría de las cámaras digitales y teléfonos inteligentes usan ese espacio de color para capturar y reproducir imágenes digitales.

Este uso masivo, junto a las características anteriormente descritas, han convertido al espacio de color RGB en el más utilizado para el análisis científico de imágenes digitales, con el propósito de obtener datos visuales precisos y consistentes para una variedad de aplicaciones en áreas de investigación tan diversas como astronomía, agricultura, ingeniería, control de calidad, medicina, biología, y química analítica, entre otras (Ortiz-Gómez, 2014; Schaefer, 2014; Linhardt, 2016; Oliveira et al., 2016; Zheng et al., 2022).

3. Marco legal

En Colombia, según lo establece la Constitución, es responsabilidad del Estado salvaguardar la diversidad e integridad del medio ambiente, y de igual modo, conservar las zonas que revistan una notable importancia ecológica (Const. 1991, Art. 79). Adicionalmente, en cabeza del Estado está prevenir y gestionar los elementos que provocan el deterioro ambiental, así como aplicar las sanciones legales pertinentes y demandar la reparación de los perjuicios ocasionados (Const. 1991, Art. 80).

En el caso del recurso hídrico, varios preceptos normativos para su conservación se recogen en el Decreto Único Reglamentario del Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible No. 1076 de 2015. Particularmente, respecto de los vertimientos que se descargan a cuerpos de agua, este decreto trae la ordenación del recurso hídrico aplicable a los generadores de vertimientos y a los proveedores de servicios públicos domiciliarios de alcantarillado. Así mismo, establece las reglas de juego para las Autoridades Ambientales, y para las personas o industrias que generen vertimientos al agua, al suelo y a la red de alcantarillado. Este decreto, sin fijar un valor permisible, especifica que el fósforo deberá estar en una concentración que no cause eutrofización (Decreto 1076, 2015, Art. 2.2.3.3.9.7).

La Resolución Conjunta No. 2115 de 2007 de los Ministerios de Protección Social, y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial describe las características que debe observar el agua y los valores máximos permisibles que cada parámetro físico, químico y microbiológico debe cumplir; así como las características, herramientas y frecuencias del sistema de supervisión y seguimiento de la calidad del recurso hídrico para consumo humano. Contemplando en su artículo 7º a los fosfatos dentro de las características químicas que tienen efectos económicos e impactos

indirectos en la salud humana, y estableciendo para estos un límite máximo permisible de 0,5 mg/L en el agua destinada al consumo humano (Resolución 2115, 2007, Art. 7).

La Resolución 631 de 2015, Norma de Vertimientos Puntuales a Cuerpos de Aguas Superficiales y a los Sistemas de Alcantarillado Público, creada por el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, estableció parámetros y límites máximos admisibles para vertimientos puntuales en cuerpos de agua, diferenciados según actividades industriales, comerciales o de servicios. Esta norma requiere la evaluación y reporte de los parámetros de ortofosfatos y fósforo total para diferentes vertimientos, aunque sin definir un límite máximo admisible (Resolución 631, 2015).

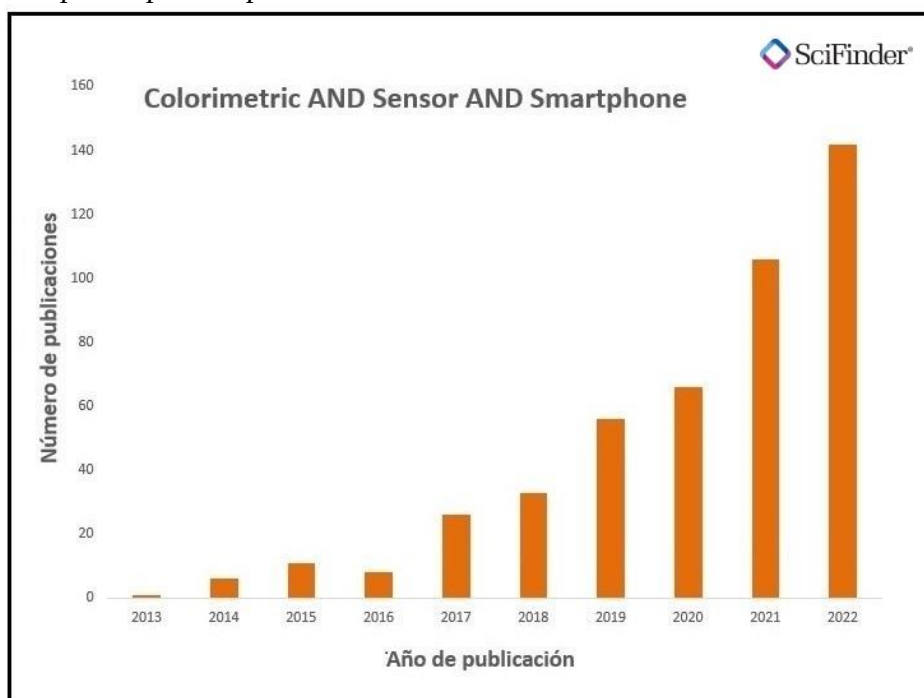
La Resolución 689 de 2016, que adopta el reglamento técnico que establece los límites máximos de fósforo y biodegradabilidad de los tensoactivos presentes en detergentes y jabones, dispuso que a partir del 1 de enero de 2018 los límites máximos permisibles de contenido de fosforo presentes en detergentes y jabones de uso industrial es de 0,65% (equivalente a 1,5% de pentóxido de fósforo). Así mismo, estableció que los jabones y detergentes de uso industrial, deben contener agentes tensoactivos que cumplan con el porcentaje mínimo de biodegradabilidad aerobia final, conforme a los métodos 301 y 310 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) o sus equivalentes en la Unión Europea (UE) o en las normas ISO o en las normas de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) (Resolución 689, 2016).

En general, el marco normativo colombiano muestra un enfoque claro en la prevención y control de la contaminación del recurso hídrico causada por fósforo y fosfatos, con el objetivo de mitigar los impactos adversos que estos contaminantes pueden tener en los cuerpos de agua, la fauna acuática y la salud humana.

4. Estado del arte

Actualmente, se liberan muchas sustancias nocivas al medio ambiente, lo que ha aumentado la necesidad de ampliar las técnicas efectivas para identificar la fuente de contaminación y evaluar los riesgos asociados. Una aproximación clásica para este problema ha sido la búsqueda de sensores colorimétricos con capacidad para detectar contaminantes a partir del cambio de color de un cromógeno específico, junto al seguimiento cuantitativo de este cambio mediante espectrofotometría UV-Vis. En los últimos años se evidencia un creciente interés académico en realizar de manera alternativa ese seguimiento cuantitativo mediante colorimetría digital basada en ordenadores, escáneres, cámaras digitales y teléfonos inteligentes (Figura 13) (Fan et al., 2021).

Figura 13. Número de publicaciones en SciFinder por año relacionadas con colorimetría, sensores y smartphone para el periodo 2013 – 2022



Elaboración propia

En la figura 13 aparece el número de publicaciones científicas por año para la fórmula de búsqueda “*colorimetric AND sensor AND smartphone*” usando la base de datos bibliográficos SciFinder. Se observa que la cantidad de publicaciones pasó de solo dos para el año 2013, a cerca de 70 para el año 2020, y finalmente, a más de 140 para el año 2022. Lo que permite concluir claramente que hay un crecimiento exponencial en la cantidad de estudios relacionados con estas palabras clave.

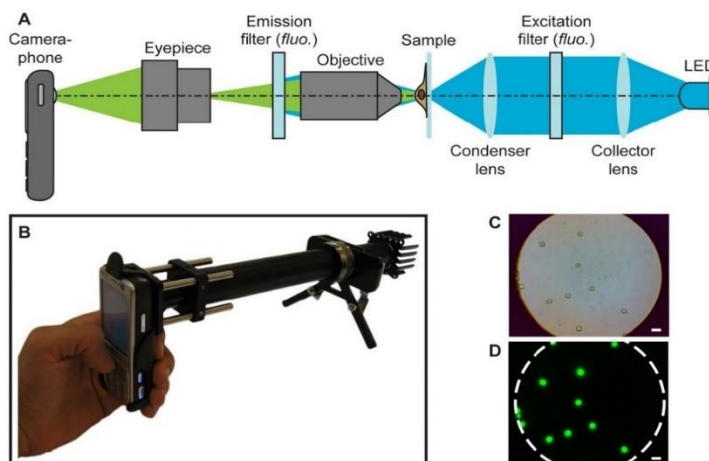
Varias de estas publicaciones se han centrado en la utilización, en los campos biomédico, educativo y ambiental, de teléfonos inteligentes como instrumentos de medición de señales de fotometría (colorimetría, fluorimetría, e incluso quimio y bioluminiscencia). Además, para que esta aproximación sea más sencilla, asequible y económica, han buscado aprovechar la portabilidad y capacidad de procesamiento de estos dispositivos. Este enfoque alternativo de medición usando teléfonos tipo *smartphone*, puede facilitar el diagnóstico médico en entornos con recursos limitados, o el monitoreo ambiental directamente en campo, por lo que posee un fuerte potencial disruptivo en comparación con los enfoques analíticos tradicionales, que dependen de voluminosos equipos generalmente fijos en laboratorio (Roda et al., 2016; Fan et al., 2021).

Los teléfonos inteligentes cuentan con CPU, RAM, y transferencia inalámbrica de datos, entre otras funcionalidades. Para las mediciones de fotometría, los sensores de sus cámaras son de particular interés. Estos sensores se conocen como semiconductores de óxido de metal complementario (CMOS, por sus siglas en inglés), y son la base tecnológica que permite la captura y el seguimiento de cambios en la intensidad del color (Roda et al., 2016; Xing et al., 2020; Fan et al., 2021).

Uno de los trabajos pioneros en la aplicación de un teléfono celular para la construcción de dispositivos con fines investigativos, es el estudio realizado por Breslauer et al., quienes en 2009

diseñaron y construyeron un prototipo de microscopio de fluorescencia basado en el sensor CMOS de la cámara de un teléfono móvil, con el objeto de ser empleado para el diagnóstico de imágenes clínicas en zonas apartadas donde los equipos de laboratorio biomédico son escasos. En la Figura 14 se puede apreciar el diseño del microscopio (A), y el prototipo construido por los investigadores (B). En la parte inferior derecha, se presenta la imagen de campo claro (C) y la imagen de fluorescencia (D) de perlas fluorescentes de 6 μm , que sirvieron como prueba de principio antes de realizar imágenes de células sanguíneas, que luego se procesaron digitalmente en búsqueda de patologías (Breslauer et al., 2009).

Figura 14. Prototipo de microscopio de fluorescencia basado en un teléfono celular



Adaptado de (Breslauer et al., 2009)

En los años siguientes aparecen gran variedad de estudios en una amplia extensión de campos de investigación. Entre estos, y ya con un enfoque de aplicación ambiental, cabe resaltar la tesis de maestría de Schaefer en 2014. En la cual, se realizó un monitoreo colorimétrico del cloro para asegurar la calidad del agua usando teléfonos inteligentes, y se encontró que el prototipo propuesto alcanzó una exactitud y precisión comparables a la de los colorímetros comerciales

(HACH) (Schaefer, 2014). Así mismo, cabe destacar la investigación de Peng et al. en 2019. En esta, desarrolló un método colorimétrico mediante un *smartphone* y el espacio de color RGB para la cuantificación rápida de calcio en muestras de agua y alimentos. Dicho método manifestó una alta linealidad y precisión, al punto de ser comparable con el método de validación, que en este caso fue espectrofotometría de absorción atómica con llama (FAAS, por sus siglas en inglés) (Peng et al., 2019).

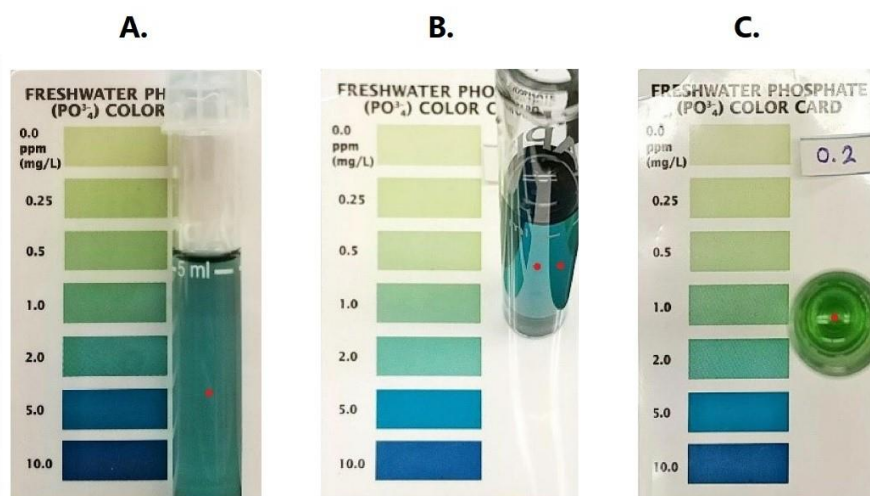
Adicionalmente, en 2020, Costa et al. publicaron un artículo que buscaba desarrollar una aplicación para teléfonos inteligentes, con el fin de simplificar la monitorización in situ de nitratos y fosfatos por parte de las comunidades locales. En particular, para el seguimiento de fosfatos realizaron pruebas preliminares con cuatro kits cromogénicos diferentes. A partir de dichas pruebas eligieron el kit API para fosfatos basándose en la calidad, precisión y repetibilidad de sus resultados (Costa et al., 2020).

En la Figura 15 se pueden observar las tres diferentes angulaciones con las que se tomaron las fotografías para el análisis de imagen en la aplicación. Así, perpendicular al vial (90°) (A), diagonal al vial (45°) (B), y por encima del vial (0°) (C). En este sentido, es importante señalar que la mayoría de las referencias consultadas emplean una angulación perpendicular, mientras que son pocas las que optan por una angulación de 45° o 0° (Christodouleas et al., 2015; Costa et al., 2020), lo cual también ocurre en la presente investigación.

La aplicación se probó en ríos, humedales y lagos de Canadá, y mostró un alto potencial para identificar fuentes y puntos críticos de contaminación, permitiendo a las comunidades realizar seguimiento de la contaminación por nutrientes. Sin embargo, llama la atención que obtuvieron altos errores relativos (superiores al 30%) (Costa et al., 2020), Esto podría atribuirse al hecho de que las fotografías se tomaron en condiciones de luz ambiente, las cuales tienden a variar

ampliamente. Esto contrasta con el enfoque de Schaefer y Peng et al., quienes emplearon una cámara oscura para estandarizar las condiciones de iluminación (Schaefer, 2014; Peng et al., 2019).

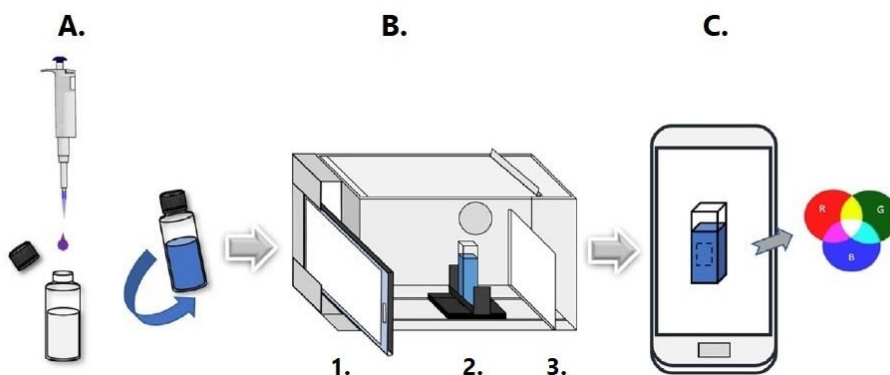
Figura 15. *Diferentes angulaciones para fotografías de seguimiento colorimétrico de fosfatos*



Adaptado de (Costa et al., 2020)

Por otra parte, en 2022, Li et al. desarrollaron un analizador ambiental con base en un teléfono inteligente para la detección in situ de nutrientes, entre ellos fosfatos y nitratos. En la Figura 16 se puede apreciar un esquema del proceso general de detección que utilizaron. Iniciando con la reacción cromogénica (A). Luego, continuando con la adquisición de la imagen en la cámara de detección (B), dividida en tres componentes: posición del *smartphone* (1), posición de la muestra (2), y fuente de iluminación (3). Y, llegando a la extracción de los canales RGB (C). De este modo, obtuvieron una alta linealidad y precisión en la determinación de dichos nutrientes en aguas naturales de China, demostrando la aplicabilidad de este sistema alternativo para uso en campo, al no evidenciarse diferencias significativas con el método convencional (espectrofotometría UV-Vis) (Li et al., 2022).

Figura 16. *Etapas del proceso de detección de nutrientes mediante colorimetría basada en un teléfono móvil*



Tomado de (Li et al., 2022)

Adicionalmente, en Latinoamérica se hallaron varias referencias que emplearon la colorimetría digital basada en *smartphone* para aplicaciones químicas. De este modo, en la Universidad UNISC de Brasil, se publicó en 2015, la tesis de maestría de Corrêa, la cual desarrolló un prototipo para la determinación colorimétrica de fósforo y flúor en aguas naturales mediante imágenes digitales, y su análisis en MATLAB. Obteniendo coeficientes de correlación superiores a 0,99. Y validando los resultados con espectrofotometría UV-Vis (Corrêa, 2015).

Así mismo, en 2018, la Universidad de El Salvador divulgó la tesis de pregrado de Uzquiano, la cual examinó la factibilidad de utilizar un teléfono inteligente y una aplicación Android, para un sistema colorimétrico portable y de bajo costo que permitiera la determinación de hierro. Este sistema propuesto fue validado con espectrofotometría UV-Vis, y mostró alta linealidad y practicidad (Uzquiano, 2018).

Por otra parte, en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, se publicó en 2021, la tesis de pregrado de Valverde y Obando, la cual exploró el desarrollo de un método analítico para la determinación de fósforo en medio acuoso, utilizando la aplicación Photometrix para Android. Este método fue comparado con espectrofotometría UV-Vis, sin encontrarse

diferencias estadísticamente significativas, demostrando ser una herramienta rápida y accesible (Valverde y Obando, 2021).

En Colombia, en 2021, la Universidad de los Andes divulgó la tesis de pregrado en ingeniería electrónica de Pacheco, la cual desarrolló un prototipo de espectrofotómetro visible portable y de bajo costo. En este caso, en vez de usar un móvil, se empleó directamente un sensor CMOS. Esta investigación incluyó un diseño detallado de los componentes electrónicos del sistema de medición, y su efectiva integración en un prototipo funcional. Por la contingencia ocasionada por el COVID-19, no se pudo validar en laboratorio con un espectrofotómetro UV-Vis. Por esa circunstancia, en vez de realizar ensayos de calibración con reacción cromogénica, se optó por usar diluciones de acuarela verde como prueba de principio (Pacheco, 2021). Dejando abierta la posibilidad de explorar estos aspectos en futuras investigaciones.

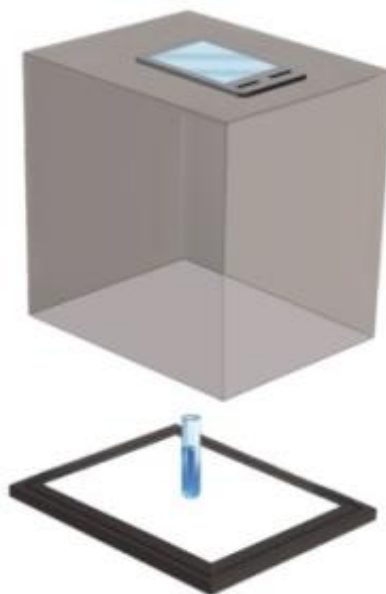
En conclusión, esta revisión del estado del arte evidencia que existe un interés académico en el desarrollo de instrumentación portátil basada en teléfonos celulares para la detección colorimétrica de gran variedad de sustancias. Así mismo, dicho interés muestra un crecimiento exponencial en los últimos años, tiene lugar en centros académicos de muchos países, incluido Colombia, y presenta un alto potencial para la exploración creativa de nuevas aproximaciones investigativas.

5. Metodología

5.1 Diseño y construcción del lector colorimétrico alternativo basado en un *smartphone*

Para medir de manera alternativa el fósforo soluble, se construyó un lector colorimétrico, fundamentado en una cámara de iluminación controlada, que permitió fotografiar las muestras procesadas con la reacción cromogénica, para luego analizarlas mediante procesamiento digital de imagen. Un esquema del colorímetro propuesto se puede apreciar en la Figura 17, sus dimensiones fueron 15 cm x 20 cm x 25 cm. En la parte inferior se instaló un panel LED blanco de 24 Watts como fuente de iluminación. Sobre este, se ubicó un tubo de ensayo de 100 x 13 con la muestra, el blanco o el estándar de calibración a evaluar. Adicionalmente, en la parte superior se instaló un acople para ubicar un teléfono móvil tipo *smartphone* (Xiaomi POCO X3) equipado con una cámara CMOS de parámetros variables, con la que se tomaron las imágenes digitales para su posterior análisis informático.

Figura 17. Esquema del lector colorimétrico alternativo



Elaboración propia

5.2 Ajustes de funcionamiento, reactivos, materiales, equipos y muestras para la determinación de fósforo soluble

5.2.1 Ajuste de los parámetros de exposición fotográfica

Las fotografías para la determinación de fosfatos por análisis de imagen se tomaron en el lector colorimétrico de iluminación controlada que se acaba de describir, variando los siguientes parámetros de la cámara del *smartphone*: velocidad de obturación, sensibilidad ISO, balance de blancos, distancia de enfoque, y tipo de archivo. Lo anterior a fin de obtener la mejor configuración de exposición fotográfica, para proveer fotografías óptimas para el análisis digital de imagen.

5.2.2 Reactivos para la determinación de fósforo soluble

5.2.2.1 Kit colorimétrico API para la determinación de fósforo soluble

Para las determinaciones de fósforo reactivo se utilizó el kit colorimétrico API para fosfatos (Mars Fishcare, USA), debido a que investigaciones anteriores lo han seleccionado a causa tanto de la calidad y precisión de sus resultados, como de su idoneidad para la fotografía basada en *smartphone*. (Costa et al., 2020). Este kit, que se puede apreciar en la Figura 18, se basa en el cambio de color de la muestra acuosa dentro de un vial después de mezclar dos reactivos. El reactivo 1 está compuesto por ácido sulfúrico y molibdato de amonio, mientras que el reactivo 2 se compone de glicerol y de cloruro de estaño (Mars Fishcare, 2017).

El procedimiento general para la determinación de fosfatos utilizando este kit fue el siguiente: 5 mL de la solución o muestra a analizar se midieron en el vial provisto por el fabricante, luego a este se le agregaron 6 gotas del reactivo 1 y se mezclaron por inversión, inmediatamente

se agregaron 6 gotas del reactivo 2 y se mezclaron nuevamente por inversión, se dejó reposar el vial por exactamente 3 minutos, al cabo de los cuales se realizó la lectura.

Convencionalmente dicha lectura se hace de manera semicuantitativa usando la carta de color que suministra el fabricante (Figura 18). Sin embargo, durante esta investigación se hizo de manera cuantitativa usando dos equipos a comparar, un espectrofotómetro comercial (ver 5.3.1), y el colorímetro alternativo propuesto (ver 5.3.2).

Figura 18. Kit colorimétrico API para la determinación de fosfatos



Tomado de Apifishcare, (sf).

5.2.2.2 Solución patrón de fosfato y estándares para la curva de calibración

Se preparó una solución patrón de fósforo como ortofosfato (P-PO₄) a una concentración de 50 mg/L siguiendo la guía técnica TP0094 del instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales (IDEAM). Para esto, se colocaron 0.25 g de fosfato monobásico de potasio KH₂PO₄ grado analítico, a secar a 105°C durante dos (2) horas. Luego, se disolvieron en agua ultrapura 0,2195 g de KH₂PO₄ anhidro y se diluyeron a 1000 mL en balón volumétrico. Y se almacenaron a 4 °C en frasco de vidrio perfectamente rotulado. 1,00 mL = 50,0 µg P-PO₄ (Lasso, 2007).

Con base en la anterior solución patrón de fosfato, se prepararon los estándares necesarios para construir la curva de calibración. Para esto, se realizaron las diluciones requeridas para, a partir del patrón de 50 mg/L, obtener las siguientes concentraciones: 500, 250, 125, 64, 32 y 16 ppb de P-PO₄.

5.2.3 Materiales y equipos para la determinación de fósforo soluble

5.2.3.1 Materiales

- Balones aforados de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Erlenmeyer de 100, 250 y 500 mL.
- Vasos de precipitado de 500 mL.
- Pipetas aforadas de 1, 5, 10, y 20 mL.
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 mL.
- Probetas de 25 y 50 mL.
- Micropipetas de 100, 200 y 1000 µL.
- Pipetas Pasteur.
- Micro espátula.
- Cubetas de cuarzo.

5.2.3.2 Equipos

- Balanza analítica electrónica.
- Espectrofotómetro UV-Vis (Cary 60, Agilent).
- Lector colorimétrico RGB basado en un *smartphone*.

5.2.4 Muestras para la determinación de fósforo soluble

Las muestras acuosas para la determinación de fosfatos fueron tomadas de los tanques de crecimiento y sedimentación del prototipo del Sistema Acuapónico modular-SAM ubicado en el campus Limonal de la Universidad Santo Tomás Seccional Bucaramanga, en Piedecuesta, Santander. Dichas muestras fueron colectadas en envase de vidrio ámbar sin adición de preservante, y se refrigeraron a la mayor brevedad posible. Estas muestras refrigeradas fueron filtradas, y se analizaron colorimétricamente antes de que trascurrieran 48 horas.

5.3 Comparación del método colorimétrico propuesto con el método convencional

5.3.1 Espectrofotómetro UV-Vis para la medición colorimétrica convencional

La determinación analítica convencional del fósforo soluble se realizó en el laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás sede Bucaramanga, empleando el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Agilent, USA). Este equipo se encendió 15 minutos antes de iniciar las lecturas de absorbancia, las cuales se realizaron a 685 nm, dado que este es el pico de absorción del complejo azul formado tras la adición de los reactivos del kit colorimétrico API.

5.3.2 Análisis digital de imagen (ADI) con ImageJ para la medición alternativa

Para el procesamiento digital de las imágenes obtenidas con el lector colorimétrico descrito en 5.1, y con los parámetros fijados en 5.2.1, se empleó el software de dominio público ImageJ, desarrollado por la agencia estadounidense de Institutos Nacionales de Salud, y basado en el

lenguaje de programación Java (Schneider et al., 2012). Este software es el más utilizado en investigación científica para procesar imágenes, debido a sus múltiples funcionalidades, y por ser de código abierto, lo que permite su constante actualización por parte de la comunidad de usuarios (Vidal, 2020).

Con el fin de realizar la cuantificación del color de las imágenes obtenidas, se utilizó ImageJ para obtener las coordenadas del rojo (R), verde (G) y azul (B) en el espacio de color RGB (Figura 10). Para lo cual, se combinaron varias imágenes de tubos de ensayo conteniendo muestras, blancos o estándares de calibración, y se seleccionaron mediante ImageJ varias regiones de interés o ROI (siglas en inglés para *regions of interest*) en la imagen compuesta que se analizó. Así, una región de interés circular, de unos 177 píxeles, se definió para cada tubo de ensayo fotografiado, de forma que el valor RGB obtenido para una determinada ROI fue el promedio de estos 177 píxeles. Adicionalmente, ImageJ cuenta con funciones de tipo macro que permiten automatizar en gran medida el procesamiento digital. Por tanto, durante la presente investigación se empleó la macro ReadPlate 3.0 (Delfino, 2020), para facilitar la extracción de los valores de color RGB de las imágenes digitales.

El cálculo de la absorbancia (A) a partir de la intensidad de color obtenida en un canal del RGB, se fundamentó en lo sugerido por Soldat et al. en 2009, utilizando la ecuación 2:

$$A = -\log_{10} (I/I_0)$$

Donde I_0 corresponde a la intensidad máxima que puede alcanzar el blanco analítico en un canal RGB (en el caso óptimo sería 255) (Figura 10). Por su parte, I corresponde a la intensidad alcanzada en ese canal por una concentración X de fosfatos. De este modo, si el valor de I fuera 159, el cálculo de su absorbancia sería:

$$A = -\log_{10} (159/255) = 0,205$$

Con más detalle, durante la presente investigación, se siguió un método alternativo de mayor robustez para cuantificar las intensidades y absorbancias. El cual consistió en expresar la intensidad lumínica como la distancia geométrica (DG) de los canales rojo, verde y azul en las tres dimensiones del espacio de color RGB (Linhardt, 2016). De acuerdo con la siguiente fórmula:

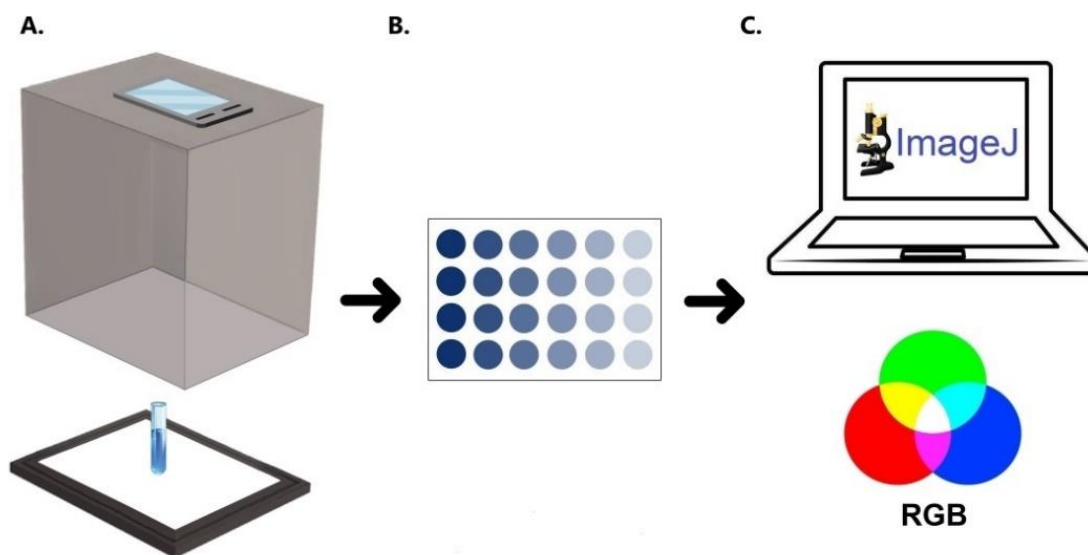
$$DG = \sqrt{(R_0 - R_x)^2 + (G_0 - G_x)^2 + (B_0 - B_x)^2} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde R_0 , G_0 y B_0 representan el valor de los canales RGB en el punto de origen (es decir, cero). Mientras, R_x , G_x y B_x representan el valor de cada canal del RGB a una concentración específica (X) de fosfatos. De este modo, el valor DG sería igual a una intensidad particular (I). Por su parte, la intensidad máxima (I_0) se obtendría cuando R_x , G_x y B_x alcanzan su valor máximo (es decir, 255). Así, I_0 sería igual al valor DG límite en el espacio RGB (concretamente, 441,67). En este orden de ideas, si una concentración dada de fosfatos presenta un valor DG (equivalente a una intensidad I) de 218, el cálculo de su absorbancia sería:

$$A = -\log_{10} (218/441,67) = 0,307$$

Los valores de absorbancia así calculados pueden procesarse de forma similar a los obtenidos con el método convencional (espectrofotómetro UV-Vis). De esta manera, se pudo establecer una curva de calibración a partir de los valores de absorbancia de los estándares, que permitió establecer la ecuación de regresión con la cual se determinó la concentración de fosfatos en las muestras problema.

En la Figura 19 se puede apreciar el proceso general del análisis digital que se realizó durante esta investigación. Inicialmente, las imágenes fueron obtenidas con el colorímetro alternativo (A), luego varias imágenes fueron agrupadas para procesarlas en paralelo, usando un editor gráfico (B), y finalmente, esta imagen ajustada fue sometida al procesamiento informático descrito anteriormente, empleando ImageJ (C).

Figura 19. *Proceso general del método colorimétrico propuesto*

Elaboración propia

5.3.3 Validación del método colorimétrico ADI con el método UV-Vis

Tanto para el método propuesto empleando análisis digital de imagen (ADI) como para el convencional (UV-Vis) se determinaron las ecuaciones de regresión a partir de los estándares de calibración. Así mismo, se determinaron las figuras de mérito (linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión) para ambos métodos.

Finalmente, se realizó un tratamiento estadístico mediante las funciones de análisis de datos de Microsoft Excel. Concretamente, se usaron la prueba F de homogeneidad de varianzas, y la prueba t para evaluación de medias, con el fin de indicar si las diferencias entre los valores obtenidos para las muestras problema, usando ambos métodos, fueron o no estadísticamente significativas.

6. Resultados y discusión

6.1 Diseño y construcción del lector colorimétrico alternativo basado en un *smartphone*

El lector colorimétrico basado en un *smartphone* se construyó siguiendo el diseño planteado en la Figura 17. En la parte inferior se ubicó un panel LED de luz blanca de la marca Titanium Lighting, con potencia de 24 W, y temperatura de color de 6500 K. Una imagen de este se puede apreciar a la izquierda en la Figura 20.

Sobre el panel LED se ubicó una caja de acrílico negro de 15 cm de ancho, 20 cm de largo, y 25 cm de alto. Y en la parte superior de esta se colocó un acople para el *smartphone* Xiaomi POCO X3, con el que se tomaron las imágenes digitales. A la derecha en la Figura 20 se puede observar el lector colorimétrico ensamblado, y listo para su uso en el laboratorio de Ciencias Ambientales.

Figura 20. Vista lateral del lector colorimétrico alternativo



Elaboración propia

En el interior de la caja acrílica, a 10 cm de altura con respecto a la base, se fijó una lámina acrílica con un agujero en el centro de 1,3 cm de diámetro, con el propósito de ubicar allí un tubo de ensayo de 100 x 13 para contener la muestra, el blanco o el estándar de calibración a evaluar. A la izquierda en la Figura 21 se puede apreciar la vista superior del colorímetro sin la tapa superior, dejando observar el interior de la caja acrílica y la ubicación del agujero central. Esta disposición permite que la luz proveniente del panel solo pueda pasar por este punto antes de llegar a la cámara del *smartphone*. A la derecha en la Figura 21 se muestra la vista superior del colorímetro completo, ya con el acople y el móvil en posición, tomando la fotografía correspondiente a uno de los estándares de calibración.

Dado que así las fotografías son tomadas por encima del tubo de ensayo, es decir con una angulación de 0° con respecto al mismo (Figura 15C), esto permite que el camino óptico sea de aproximadamente 50 mm, correspondiente a la altura que alcanzan los 5 mL de muestra más las gotas de los reactivos del kit API. Lo cual representa un incremento sustancial con respecto a los 10 mm estándar cuando la angulación es de 90° (el caso en los espectrofotómetros, y en la mayoría de las referencias consultadas), y contribuye a una mayor resolución analítica.

Figura 21. Vista superior del lector colorimétrico alternativo



Elaboración propia

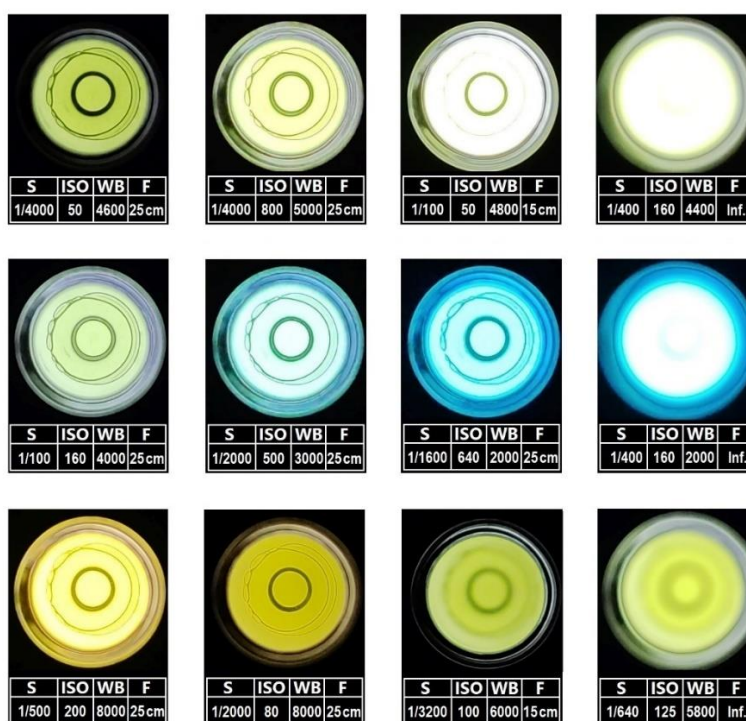
Así, se comprobó la funcionalidad del colorímetro propuesto para ser una cámara de iluminación controlada, que permite mantener estables las condiciones de luminosidad.

6.2 Ajustes de funcionamiento, solución patrón, estándares y muestras para la determinación de fósforo soluble

6.2.1 Ajuste de los parámetros de exposición fotográfica

Con el colorímetro construido, y configurando en modo manual la cámara del *smartphone* Xiaomi POCO X3, se exploró el efecto de modificar los siguientes parámetros: velocidad de obturación (S), sensibilidad a la luz (ISO), balance de blancos (WB), y distancia de enfoque (F).

Figura 22. Exploración de la variación en los parámetros de exposición fotográfica para un blanco de fosfatos



Elaboración propia

En la Figura 22 se aprecia un mosaico de imágenes, de un blanco de fosfatos, obtenidas tras variar manualmente estos cuatro parámetros. En la parte inferior de cada imagen del mosaico se indican los valores exactos de dicha captura.

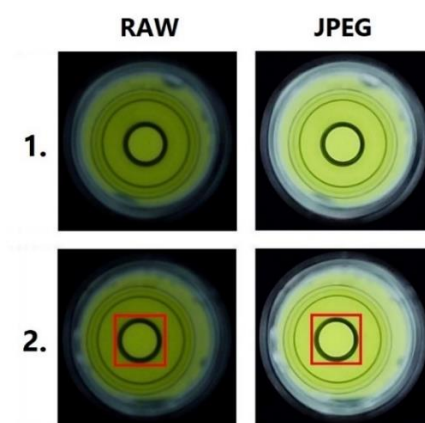
Se encontró que las fotografías más balanceadas se obtuvieron al combinar valores bajos en la velocidad de obturación (1/2000 a 1/4000), valores bajos en la sensibilidad ISO (50 a 160), valores intermedios en el balance de blancos (4000 a 5000), y una distancia de enfoque de 25 cm.

Así mismo, teniendo en cuenta que todas las imágenes de la Figura 22 corresponden a un mismo blanco de fosfatos, y que este se aprecia de una tonalidad amarilla ámbar al ojo humano, se observó que pequeñas variaciones en los parámetros pueden modificar sustancialmente el color que finalmente captura el sensor del *smartphone*, por lo que es crucial para la repetibilidad fijar dichos parámetros.

Las imágenes digitales capturadas con un *smartphone* suelen estar grabadas en formato JPEG, pero este es un archivo comprimido que sacrifica gran parte de la información del sensor CMOS y que además altera dicha información mediante un algoritmo que busca alinear la imagen con la percepción humana. En contraste, las imágenes digitales también pueden grabarse en formato RAW, un archivo sin procesar con los datos capturados por el sensor de la cámara, por lo que es más pesado y de difícil procesamiento, pero con la gran ventaja de poseer la información original que llegó al sensor. Debido a esto, cuando se trata de analizar digitalmente una imagen con propósitos científicos es preferible el formato RAW, ya que este permite realizar mediciones precisas, y extraer información detallada de la imagen de manera controlada y reproducible (Akkaynak et al., 2014; Mutlu et al., 2017; Swarowsky et al., 2023).

En la Figura 23 se observan dos fotografías diferentes en formato RAW y JPEG de un mismo blanco de fosfatos. Se aprecia que las imágenes en formato RAW se ven más oscuras en comparación con las JPEG, lo cual se explica porque las imágenes RAW están sin procesar, mientras que las JPEG han pasado por la transformación ya mencionada. En la imagen inferior, aparece delimitada en ambos formatos la región de interés (recuadro rojo). Esta corresponde al centro del tubo de ensayo, y es la región procesada durante el análisis digital.

Figura 23. Comparación de fotografías en formatos RAW y JPEG



Elaboración propia

En la Tabla 3 se resumen los parámetros definidos por este ejercicio de calibración para proveer fotografías estandarizadas para el análisis digital de imagen.

Tabla 3. Parámetros fotográficos definidos para el análisis digital

Parámetro	Valor fijado
Velocidad de obturación (S)	1/4000
Sensibilidad a la luz (ISO)	50
Balance de blancos (WB)	4600
Distancia de enfoque (F)	25 cm
Formato	RAW

Elaboración propia

6.2.2 Solución patrón y estándares para la determinación de fósforo soluble

Se preparó una solución patrón de fósforo como ortofosfato ($P-PO_4$) a una concentración de 50 mg/L siguiendo las indicaciones descritas en la metodología. Luego, a partir de esta solución se prepararon los estándares necesarios para construir por cuadruplicado la curva de calibración. Estos estándares fueron elaborados en las siguientes concentraciones: 500, 250, 125, 64, 32 y 16 ppb de $P-PO_4$. En la Figura 24 se pueden observar los estándares preparados en el laboratorio de Ciencias Ambientales.

Figura 24. Estándares de calibración para la determinación de fósforo soluble



Elaboración propia

6.2.3 Muestras de acuicultura para la determinación de fósforo soluble

Las muestras para la determinación de fosfatos fueron colectadas del SAM ubicado en el campus Limonal de la Universidad Santo Tomás, en Piedecuesta, Santander. Dichas muestras se tomaron en frasco ámbar de los tanques de crecimiento y sedimentación del acuicultivo (Figura 25). Después, se rotularon, filtraron y refrigeraron en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales ubicado en el campus de Floridablanca de la Universidad Santo Tomás. Finalmente,

las muestras de ambos tanques fueron procesadas como se indicó en la metodología y analizadas por sextuplicado. Esto se realizó con referencia a los estándares de calibración, y empleando los dos equipos a comparar: el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60, y el analizador ambiental alternativo basado en un *smartphone*.

Figura 25. *Acuicultura experimental en la sede El Limonal de la Universidad Santo Tomás*



Elaboración propia

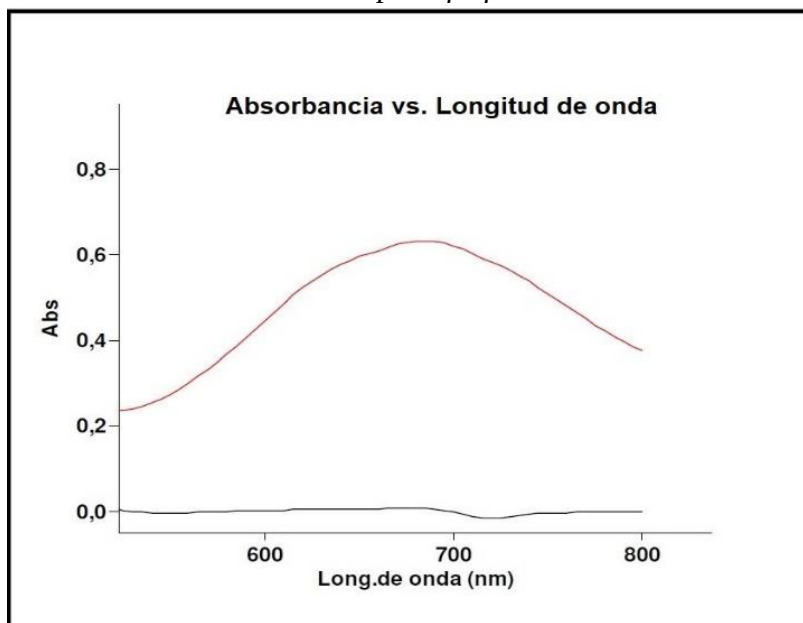
6.3 Comparación del método colorimétrico propuesto con el método convencional

6.3.1 Determinación de fosfatos usando el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60

Para la determinación de fósforo soluble se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Agilent, USA) del laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás sede Bucaramanga.

Cuando se realiza la reducción del molibdato de amonio con cloruro de estaño, como es el caso del kit API para fosfatos, se espera que el pico, o los picos de absorción se den cerca de los 700 nm (Galvis y Ballesteros, 2006). Para verificar esto, se llevó a cabo un análisis de espectro de absorción utilizando un estándar de 0,85 mg/L con la ayuda del software que trae el espectrofotómetro Cary 60. En la Figura 26 se aprecia la curva obtenida para el espectro de absorción, donde se observa que el pico de absorción es amplio y alcanza su valor máximo a 685 nm. Por tanto, se fijó 685 nm como la longitud de onda para realizar las mediciones de fósforo soluble en el espectrofotómetro Cary 60, usando el kit API para fosfatos.

Figura 26. Espectro de absorción del kit API para fosfatos



Elaboración propia

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos al realizar cuatro lecturas independientes para cada estándar de calibración con el espectrofotómetro Cary 60. Igualmente, se indica el valor promedio para cada concentración, y su coeficiente de variación.

Tabla 4. Lecturas de absorbancia por cuadruplicado a 685 nm de los estándares de calibración obtenidas con el espectrofotómetro Cary 60

Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60						
Estándar	0,016 mg/L	0,032 mg/L	0,064 mg/L	0,125 mg/L	0,250 mg/L	0,500 mg/L
1	0,014	0,026	0,050	0,099	0,184	0,358
2	0,015	0,026	0,046	0,096	0,190	0,360
3	0,015	0,024	0,046	0,095	0,188	0,357
4	0,016	0,025	0,049	0,093	0,183	0,352
PROM	0,015	0,025	0,048	0,096	0,186	0,357
C. V.	4,7	3,3	3,7	2,3	1,5	0,8

Elaboración propia

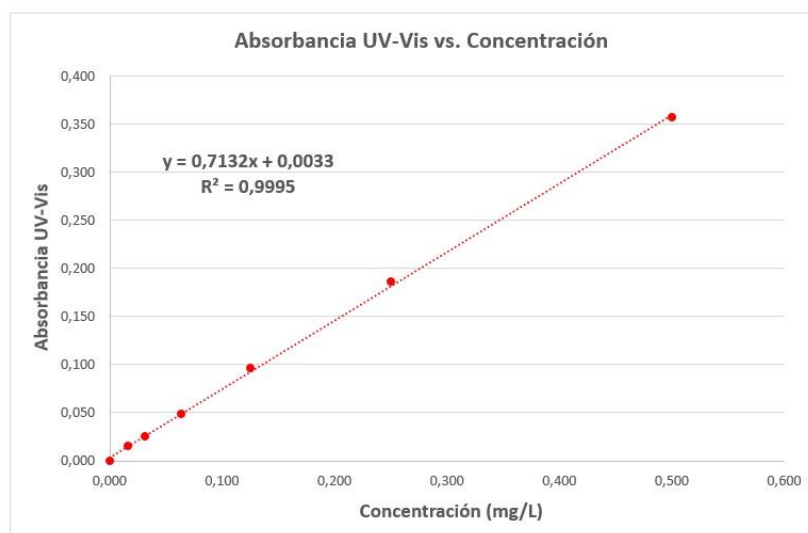
En la Tabla 5 se presentan los datos promedio de las lecturas de absorbancia de la Tabla 4, con el propósito de elaborar con estos la curva de calibración.

Tabla 5. Datos promedio de la curva de calibración con el espectrofotómetro Cary 60

Curva de calibración - UV-Vis Cary 60	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	0,000
0,016	0,015
0,032	0,025
0,064	0,048
0,125	0,096
0,250	0,186
0,500	0,357

Elaboración propia

En la Figura 27 se observa la representación gráfica de la curva de calibración, así como los parámetros de la regresión lineal, la ecuación de la línea recta y el coeficiente de determinación.

Figura 27. Curva de calibración para fosfatos con el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60

Elaboración propia

Luego, usando la ecuación de la línea recta obtenida con la curva de calibración, se calculó por sextuplicado la concentración en las muestras del tanque de crecimiento (Muestra 1), y del tanque de sedimentación (Muestra 2). Los valores individuales de cada repetición, y el valor promedio de concentración de fosfatos para ambas muestras se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración de fosfatos en muestras con el espectrofotómetro Cary 60

Resultados muestras UV-Vis Cary 60					
Muestra 1			Muestra 2		
Absorbancia	Concentración (mg/L)		Absorbancia	Concentración (mg/L)	
1	0,170	0,234	1	0,128	0,175
2	0,174	0,239	2	0,131	0,179
3	0,168	0,231	3	0,132	0,180
4	0,170	0,234	4	0,134	0,183
5	0,175	0,241	5	0,131	0,179
6	0,167	0,230	6	0,130	0,178
PROM		0,235	PROM		0,179
D. E.		0,00449	D. E.		0,00280

Elaboración propia

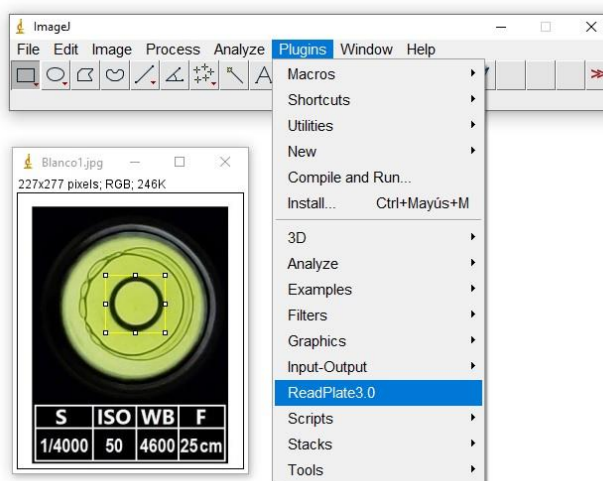
Se encontró mayor concentración de fosfatos en el tanque de crecimiento (0,235 mg/L), que el de sedimentación (0,179 mg/L), lo que sugiere que en este último se depura este nutriente.

Los resultados presentados en esta sección evidencian que el kit API para fosfatos, en combinación con el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60, y los estándares de calibración de ortofosfatos, constituyen un método confiable, preciso y repetible para determinar la concentración de fósforo soluble en las muestras analizadas. Así mismo, es de resaltar el valor alcanzado por el coeficiente de determinación de la regresión lineal ($R^2=0,9995$), el cual alcanza el nivel necesario para estimaciones analíticas.

6.3.2 Determinación de fosfatos por análisis digital de imagen (ADI) usando ImageJ

Para la determinación alternativa de fósforo soluble mediante análisis digital de imagen (ADI) se utilizó el analizador ambiental basado en un *smartphone* descrito anteriormente, y el software de acceso público ImageJ. Esto se realizó en el laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Química Ambiental de la Universidad Santo Tomás sede Bucaramanga.

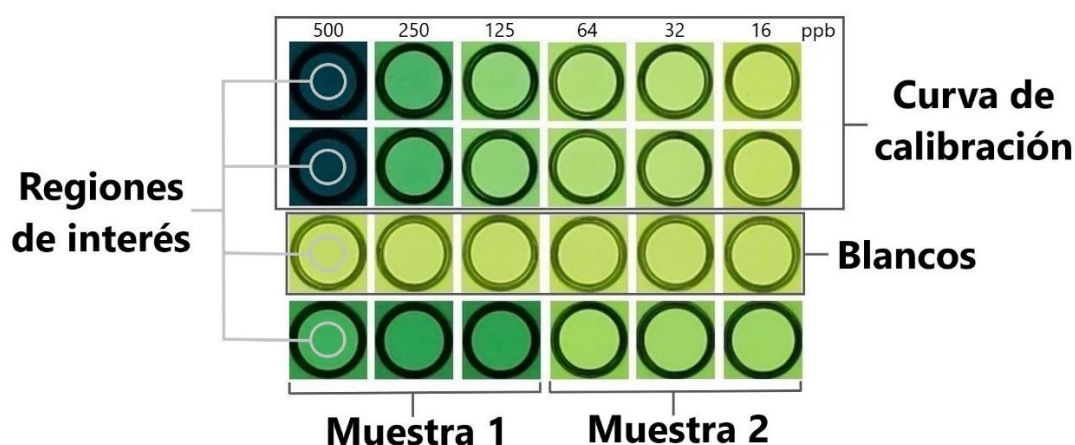
Figura 28. Software ImageJ para análisis de imagen



Elaboración propia

En la Figura 28 se observa la interfaz del software ImageJ durante el análisis de un blanco de fosfatos, se puede apreciar la delimitación de la zona de interés mediante un recuadro amarillo, y la selección del macro ReadPlate3.0 que permitió automatizar la lectura simultánea de varias fotografías de blancos, muestras, y estándares de calibración.

Figura 29. Arreglo experimental del análisis digital de imagen



Elaboración propia

La Figura 29 permite apreciar el arreglo experimental que se utilizó para la lectura simultánea de grupos de 24 fotografías con ImageJ. Se recortó la región central de cada fotografía y luego se elaboró un mosaico de 4 filas por 6 columnas, donde las dos primeras filas corresponden a dos repeticiones de los seis estándares de calibración, la tercera fila corresponde a seis repeticiones del blanco de fosfatos, y la cuarta fila a tres repeticiones para cada una de las dos muestras analizadas. Este arreglo se realizó dos veces, de modo que la curva de calibración se determinó por cuadruplicado, y las muestras se determinaron por sextuplicado.

Tabla 7. *Lecturas de absorbancia por cuadruplicado de los estándares de calibración obtenidas mediante el colorímetro alternativo*

Colorímetro Smartphone						
Estándar	0,016 mg/L	0,032 mg/L	0,064 mg/L	0,125 mg/L	0,250 mg/L	0,500 mg/L
1	0,022	0,047	0,090	0,179	0,323	0,674
2	0,023	0,050	0,093	0,184	0,329	0,670
3	0,021	0,049	0,095	0,181	0,332	0,664
4	0,024	0,047	0,093	0,185	0,328	0,667
PROM	0,023	0,048	0,093	0,182	0,328	0,669
C. V.	5,0	2,7	2,2	1,3	1,0	0,6

Elaboración propia

En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos al realizar cuatro determinaciones de absorbancia independientes para cada estándar de calibración, con base en la distancia geométrica (DG) de los canales rojo, verde y azul en las tres dimensiones del espacio de color RGB, como se describió en la sección 5.3.2 de la metodología. Dichas determinaciones de absorbancia se realizaron mediante el análisis digital con ImageJ de las fotografías obtenidas con el analizador ambiental propuesto. Adicionalmente, en esta tabla se indican el valor promedio para cada concentración, y su coeficiente de variación.

Tabla 8. *Datos promedio de la curva de calibración mediante el colorímetro alternativo*

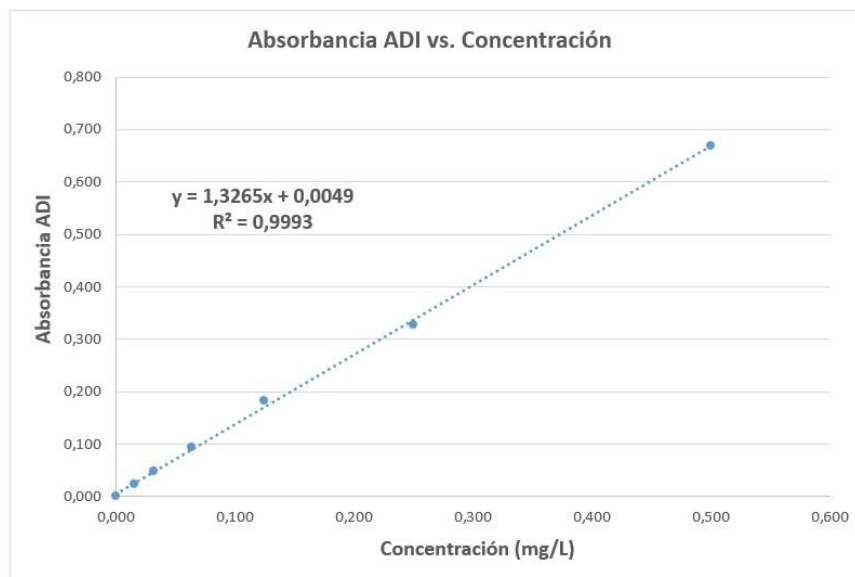
Curva de calibración - Colorímetro Smartphone	
Concentración (mg/L)	Absorbancia
0,000	0,000
0,016	0,023
0,032	0,048
0,064	0,093
0,125	0,182
0,250	0,328
0,500	0,669

Elaboración propia

Así mismo, en la Tabla 8 se resumen los datos promedio de las determinaciones de absorbancia para las diferentes concentraciones presentadas en la Tabla 7, con el propósito de elaborar la curva de calibración.

De este modo, en la Figura 30 se observa la representación gráfica de la curva de calibración, así como los parámetros de la regresión lineal, la ecuación de la línea recta y el coeficiente de determinación.

Figura 30. Curva de calibración para fosfatos con el colorímetro alternativo



Elaboración propia

Posteriormente, usando la ecuación de la línea recta obtenida con la curva de calibración, se calculó por sextuplicado la concentración en las muestras del tanque de crecimiento (M1), y del tanque de sedimentación (M2). Los valores individuales de cada repetición, y el valor promedio de concentración de fosfatos para ambas muestras se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentración de fosfatos en muestras mediante el colorímetro alternativo

Resultados muestras Colorímetro Smartphone					
Muestra 1	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Muestra 2	Absorbancia	Concentración (mg/L)
1	0,310	0,230	1	0,246	0,182
2	0,314	0,233	2	0,245	0,181
3	0,313	0,232	3	0,252	0,186
4	0,308	0,228	4	0,242	0,179
5	0,319	0,237	5	0,246	0,182
6	0,317	0,235	6	0,241	0,178
PROM		0,233	PROM		0,181
D. E.		0,00312	D. E.		0,00293

Elaboración propia

Se encontró que las concentraciones de fosfatos determinadas mediante el analizador ambiental propuesto fueron muy similares a las determinadas con el espectrofotómetro Cary 60. Así, en el tanque de crecimiento se halló una concentración de 0,233 mg/L (frente a 0,235 mg/L por espectrofotometría UV-Vis). Por su parte, en el tanque de sedimentación se encontró una concentración de 0,184 mg/L (frente a 0,179 mg/L por espectrofotometría UV-Vis).

Los resultados presentados en esta sección demuestran que el analizador ambiental basado en un *smartphone*, en combinación con el kit API para fosfatos, y el procesamiento digital con el software ImageJ, conforman un método repetible y preciso para determinar la concentración de fósforo soluble en las muestras analizadas. Al punto de presentar un desempeño comparable al de dicha determinación usando espectrofotometría UV-Vis.

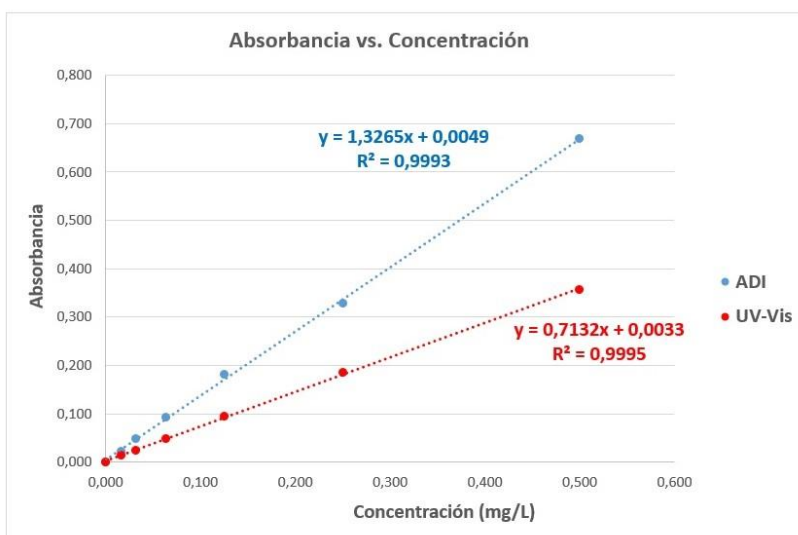
6.3.3 Validación del método colorimétrico ADI con el método UV-Vis

6.3.3.1 Rango lineal, linealidad y sensibilidad

La Figura 31 permite la comparación gráfica de las curvas de calibración, y las ecuaciones de regresión entre el método propuesto por análisis digital de imagen (ADI), y el método convencional por espectrofotometría UV-Vis. Se puede apreciar que ambos métodos presentaron alta linealidad con elevados coeficientes de regresión (0,9993 y 0,9995 respectivamente) dentro del rango de 16 a 500 ppb.

Así mismo, es de resaltar la mayor pendiente observada en el método propuesto (1,3265) respecto a la pendiente convencional (0,7132). Este incremento de casi el doble (1,86) en el valor de la pendiente indica una mayor sensibilidad en la determinación de la absorbancia mediante análisis digital de imagen, comparado a la determinación por espectrofotometría UV-Vis en el rango evaluado.

En cierta medida, esta amplificación en la sensibilidad es sorprendente, dado que se está comparando un equipo de fabricación casera con un equipo analítico. Esto muestra el nivel de resolución que puede alcanzar la determinación de absorbancia mediante este colorímetro alternativo, y se relaciona con su diseño, ya que como se mencionó en **6.1**, en este el camino óptico alcanza los 50 mm gracias a que las fotografías son tomadas con una angulación de 0° respecto al tubo de ensayo (Figuras 15C y 21). En cambio, el camino óptico de las celdas del espectrofotómetro Cary 60 es significativamente menor, y se encuentra limitado a su ancho (10 mm). Razón que afectaría su sensibilidad relativa.

Figura 31. Comparación entre las curvas de calibración para fosfatos de ambos métodos

Elaboración propia

6.3.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación

En la Tabla 10 se presentan las lecturas de 12 repeticiones independientes del blanco de fosfatos, tanto para el método alternativo mediante análisis digital de imagen (ADI), como para el método convencional mediante espectrofotometría UV-Vis.

Tabla 10. Absorbancias obtenidas al analizar 12 veces el blanco con ambos métodos

BLANCO		
Repetición	Absorbancia ADI	Absorbancia UV-Vis
1	0,001	0,003
2	0,004	0,005
3	0,010	-0,005
4	-0,002	-0,003
5	0,004	0,002
6	-0,014	0,003
7	0,008	0,003
8	-0,012	0,000
9	0,004	0,001
10	0,011	-0,006
11	-0,015	0,002
12	0,007	0,003
PROM	0,001	0,001
D. E.	0,009	0,003

Elaboración propia

Dado que el límite de detección es igual a:

$$LDD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

Donde S es la pendiente de la curva de calibración realizada por cuadruplicado, y σ es la desviación estándar de 12 mediciones del blanco, al sustituir los datos de la Tabla 10 en esta ecuación se obtiene lo siguiente:

$$LDD \text{ ADI} = \frac{3,3 \sigma}{S} = \frac{3,3 \times 0,009}{1,3265} = 0,022$$

$$LDD \text{ UV_Vis} = \frac{3,3 \sigma}{S} = \frac{3,3 \times 0,003}{0,7132} = 0,014$$

Las ecuaciones de la línea recta para las curvas de calibración de ambos métodos se pueden tomar de la Figura 31, y son las siguientes:

$$Y \text{ ADI} = 1,3265X + 0,0049$$

$$Y \text{ UV_Vis} = 0,7132X + 0,0033$$

Donde el valor de Y corresponde a la absorbancia y el valor de X corresponde a la concentración de la disolución. De este modo, se pueden calcular las respectivas concentraciones que estarían en el límite de detección:

$$LDD \text{ ADI} = \frac{0,022 - 0,0049}{1,3265} = 0,013 \text{ mg/L}$$

$$LDD \text{ UV_Vis} = \frac{0,014 - 0,0033}{0,7132} = 0,015 \text{ mg/L}$$

Así mismo, dado que el límite de cuantificación es igual a:

$$LDD = \frac{10 \sigma}{S}$$

Donde S es la pendiente de la curva de calibración realizada por cuadruplicado, y σ es la desviación estándar de 12 mediciones del blanco, al sustituir los datos de la Tabla 10 en esta ecuación se obtiene lo siguiente:

$$\text{LDQ ADI} = \frac{10 \sigma}{S} = \frac{10 \times 0,009}{1,3265} = 0,068$$

$$\text{LDQ UV_Vis} = \frac{10 \sigma}{S} = \frac{10 \times 0,003}{0,7132} = 0,042$$

Usando las ecuaciones de la línea recta para las curvas de calibración de ambos métodos es posible calcular las respectivas concentraciones que estarían en el límite de cuantificación:

$$\text{LDQ ADI} = \frac{0,068 - 0,0049}{1,3265} = 0,048 \text{ mg/L}$$

$$\text{LDD UV_Vis} = \frac{0,042 - 0,0033}{0,7132} = 0,054 \text{ mg/L}$$

Los límites de detección y cuantificación calculados, tanto para el método colorimétrico empleando análisis digital de imagen (ADI), como para el método convencional mediante espectrofotometría UV-Vis, presentan valores muy similares (0,013 mg/L vs. 0,015 mg/L; y 0,048 mg/L vs. 0,054 mg/L). Aun así, dada su mayor pendiente y sensibilidad, el método alternativo ADI pudo detectar y cuantificar cantidades de analito menores a las del sistema convencional UV-Vis.

6.3.3.3 Exactitud y precisión

En la Tabla 11 se presentan los valores de absorbancia de 12 repeticiones independientes de una disolución de referencia de fosfatos a una concentración de 0,250 mg/L, tanto para el método alternativo mediante análisis digital de imagen (ADI), como para el método UV-Vis.

Tabla 11. Absorbancias obtenidas al analizar 12 veces una disolución de referencia a 0,250 mg/L con ambos métodos

REFERENCIA 0,250 mg/L		
Repetición	Absorbancia ADI	Absorbancia UV-Vis
1	0,345	0,188
2	0,363	0,191
3	0,371	0,178
4	0,361	0,183
5	0,344	0,188
6	0,352	0,177
7	0,335	0,192
8	0,343	0,187
9	0,361	0,183
10	0,344	0,179
11	0,336	0,180
12	0,338	0,183
PROM	0,349	0,184
D. E.	0,012	0,005

Elaboración propia

La exactitud se calculó como porcentaje de recobro según la ecuación:

$$\%R = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100$$

Donde x_{ref} es la concentración de la disolución de referencia de fosfatos (0,250 mg/L) y $\bar{x}$ es el promedio de la concentración calculada utilizando 12 lecturas de la misma disolución.

Se obtiene la concentración calculada por ambos métodos sustituyendo el promedio de las lecturas de la disolución de referencia en las ecuaciones de la línea recta (Figura 31).

$$\bar{x} \text{ ADI} = \frac{0,349 - 0,0049}{1,3265} = 0,259 \text{ mg/L}$$

$$\bar{x} \text{ UV_Vis} = \frac{0,184 - 0,0033}{0,7132} = 0,253 \text{ mg/L}$$

Al evaluar estos resultados en la ecuación del porcentaje de recobro, se tiene que

$$\%R_{ADI} = \frac{0,259}{0,250} \times 100 = 103,6\%$$

$$\%R_{UV_Vis} = \frac{0,253}{0,250} \times 100 = 101,2\%$$

A su vez, la precisión se calculó como coeficiente de variación según la ecuación:

$$C.V. = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Donde $\bar{x}$ es el promedio de 12 lecturas de la disolución de referencia (0,250 mg/L) y σ es la desviación estándar de dichas lecturas.

Se calcula el coeficiente de variación para ambos métodos sustituyendo los datos de la Tabla 11 en esta ecuación, así:

$$C.V._{ADI} = \frac{0,012}{0,349} \times 100 = 3,4\%$$

$$C.V._{UV_Vis} = \frac{0,005}{0,184} \times 100 = 2,7\%$$

Tanto el método alternativo empleando análisis digital de imagen (ADI), como el método convencional mediante espectrofotometría UV-Vis, presentan valores similares de exactitud como porcentaje de recobro (103,6 vs. 101,2), y de precisión como coeficiente de variación (3,4 vs. 2,7). En ambos aspectos el método UV-Vis presentó un mejor desempeño. Sin embargo, el método propuesto mostró un rendimiento próximo.

6.3.3.4 Síntesis y comparación de las figuras de mérito con ambos métodos

En la Tabla 12 se resumen y comparan las figuras de mérito obtenidas con ambos métodos.

Tabla 12. Comparación de las figuras de mérito de ambos métodos

Figura de mérito	Método ADI	Método UV-Vis
Rango lineal	16 a 500 ppb	16 a 500 ppb
Linealidad (R^2)	0,9993	0,9995
Sensibilidad	1,3265	0,7132
Límite de detección	0,013 mg/L	0,015 mg/L
Límite de cuantificación	0,048 mg/L	0,054 mg/L
Exactitud (%R)	103,6%	101,2%
Precisión (CV)	3,4%	2,7%

Elaboración propia

En síntesis, se puede apreciar que los métodos evaluados presentaron comportamiento lineal en el rango de 16 a 500 ppb, y que esta linealidad fue alta en ambos casos. El método alternativo mediante análisis de imagen (ADI) presentó una sensibilidad significativamente mayor. Por su parte, el método convencional empleando espectrofotometría UV-Vis mostró menores errores de medición, y, por tanto, mejor exactitud y precisión. Finalmente, los límites de detección y cuantificación presentaron valores semejantes con ambos métodos.

6.3.4 Análisis estadístico para los resultados de las muestras de acuicultivo usando ambos métodos

En la Tabla 13 se resumen los resultados de las determinaciones en la concentración de fosfatos (mg/L) de las dos muestras del acuicultivo experimental de la sede El Limonal de la Universidad Santo Tomás, mediante el método propuesto empleando análisis digital de imagen (ADI), y el método convencional usando espectrofotometría UV-Vis (Tablas 6 y 9).

Tabla 13. Comparación de las determinaciones de fosfatos en las muestras con ambos métodos

Muestra 1			Muestra 2		
	ADI	UV-Vis		ADI	UV-Vis
Media	0,233	0,235	Media	0,181	0,179
Desviación estándar	0,00312	0,00449	Desviación estándar	0,00293	0,00280
Observaciones	6	6	Observaciones	6	6

Elaboración propia

Para el análisis estadístico, empleando las funciones de análisis de datos de Microsoft Excel, se realizó inicialmente la comparación de las varianzas de los resultados obtenidos para cada muestra mediante ambos métodos, para esto se aplicó la prueba de F de homogeneidad de varianza. De este modo, se plantearon las siguientes hipótesis:

H₀: Las varianzas en las concentraciones de fosfatos encontradas en ambos métodos no presentan diferencias significativas.

H₁: Las varianzas en las concentraciones de fosfatos encontradas en ambos métodos presentan una diferencia significativa.

Se trabajó con un nivel de confianza del 95% ($p=0,05$). El criterio de aceptación es: si $P_{cal} > 0,05$ se admite la H_0 , en caso contrario se rechaza H_0 y se admite H_1

El valor de P_{cal} para la comparación de las varianzas de la muestra 1 es de 0,272. Por su parte, el valor de P_{cal} para la comparación de las varianzas de la muestra 2 es de 0,438. Ambos valores son mayores a 0,05, por tanto, en las dos muestras se acepta la hipótesis nula, es decir que las varianzas de las concentraciones de fosfatos determinadas con ambos métodos no presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%.

Luego de confirmar que las varianzas de ambos métodos son similares, se procedió a aplicar la prueba t para comparar medias de muestras con varianzas iguales. Para esta prueba se plantearon las siguientes hipótesis:

H₀: Las medias de las concentraciones de fosfatos encontradas en ambos métodos no presentan diferencias significativas.

H₁: Las medias de las concentraciones de fosfatos encontradas en ambos métodos presentan una diferencia significativa.

Se trabajó con un nivel de confianza del 95% ($p=0,05$). El criterio de aceptación es: si $P_{cal} > 0,05$ se admite la H_0 , en caso contrario se rechaza H_0 y se admite H_1

El valor de P_{cal} para la comparación de las medias de la muestra 1 es de 0,319. A su vez, el valor de P_{cal} para la comparación de las medias de la muestra 2 es de 0,166. Ambos valores son mayores a 0,05, por tanto, en las dos muestras se acepta la hipótesis nula, es decir que las medias de las concentraciones de fosfatos determinadas con ambos métodos no presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%.

7. Conclusiones

En esta investigación se ha desarrollado con éxito un método analítico alternativo para la determinación y cuantificación de fosfatos en medio acuoso, utilizando un teléfono celular tipo *smartphone* y análisis digital de imagen. Este método demostró ser efectivo y accesible, proporcionando una herramienta innovadora para el monitoreo de fosfatos en muestras acuosas.

Se diseñó y construyó un fotómetro casero basado en un *smartphone* para cuantificar la concentración de analitos en muestras acuosas. Este dispositivo demostró su aplicación práctica en la determinación de fosfatos, ofreciendo una solución sencilla para entornos de investigación con recursos limitados.

El funcionamiento del fotómetro alternativo se ajustó satisfactoriamente mediante la utilización de un patrón de referencia, la construcción de su curva de calibración y el análisis digital de imagen. Estos ajustes optimizaron la precisión y confiabilidad del dispositivo para la cuantificación de fosfatos.

Finalmente, se aplicó exitosamente el método desarrollado para la determinación de fosfatos en muestras ambientales, y se validaron los resultados mediante la comparación con un espectrofotómetro comercial de referencia. La congruencia entre los resultados obtenidos en términos de sensibilidad, precisión y exactitud demuestra la eficacia y fiabilidad del analizador ambiental basado en un *smartphone*, confirmando su utilidad como una herramienta alternativa y de bajo costo para la cuantificación de fosfatos, y potencialmente otros analitos, en investigación científica.

Referencias

- Akkaynak, D., Treibitz, T., Xiao, B., Gürkan, U. A., Allen, J. J., Demirci, U., & Hanlon, R. T. (2014). Use of commercial off-the-shelf digital cameras for scientific data acquisition and scene-specific color calibration. *JOSA A*, 31(2), 312-321. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.31.000312>
- Bachmann, L. M., y Miller, W. G. (2020). Spectrophotometry. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (pp. 119–133). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00007-7>
- Bergua, J. F., Álvarez-Diduk, R., Idili, A., Parolo, C., Maymó, M., Hu, L., y Merkoçi, A. (2022). Low-Cost, User-Friendly, All-Integrated Smartphone-Based Microplate Reader for Optical-Based Biological and Chemical Analyses. *Analytical Chemistry*, 94(2), 1271–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04491>
- Breslauer, D. N., Maamari, R. N., Switz, N. A., Lam, W. A., & Fletcher, D. A. (2009). Mobile Phone Based Clinical Microscopy for Global Health Applications. *PLoS ONE*, 4(7), e6320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006320>
- Bouwman, A. F., Beusen, A. H. W., y Billen, G. (2009). Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970-2050. *Global Biogeochemical Cycles*, 23(4), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2009GB003576>
- Burgess, C. (2007). Chapter 1 The basics of spectrophotometric measurement (pp. 1–19). [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(07\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(07)80003-5)
- Cedillo, K., Palacios, G. (2021). App en Android para la determinación de las características físicas del cultivo hidropónico, mediante el análisis de imágenes. [Tesis de Pregrado, Universidad de Guayaquil]. Repositorio Institucional – Universidad de Guayaquil. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/52668>

- Christodouleas, D. C., Nemiroski, A., Kumar, A. A., y Whitesides, G. M. (2015). Broadly Available Imaging Devices Enable High-Quality Low-Cost Photometry. *Analytical Chemistry*, 87(18), 9170–9178. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01612>
- Cid, R. y González, D. (2020). Una aproximación a la espectrometría en Educación Secundaria. *Anales de Química de la RSEQ*, 116(1), 25-30. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8109235.pdf>
- Constitución Política de Colombia [Const]. Art. 79 y 80. Julio 7 de 1991 (Colombia). 2da Ed. Editorial Legis.
- Corrêa, G. L. P. (2015). Desenvolvimento e avaliação de um protótipo de colorímetro por imagens digitais. [Tesis de Maestría, Universidad de Santa Cruz del Sur]. Repositorio Institucional – Universidad de Santa Cruz del Sur UNISC. <https://repositorio.unisc.br/jspui/handle/11624/1542>
- Costa, D., Aziz, U., Elliott, J., Baulch, H., Roy, B., Schneider, K., y Pomeroy, J. (2020). The Nutrient App: Developing a smartphone application for on-site instantaneous community-based NO₃ and PO₄ monitoring. *Environmental Modelling y Software*, 133, 104829. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2020.104829>
- Decreto 1076 de 2015 [Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible]. Por el cual se expide el Decreto Único Reglamentario del Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible. 26 de mayo de 2015.
- Delfino, J. M. (2020). ReadPlate 3.0. <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/readplate/index.html>
- Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L., & Zhang, G. (2021). Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*, 171, 108829. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>

- Friedman-Berg, F., Allendoerfer, K., y Pai, S. (2008). Moving toward an air traffic control display standard: Creating a standardized color palette for terminal situation displays. US Department of Transportation (No. DOT/FAA/TC-08/15). https://www.researchgate.net/publication/271527974_Moving_Toward_an_Air_Traffic_Control_Display_Standard_Creating_a_Standardized_Color_Palette_for_Terminal_Situation_Displays
- Galvis, J. G., y Ballesteros, M. I. (2006). Evaluación de los parámetros de calidad para la determinación de fósforo disponible en suelos. *Revista Colombiana de Química*, 35(1).
- Gonzalez, R. C., Woods, R. E. (2018). *Digital Image Processing*. Pearson New York.
- Hamer, M., Beraldi, A. M., Gomez, S. G. J., Ortega, F., Onna, D., y Hamer, M. (2021). Glowing-in-the-Screen: Teaching Fluorescence with a Homemade Accessible Setup. *Journal of Chemical Education*, 98(8), 2625–2631. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00328>
- Lary, D. J., Schaefer, D., Waczak, J., Aker, A., Barbosa, A., Wijeratne, L. O., ... y Lary, M. D. (2021). Autonomous Learning of New Environments with a Robotic Team Employing Hyper-Spectral Remote Sensing, Comprehensive In-Situ Sensing and Machine Learning. *Sensors*, 21(6), 2240. <https://doi.org/10.3390/s21062240>
- Lasso, A. (2007). Fósforo soluble en agua por el método del ácido ascórbico. *Instituto De Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM*, 3, 1-11.
- Li, H., Fang, T., Tan, Q.-G., y Ma, J. (2022). Development of a versatile smartphone-based environmental analyzer (vSEA) and its application in on-site nutrient detection. *Science of The Total Environment*, 838, 156197. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156197>

- Linhardt, J. (2016). Colorimetric detection of selected gases for work and food safety applications [Tesis Doctoral, Universidad de Regensburg]. Repositorio Institucional – Universidad de Regensburg. <https://epub.uni-regensburg.de/33776/>
- Maldonado, J., Pimentel, R. G. C., Merlín, I. E. M., y Martínez, E. S. M. (2018). La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. *Latin-American Journal of Physics Education*, 12(2), 7. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6556408.pdf>
- Mars Fishcare. (2017). Safety Data Sheet Phosphate Test Solution #1. <https://apifishcare.com/pdfs/products-us/phosphate-test-kit/api-phosphate-test-kit-solution-1-safety-data-sheet.pdf>
- Mars Fishcare. (2017). Safety Data Sheet Phosphate Test Solution #2. <https://apifishcare.com/pdfs/products-us/phosphate-test-kit/api-phosphate-test-kit-solution-2-safety-data-sheet.pdf>
- Martelo, M. J. (2014). Desarrollo de métodos rápidos basados en espectroscopía UVVIS-NIR para el análisis de vinos [Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela]. Repositorio Institucional – Universidad de Santiago de Compostela. <http://hdl.handle.net/10347/10985>
- Matlock, B. C., y Wilmington, D. E. (2017). Differences in bacterial optical density measurements between UV-Visible spectrophotometers. Thermo Scientific, Wilmington, DE USA.
- Mekonnen, M. M., y Hoekstra, A. Y. (2018). Global Anthropogenic Phosphorus Loads to Freshwater and Associated Grey Water Footprints and Water Pollution Levels: A High-Resolution Global Study. *Water Resources Research*, 54(1), 345–358. <https://doi.org/10.1002/2017WR020448>

- Morris, R. (2015). Spectrophotometry. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 11(1).
<https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0201s11>
- Mutlu, A. Y., Kılıç, V., Özdemir, G. K., Bayram, A., Horzum, N., & Solmaz, M. E. (2017). Smartphone-based colorimetric detection via machine learning. *Analyst*, 142(13), 2434-2441. <https://doi.org/10.1039/C7AN00741H>
- Oliveira, K. A., Damasceno, D., de Oliveira, C. R., da Silveira, L. A., de Oliveira, A. E., y Coltro, W. K. T. (2016). Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. *Analytical Methods*, 8(35), 6506–6511.
<https://doi.org/10.1039/C6AY01262K>
- Ortiz-Gómez, I. (2014). Design and analytical characterization of capillary microfluidic devices [Tesis Doctoral, Universidad de Granada]. Repositorio Institucional – Universidad de Granada. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/63588?show=full>
- Pacheco, M. D. (2021). Espectrofotómetro VIS de bajo costo y portable para mediciones en línea. [Tesis de Pregrado, Universidad de los Andes]. Repositorio Institucional – Universidad de los Andes. <https://repositorio.uniandes.edu.co/handle/1992/53759>
- Peng, B., Zhou, J., Xu, J., Fan, M., Ma, Y., Zhou, M., Li, T., y Zhao, S. (2019). A smartphone-based colorimetry after dispersive liquid–liquid microextraction for rapid quantification of calcium in water and food samples. *Microchemical Journal*, 149, 104072.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104072>
- Portiansky, E. L. (2018). Análisis multidimensional de imágenes digitales. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Resolución 2115 de 2007 [Ministerio de Protección Social, y Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial]. Por la cual se señalan características, instrumentos básicos y

- frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. 22 de junio de 2007.
- Resolución 631 de 2015 [Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible]. Por la cual se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público y se dictan otras disposiciones. 18 de abril de 2015.
- Resolución 689 de 2016 [Ministerio de Salud y Protección Social, y Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible]. Por la cual se adopta el reglamento técnico que establece los límites máximos de fósforo y la biodegradabilidad de los tensoactivos presentes en detergentes y jabones, y se dictan otras disposiciones. 3 de mayo de 2016.
- Roda, A., Michelini, E., Zangheri, M., di Fusco, M., Calabria, D., & Simoni, P. (2016). Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.019>
- Sagan, C. (1980). *Cosmos*. Random House New York.
- Sánchez, A. (2006). Integración de técnicas de manejo de la imagen digital para la web y aplicaciones multimedia. [Tesis de Pregrado, Universidad de Las Fuerzas Armadas de Ecuador ESPE]. Repositorio Institucional – Universidad de Las Fuerzas Armadas de Ecuador ESPE. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/906>
- Schaefer, S. (2014). *Colorimetric Water Quality Sensing with Mobile Smart Phones* [Tesis de Maestría, The University of British Columbia]. Repositorio Institucional – The University of British Columbia. <https://open.library.ubc.ca/soa/cIRcle/collections/ubctheses/24/items/1.0074338>

- Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Seitzinger, S. P., Mayorga, E., Bouwman, A. F., Kroeze, C., Beusen, A. H. W., Billen, G., van Drecht, G., Dumont, E., Fekete, B. M., Garnier, J., y Harrison, J. A. (2010). Global river nutrient export: A scenario analysis of past and future trends. *Global Biogeochemical Cycles*, 24(4), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2009GB003587>
- Smith, V. H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(2), 126–139. <https://doi.org/10.1065/espr2002.12.142>
- Soldat, D. J., Barak, P., y Lepore, B. J. (2009). Microscale Colorimetric Analysis Using a Desktop Scanner and Automated Digital Image Analysis. *Journal of Chemical Education*, 86(5), 617. <https://doi.org/10.1021/ed086p617>
- Swarowsky, L. A., Pereira, R. F., & Durand, L. B. (2023). Influence of image file and white balance on photographic color assessment. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2023.04.005>
- Uzquiano, L. A. (2018). Diseño y montaje de un sistema colorimétrico de bajo costo y su aplicación en la determinación de hierro con 1,10-Fenantolina. [Tesis de Pregrado, Universidad de El Salvador]. Repositorio Institucional – Universidad de El Salvador. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/20220/>
- Valverde, A., y Obando, J. P. (2021). Desarrollo de un método analítico para la determinación de fósforo en medio acuoso, utilizando una aplicación móvil Android (Aplicación Photometrix). Como alternativa a métodos instrumentales de análisis convencionales. [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma de Nicaragua León]. Repositorio Institucional

- Universidad Autónoma de Nicaragua León.
<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/9130>
- Vidal, E. M. (2020). Aplicación de nuevas metodologías analíticas a sistemas determinativos y de “screening” para el estudio muestras ambientales y alimentos: desarrollo y validación de dispositivos basados en detección por imágenes. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur]. Repositorio Institucional – Universidad Nacional del Sur.
<https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/5546>
- Viera, P. M. (2014). Estudio del acoplamiento de un colector solar con fibras ópticas plásticas para la iluminación de interiores. [Tesis de Maestría de la Universidad Autónoma de Nuevo León]. Repositorio Institucional – Universidad Autónoma de Nuevo León.
<http://eprints.uanl.mx/4552/>
- Xing, Y., Zhu, Q., Zhou, X., y Qi, P. (2020). A dual-functional smartphone-based sensor for colorimetric and chemiluminescent detection: A case study for fluoride concentration mapping. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 319, 128254.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128254>
- Zheng, S., Li, H., Fang, T., Bo, G., Yuan, D., y Ma, J. (2022). Towards citizen science. On-site detection of nitrite and ammonium using a smartphone and social media software. *Science of The Total Environment*, 815, 152613. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152613>