



Universidad de El Salvador
Facultad de Ciencias Naturales y Matemática
Escuela de Química

Trabajo de Graduación:

“Aplicación de la Digestión por Persulfato en la Determinación de Nitrógeno Total por el Método de Brucina para Muestras de Agua Marina”

Presentado por:

Gerardo Alberto Ruiz Rodríguez.

Para Optar al Grado de:

Licenciatura en Ciencias Químicas.

Docente Director:

Dr. Néstor Guillermo Orellana Velado

Ciudad Universitaria, Marzo 2019

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS.

Rector:

Maestro Roger Armando Arias.

Secretario General:

Maestro Cristóbal Hernán Ríos Benítez.

Decano. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática:

Lic. Mauricio Hernán Lovo Córdova.

Director. Escuela de Química:

Dr. Alex Adonai Osorio Landaverde.

Coordinadora de Procesos de Graduación. Escuela de Química:

Lic. Jennifer Beatriz Chávez Zamora.

Tribunal Calificador:

Dra. Velia Ruth Sosa Gómez

Lic. Jennifer Beatriz Chávez Zamora.

Ciudad Universitaria, Marzo 2019.

- ¿Y cómo se habituaria usted, por ejemplo?, o mejor, ¿cómo se habituó (contra un veneno)?
- Es muy fácil. Suponga que usted sabe por adelantado qué veneno van a usar contra usted. Suponga que el veneno sea... la brucina, por ejemplo, y que usted toma un miligramo el primer día, dos miligramos el segundo; pues bien, al cabo de diez días tendrá usted un centigramo; al cabo de veinte días, aumentando otro miligramo, tendrá tres centigramos, es decir, una dosis que usted soportaría sin inconveniente, y que sería ya muy peligrosa para otra persona que no hubiera tomado las mismas precauciones que usted; en fin, al cabo de un mes, bebiendo agua de la misma jarra, usted mataría a la persona que lo bebiera al mismo tiempo que usted, sin que usted notara más que un simple malestar como lo sentiría con cualquier otra sustancia venenosa mezclada en el agua.
- ¿Usted no conoce otro contraveneno?
- No lo conozco.

El conde de Montecristo. (Alexandre Dumas)

DEDICATORIA.

Este trabajo de graduación está dedicado a Dios Todopoderoso, en sus múltiples manifestaciones: artífice, facilitador y catalizador de este trabajo de graduación.

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesor, Dr. Néstor Orellana, por el tiempo dedicado para atender mis consultas y por sus acertadas sugerencias durante el desarrollo de la metodología.

Al Tribunal Calificador: Dra. Velia Sosa y Lic. Jennifer Chávez por sus observaciones y tiempo dedicado al proceso de revisión y evaluación de la presentación pública del presente trabajo de graduación.

A Regina del Carmen Cortez Rodríguez. Coordinadora del Laboratorio de Calidad del Agua. Ministerio del Medio Ambiente y Recursos Naturales (El Salvador) y Tod A. Leighfield. Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research. NOAA Marine Biotoxins Program (USA) por su colaboración en la adquisición de los Materiales de Referencia Certificados utilizados en el presente trabajo de graduación.

A mi familia -en particular, a mi madre, Ana del Carmen; tías, Blanca y Daysi; y mi hermano, Gustavo- por su disposición de servicio y apoyo económico durante el desarrollo del pregrado, cuando este fue necesario. .

A mi novia, Fátima, por haber sido mi consejera y soporte emocional para superar las dificultades por las cuales tuve que pasar durante el presente año.

A mis colegas: Guillermo, José Alfredo, Jorge Alberto, Sami, Vicente, Diana, Ricardo, Guadalupe, José, Sandra, Rebeca, Jonathan, Jeniffer, Adverdi, José, Elba, Gabriela y Laura por haberme escuchado y aconsejado posibles acciones para solucionar los problemas encontrados durante el desarrollo de la parte experimental del presente trabajo de graduación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen.	13
Introducción.	15
Marco Teórico.	17
A. Analito: Nitrógeno Total en Agua de Mar.	17
B. Principio del Método.	24
C. Validación del Método.	39
Metodología	49
1. Desarrollo de la metodología.	49
2. Calibración de los instrumentos de medición asociados al análisis.	51
3. Validación de la metodología.	54
4. Estimación de la incertidumbre expandida de la metodología.	57
Análisis Teórico y Resultados	61
1. Desarrollo de la metodología.	61
2. Calibración de los instrumentos de medición asociados al análisis.	62
3. Validación de la metodología.	64
4. Cuantificación de los componentes de incertidumbre de la metodología	74
5. Estimación de la incertidumbre expandida de la metodología	84

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

Discusión de Resultados	87
1. Desarrollo de la metodología.	87
2. Calibración de los instrumentos de medición asociados al análisis.	87
3. Validación de la metodología.	88
4. Estimación de la incertidumbre expandida de la metodología.	92
Conclusiones	95
Recomendaciones	97
Referencias Bibliográficas	99
Anexos	107
A. Procedimiento estándar operativo de la metodología validada.	107
B. Resultados crudos (sin analizar) para la calibración de los instrumentos de medición.	115
C. Resultados crudos (sin analizar) de las curvas de calibración para la validación de la metodología.	119
D. Procedimientos de preparación y absorbancias registradas para el estudio de la capacidad de digestión y el estudio de selectividad.	121

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Salinidad y distribución de componentes inorgánicos y orgánicos nitrogenados en diferentes sitios y a diferentes profundidades del Océano Pacífico Sur.	20
Tabla 2. Composición para 1 kg de Agua de Mar Artificial. Salinidad 35.00 psu. pH 8.2.	38
Tabla 3. Especies químicas nitrogenados utilizadas para el estudio de la capacidad de digestión.	56
Tabla 4. Comparación de diferentes técnicas de digestión oxidativa para compuestos orgánicos nitrogenados a diferentes temperaturas (T, °C) y tiempos (t, h).	62
Tabla 5. Resultados de la calibración de los instrumentos de medición para el método validado.	64
Tabla 6. Propagación de errores aleatorios y sistemáticos en la elaboración de la curva de calibración.	67
Tabla 7. Datos utilizados para el cálculo de la ecuación de la línea recta que describe la curva de calibración.	68
Tabla 8. Cálculos realizados para el ajuste de mínimos cuadrados.	70
Tabla 9. Resultados del estudio de selectividad para la presente metodología.	73
Tabla 10. Resultados del estudio de exactitud y capacidad de digestión para la presente metodología.	74

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 11. Cálculos realizados para la cuantificación de la desviación estándar de la concentración determinada.	75
Tabla 12. Resultados de la evaluación de variables que influyen en la concentración de la metodología validada.	76
Tabla 13. Cálculos realizados para la cuantificación del estadístico t para mínima diferencia entre pendientes.	78
Tabla 14. “Hoja de cálculo” utilizada para la determinación de la incertidumbre estándar combinada.	85

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Distribución de nitrato, fosfato, y silicato, en el Océano Pacífico Norte.	17
Figura 2. Diagramas de la vista clásica y presente del ciclo del Nitrógeno en las aguas superficiales de los océanos oligotróficos.	18
Figura 3. Formas nitrogenadas de DON en el Océano Pacífico. Perfil de profundidad.	23
Figura 4. Diseño instrumental para un espectrómetro de doble haz para la región UV-VIS.	28
Figura 5. Fórmulas estructurales de la brucina y la estricnina.	31
Figura 6. Diagrama de las ecuaciones químicas que describen el comportamiento óxido-reducción de la brucina involucrada en la reacción con iones nitrato en ácido sulfúrico concentrado.	33
Figura 7. Diagrama de Latimer de las especies nitrogenadas en medio acuoso.	34
Figura 8. Absorbancia vs concentración de nitrato (mg·N/L), en función del tiempo de desarrollo del color. Todas las curvas fueron desarrolladas con soluciones a 100 °C.	36
Figura 9. Diagrama de operaciones para la determinación de nitrógeno total por el método de brucina, utilizando la digestión con persulfato alcalino.	50
Figura 10. Fórmula estructural de los compuestos orgánicos nitrogenados seleccionados para la evaluación de la capacidad de digestión.	56

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 11. Diagrama simplificado de las fuentes de incertidumbre de la determinación de nitrógeno total por el método de brucina, utilizando la digestión con persulfato alcalino.	58
Figura 12. Curva de absorción contra longitud de onda del cromóforo de la brucina, utilizando una solución de nitrato a una concentración de 2.00 mg·N/L.	61
Figura 13. Curva de Absorbancia contra un amplio rango de concentración (mg·N/L) para determinar el rango útil de la metodología validada.	65
Figura 14. Curva de absorbancia contra concentración de nitrógeno total (mg·N/L) en el rango validado.	69
Figura 15. Gráfica de residuales de la curva de calibración en el rango validado.	70
Figura 16. Efecto del cambio de temperatura en la Etapa de Digestión Oxidativa en la curva de calibración de la metodología validada.	77
Figura 17. Efecto del cambio de tiempo en la Etapa de Eliminación del Exceso de Oxidante en la curva de calibración de la metodología validada.	81
Figura 18. Efecto del cambio de temperatura en la Etapa de Desarrollo de Color en la curva de calibración de la metodología validada.	83
Figura 19. Contribución de cada componente en la incertidumbre estándar combinada c_{TPN} .	85

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.

APHA	Asociación de Salud Pública de los Estados Unidos de América.
ASW	Agua de mar artificial.
CI	Intervalo de confianza.
COD	Demanda Química de Oxígeno.
CPS	Corriente Pacífico Sur.
CRM	Material de Referencia Certificado.
CV	Coefficiente de variación.
DIN	Nitrógeno inorgánico disuelto.
DON	Nitrógeno orgánico disuelto.
EP	Elaboración propia.
GL	Grados de libertad.
ISO	Organización Internacional de Normalización.
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
LED	Diodo emisor de luz.
LNSW	Agua de mar baja en nutrientes.
LOQ	Límite de Cuantificación.
MARN	Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de la República de El Salvador.
NSO	Norma Salvadoreña Obligatoria.
¹⁵N CPMAS RMN	Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear por Polarización Cruzada con Giro al Ángulo Mágico de Nitrógeno-15.
ONU	Organización de las Naciones Unidas.
SMPR	Requerimiento de Rendimiento de un Método Estándar.

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.

SNET	Servicio Nacional de Estudios Territoriales
TR	Reporte técnico.
TRIX	Índice Tráfico.
UES	Universidad de El Salvador.
US-EPA	Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos de América.
UV-VIS	Región electromagnética Ultravioleta – Visible.

RESUMEN

Se ha logrado desarrollar una metodología para la determinación de nitrógeno total en agua de mar utilizando la técnica de digestión oxidativa con persulfato de potasio alcalino (seguida de una eliminación del exceso de oxidante con bisulfito de sodio) y el método de brucina. Dicha metodología fue validada con los siguientes parámetros: Rango lineal de trabajo: 0.20 a 1.33 mg·N/L. Límite de cuantificación: 0.20 mg·N/L. Selectividad: No se observan interferencias de iones hipoclorito (hasta 1.111 mg·Cl/L), iones fosfato (hasta 15.000 mg·P/L), iones silicato (hasta 0.700 mg·Si/L), iones cromo hexavalente (hasta 0.500 mg·Cr/L) y iones manganeso (hasta 2.000 mg·Mn/L). Precisión: Coeficiente de variación de 14.4%. Exactitud: Recuperación relativa de adición de 78.5%. Complementariamente, se evaluó la capacidad de digestión de la metodología (con resultados aceptables para muestras inorgánicas y orgánicas nitrogenadas), se calibraron los instrumentos de medición asociados al análisis y se estimó la incertidumbre expandida de la metodología.

INTRODUCCIÓN.

La conservación y utilización sostenible de los océanos, mares y recursos marinos para el desarrollo sostenible constituye el Objetivo 14 de la "Agenda 2030", impulsada por las Naciones Unidas con el objetivo de transformar nuestro mundo en un lugar mejor de aquí a 2030 (ONU, 2015). En la declaratoria titulada "Nuestros océanos, nuestro futuro: llamamiento a la acción", la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoce la importancia de los océanos como reguladores del clima, fuente de biodiversidad marina y proveedores clave de alimentos y nutrición, turismo y servicios de los ecosistemas, y como un motor del desarrollo y el crecimiento económicos sostenibles (ONU, 2017).

Dicho objetivo conlleva a la necesidad de una adecuada gestión de recursos; la cual, es garantizada a través del monitoreo periódico de los cuerpos de agua existentes. Dicha actividad, nos sirve para evaluar el estado, en el cual se encuentran los cuerpos de agua, y permite realizar acciones pertinentes que puedan garantizar la sostenibilidad de los ecosistemas involucrados (US-EPA & The Ocean Conservancy, 2006). Debido al aumento de la frecuencia de casos de eutrofización y a su alta variabilidad temporal, en intensidad y extensión en el medio ambiente marino costero, surgió la necesidad de desarrollar un índice (TRIX); el cual, considera los siguientes parámetros: transparencia de disco Secchi, concentración de clorofila α , oxígeno disuelto (como desviación del porcentaje de saturación) y concentración de nitrógeno y fósforo total (Vollenweider, Giovanardi, Montanari & Rinaldi, 1998). Dentro de los parámetros que incluye el índice TRIX, la determinación de nitrógeno total constituye una de las tareas más difíciles de análisis (Hansen & Koroleff, 1999).

Tradicionalmente, el nitrógeno total se ha determinado como el resultado de cuantificar -por separado o de manera combinada- sus componentes: las concentraciones de iones nitrato, amonio, nitrito y la concentración de la materia orgánica nitrogenada (Jenkins, 1968). El análisis de cada uno de estos componentes supone una alta inversión de recursos y tiempo; lo cual, no es accesible para laboratorios de bajo presupuesto; razón por la cual, surge la necesidad de desarrollar nuevas metodologías para este analito en la matriz de agua de mar.

El uso de persulfato de potasio como agente oxidante logra oxidar todas las especies nitrogenadas a iones nitrato (D'Elia, Sraudler & Corwin, 1977), reduciendo los métodos analíticos a uno solo. En el estudio reportado por Smart, Reid y Jones, (1981) los costos requeridos fueron aproximadamente ocho veces más grandes para Nitrógeno Total Kjeldahl (un método analítico que mide la concentración de iones amonio y materia orgánica nitrogenada) que para Nitrógeno Total por Persulfato (utilizando la determinación de iones nitrato por reducción con cadmio metálico).

Debido a que la metodología utilizada en la actualidad para Nitrógeno Total por Persulfato utiliza cadmio metálico granulado, un reactivo químico altamente tóxico y carcinogénico (Sigma-Aldrich, 2017), se generan las siguientes preguntas: ¿es posible desarrollar y validar una nueva metodología manual para determinar nitrógeno total? y ¿es posible combinar dos técnicas como la digestión por persulfato alcalino y el método de brucina, un reactivo menos tóxico que el cadmio (Sigma-Aldrich 2016), para determinar nitrógeno total?

El presente trabajo de graduación tiene como objetivo responder a dichas preguntas, por medio del desarrollo y validación de una metodología -de la cual, no se ha encontrado documentación previa en la literatura científica consultada- para la determinación de Nitrógeno Total en agua de mar utilizando la digestión por persulfato alcalino y la determinación de nitratos por el método de brucina.

MARCO TEÓRICO.

El desarrollo y validación de un método de análisis químico implica poseer conocimiento de las propiedades químicas del analito, el principio fisicoquímico de la metodología a desarrollar y los parámetros de evaluación a usar para validar el desempeño y estimar, en un cierto nivel de confianza, la incerteza del método.

A. Analito: Nitrógeno Total en Agua de Mar.

El nitrógeno, junto al fósforo y el silicio, son tres elementos esenciales para el sostenimiento de la vida en los ecosistemas marinos. Dichos elementos son referidos con el término de "nutrientes" y su fijación en materia orgánica, a través de organismos autótrofos microscópicos (fitoplancton), es expresada a través de la ecuación empírica de Redfield (*Ecuación Química 1*). La razón C:N:P para dicha ecuación es de 106:16:1 (Redfield, 1958). El silicio es utilizado por algunos organismos, particularmente por los microorganismos diatomeas (fitoplancton) y radiolarias (zooplancton) para formar esqueletos silíceos (De Mora, 1999). Un perfil de profundidad de los nutrientes inorgánicos en el Océano Pacífico Norte es presentado en la *Figura 1*. Las concentraciones de los nutrientes tienden a ser bajas en la capa superficial, especialmente en la zona fótica (la que recibe luz solar); así, se limita la población de organismos autótrofos microscópicos. Las concentraciones más altas de nutrientes están presentes donde la respiración y la descomposición bacteriana del material orgánico descendiente (organismos muertos) es más alta, que es donde el oxígeno se encuentra en su mínimo.

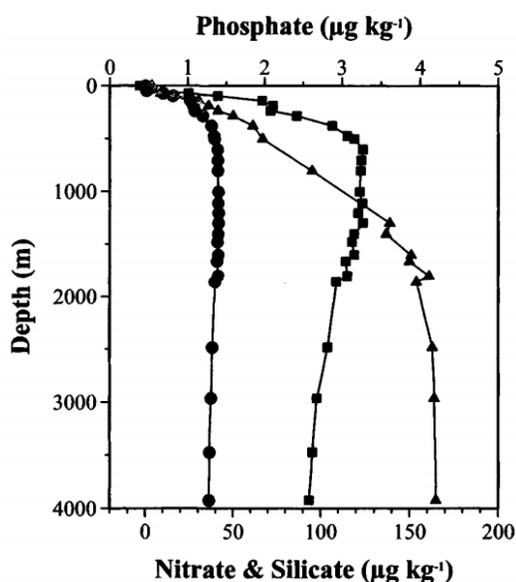
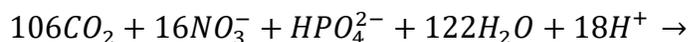


Figura 1. Distribución de nitrato, NO_3^- , (●) fosfato, PO_4^{3-} , (■) y silicato, SiO_4^{4-} , (▲) en el Océano Pacífico Norte (De Mora, 1999).



Ecuación Química 1.



(De Mora, 1999)

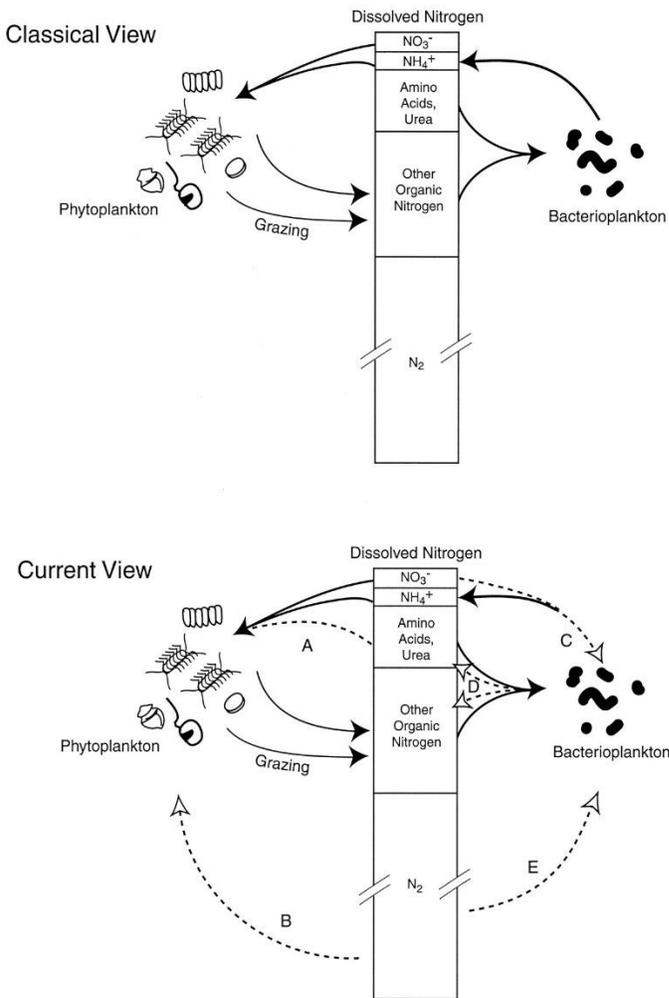


Figura 2. Diagramas de la vista clásica y presente del ciclo del Nitrógeno en las aguas superficiales de los océanos oligotróficos. La composición del nitrógeno disuelto es mostrada como un aproximado de las concentraciones relativas de los constituyentes inorgánicos y orgánicos indicados por el tamaño de las cajas. Las líneas punteadas indican las transformaciones y procesos incluidos en la nueva vista del ciclo del nitrógeno. Detalle de procesos punteados: (A) Algunas especies de fitoplancton ocupan compuestos orgánicos sencillos como fuentes de nitrógeno. (B) Hay múltiples especies de fitoplancton (cianobacterias) en el océano abierto que fijan N_2 . (C) Las bacterias pueden competir por iones nitrato y amonio. (D) Las bacterias pueden excretar urea y también pueden ser fuente de nitrógeno orgánico disuelto de alto peso molecular. (E) Algunos bacterioplancton oceánico parece que pueden fijar N_2 (Zehr & Ward, 2002).

A1.Ciclo del Nitrógeno.

Además de los iones nitrato, NO_3^- , las formas de nitrógeno presentes en el agua marina son (en orden creciente de estado de oxidación) el nitrógeno orgánico y los iones amonio, NH_4^+ , y nitrito, NO_2^- . Todas estas especies nitrogenadas, como el nitrógeno gaseoso elemental (N_2), son bioquímicamente interconvertibles y son componentes del ciclo del nitrógeno (APHA, 1999).

A primera vista, en el ciclo del nitrógeno (**Figura 2**), los iones nitrato y amonio son tomados en la superficie por el fitoplancton y posteriormente, son reciclados de las células de fitoplancton por heterótrofos, tanto por grandes consumidores de algas (ejemplo, invertebrados planctónicos) y descomponedores microbianos. La muerte, lisis y disminución de la población de fitoplancton, ya sea por ingestión de "herbívoros" o por factores de estrés fisiológico (como temperatura, la limitación de nutrientes, u otro factor), liberan nitrógeno en la forma de nitrógeno orgánico disuelto o los iones amonio;

el cual es referido como "nitrógeno regenerado". Los iones nitrato son asimilados después de la reducción secuencial a iones nitrito (por acción de la enzima asimiladora nitrato reductasa) y iones amonio (por acción de la enzima asimiladora nitrito reductasa). Aunque muchos microorganismos prefieren los iones amonio sobre los iones nitrato, recientemente ha quedado claro que no todo el fitoplancton usa iones nitrato y que algunas bacterias ocupan iones nitrato y otras no (Zehr & Ward, 2002).

La existencia de regiones de bajo nivel de nutrientes, (las cuales son llamadas “desiertos de nutrientes”) en las cuales se pueden encontrar ecosistemas de arrecifes de corales de alta productividad, y que contienen miles de especies conviviendo en ellos, (razón por la cual, son considerados las “selvas del mar”) genera dudas sobre la visión tradicional del Ciclo del Nitrógeno. ¿Cómo una "selva" marina existe en un "desierto" oceánico?, es uno de los grandes cuestionamientos que enfrentan los investigadores en arrecifes corales, incluyendo Charles Darwin; razón por la cual, a dicho cuestionamiento se le denomina "la Paradoja de Darwin" (Hoegh-Guldberg & Dove, 2008).

Dicha paradoja es posible cuantificarla a través de los resultados obtenidos en un estudio realizado por Raimbault, García y Cerutti (publicado en 2008), quienes evaluaron la distribución de nutrientes orgánicos e inorgánicos en el Océano Pacífico Sur. En la **Tabla 1**, se resumen cuatro diferentes distribuciones de nitrógeno total; las cuales, se encuentran grandemente influenciadas por la presencia de la Corriente Pacífico Sur. Es de considerar que, aunque la mayor fuente de iones nitrato en la superficie oceánica es debido al transporte de agua de las profundidades rica en iones nitrato hacia la superficie, recientemente se ha demostrado que inclusive este proceso, el cual puede parecer que es gobernado grandemente por fuerzas físicas (corrientes marinas), tiene un importante componente microbiológico. Muchas diatomeas oceánicas de gran tamaño celular, que en algunas ocasiones pueden formar grandes conglomerados, migran desde grandes profundidades para obtener nutrientes de las aguas profundas ricas en nutrientes para solamente regresar a la superficie llevando con ellas iones nitrato (Zehr & Ward, 2002).

Tabla 1. Salinidad y distribución de componentes inorgánicos y orgánicos nitrogenados en diferentes sitios y a diferentes profundidades del Océano Pacífico Sur.

Variables \ Sitio	Costero				Borde CPS ^a			
	Profundidad (m)				Profundidad (m)			
	0	50	100	150	0m	50m	100m	150m
Salinidad	34.25	34.25	34.50	34.75	34.75	34.75	34.75	34.75
Nitrato	10.00	15.00	20.00	25.00	0.05	0.10	0.50	1.00
Nitrito	0.50	0.20	0.05	0.01	0.01	0.05	0.10	0.30
Amonio	0.50	0.10	0.05	0.01	0.05	0.05	0.25	0.30
DON ^b	8.00	5.00	5.0	4.00	6.00	7.00	6.00	5.50
N Total	19.00	20.00	25	29.00	6.10	7.20	6.90	7.10

Variables \ Sitio	Centro CPS ^a				Coral			
	Profundidad (m)				Profundidad (m)			
	0	50	100	150	0	50	100	150
Salinidad	36.00	36.00	35.75	35.75	35.50	35.50	35.75	36.25
Nitrato	0.01	0.01	0.01	0.01	1.00	1.00	1.00	3.00
Nitrito	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.05	0.50	0.20
Amonio	0.05	0.01	0.05	0.01	0.05	0.10	1.00	0.05
DON ^b	6.00	7.00	7.00	5.00	5.00	6.00	6.50	4.00
N Total	6.10	7.00	7.10	5.00	6.10	7.20	9.00	7.30

Notas: Datos tomados de las gráficas publicadas por Raimbault, et al. (2008). Variables expresadas en $\mu\text{mol/L}$; a excepción de salinidad, expresada en psu. Coordenadas de los sitios de muestreo: Costero 73°W -34°S . Borde CPS 91.4°W , 31.8°S . Centro CPS 114°W , 8.4°S . Coral (Archipiélago de las Marquesas) 141.3°W , 8.4°S .

^aCPS = Corriente Pacífico Sur. ^bDON = Nitrógeno Orgánico Disuelto.

Una de las hipótesis centrales alrededor de los arrecifes de corales es que la alta producción de simbiosis mutualísticas (sello distintivo de este ecosistema y que se cuenta en el orden de los miles) se han desarrollado debido a la condición de bajos nutrientes que dicta las ventajas de una asociación cercana entre un productor primario y un consumidor. El resultado final de esa asociación cercana es que los nutrientes inorgánicos requeridos para el productor primario provienen directamente del animal consumidor. Esto evita la dilución que podría de otra manera suceder si los nutrientes y la materia orgánica tuvieran que entrar a la columna de agua (Hoegh-

Guldberg & Dove, 2008). Dichos procesos de adaptación (tanto en este tipo de ecosistema como en otros) generan nuevas rutas que dan diversidad y complejidad a la asimilación y uso de las especies nitrogenadas en el ecosistema marino.

A2.Nitrógeno Gaseoso.

En los océanos, el nitrógeno elemental disuelto es la forma más abundante de nitrógeno (cerca de 22×10^{15} veces más grande que las otras formas). El potencial redox del agua de mar (pE) determina la forma que tiene una estabilidad dominante. Nitrógeno elemental prevalece en valores de pE entre -4 a +12. Valores de pE abajo de -4, el ion amonio prevalece, mientras que valores de pE arriba de +12 y a un pH de aproximadamente 7, el ion nitrato es la especie más estable (Hansen & Koroleff, 1999). El potencial efectivo para el agua de mar en sistemas de importancia biológica puede estar entre 0.43 a 0.75 V (Cooper, 1937). Razón por la cual, todos los otros niveles de oxidación son productos de procesos biológicos, tal y como fue descrito previamente en el Ciclo del Nitrógeno.

A3.Nitrógeno Inorgánico Disuelto.

El Nitrógeno Inorgánico Disuelto (DIN, por sus siglas en inglés) está compuesto por los iones nitrato, nitrito y amonio. El ion nitrato es el producto final de oxidación de los compuestos nitrogenados en agua de mar. Los niveles normales de nitrato se encuentran en el orden de los $6 \mu\text{mol/L}$ a nivel superficial, (con excepción de las regiones polares, donde los niveles tienden a ser hasta cuatro veces más altos) aumentando paulatinamente, conforme aumenta la profundidad hasta niveles entre los 30 a $40 \mu\text{mol/L}$ en profundidades arriba de los 1000 m (Levitus et al., 1993).

El nitrito existe en el agua de mar como un producto intermediario en los procesos de redox del nitrato (desnitrificación) a bajos niveles de oxígeno y a escala microbiana. Los niveles naturales de nitrito en agua de mar son usualmente muy bajos (menor a $0.1 \mu\text{mol/L}$), pero en zonas de transición entre las capas aeróbicas y anaeróbicas, pequeñas capas de nitrito pueden llegar hasta $2 \mu\text{mol/L}$ (Hansen & Koroleff, 1999).

Las concentraciones de los iones amonio en el mar muestran considerables variaciones y pueden cambiar rápidamente. Las cantidades raramente exceden los $5 \mu\text{mol/L}$ en aguas oxigenadas y no

contaminadas, pero en aguas profundas estancadas y anóxicas, como en el Mar Negro, la concentración de iones amonio puede ser tan grande como 100 $\mu\text{mol/L}$. Debido al par ácido base entre iones amonio y amoníaco, el cual tiene un pKa de aproximadamente 9.3, el ion amonio es la especie más dominante en aguas naturales con un pH de 8.2 o menos. Debe tenerse en mente que el amoníaco es tóxico para los peces y para otros organismos marinos, pero no lo es el ion amonio (Hansen & Koroleff, 1999).

A4. Nitrógeno Orgánico Disuelto.

El nitrógeno orgánico está definido funcionalmente como el átomo de nitrógeno unido a átomos de carbono en el estado de oxidación tri-negativo (APHA, 1999). En ambientes oceánicos, costeros y estuarinos, un promedio entre el 25 al 41% del DIN, tomado por el fitoplancton (microorganismos autótrofos), es liberado como Nitrógeno Orgánico Disuelto (DON, por sus siglas en inglés). Dicho DON puede ser reabsorbido o liberado como material particulado sedimentable, dependiendo de su composición química (Bronk, Glibert & Ward, 1994).

Aunque es complicado determinar con exactitud la concentración de cada uno de los componentes orgánicos nitrogenados de los cuales se compone el nitrógeno orgánico total disuelto, es posible caracterizarlos por sus grupos funcionales, a través del análisis del DON por la técnica de Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear por Polarización Cruzada con Giro al Ángulo Mágico de Nitrógeno-15 (^{15}N CPMAS RMN, por sus siglas en inglés). Resultados obtenidos por McCarthy, Pratum, Hedges y Benner (publicados en 1997) mostraron que la mayor parte del DON de alto peso molecular presente en los océanos existe en la forma de amidas, en vez de una colección de heterociclos nitrogenados, como era pensado previamente. La distribución de dichos compuestos orgánicos por sus grupos funcionales es apreciable en la *Figura 3*.

Aunque el 60-80% del nitrógeno orgánico en biomasa o partículas marinas es recuperable como aminoácidos hidrolizables, este solamente representa un pequeño porcentaje (menor al 10%) del DON disponible; esto se debe al rápido reciclaje de los compuestos orgánicos, fundamental para el crecimiento planctónico; el cual, junto con los iones amonio, constituye el 90% de la demanda de nitrógeno para organismos planctónicos heterótrofos (Keil & Kirchman, 1991).

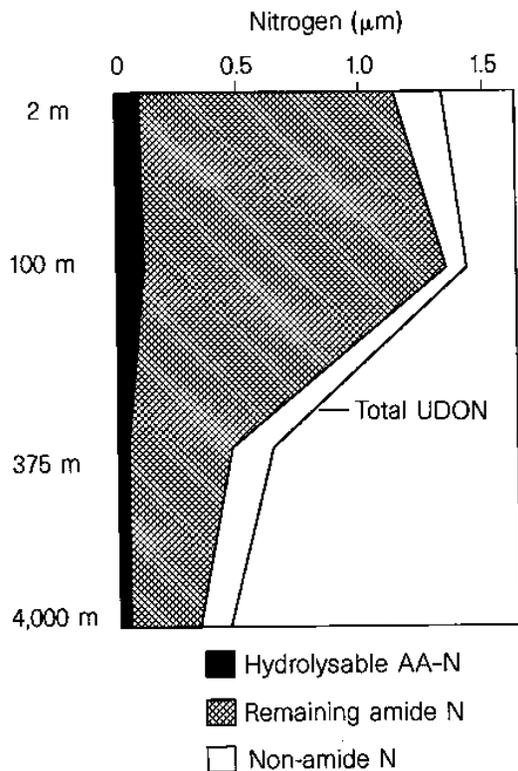


Figura 3. Formas nitrogenadas de DON en el Océano Pacífico, el perfil de profundidad entre 2-375 m fue realizado a partir de la muestra tomada en el punto 12°S, 140°W y la muestra de agua marina profunda (4,000 m) fue tomada en el punto 2°S, 140°W (McCarthy, Pratum, Hedges & Benner, 1997).

Existe un alto porcentaje de compuestos con grupos funcionales amidas, los cuales no provienen de aminoácidos hidrolizables; esto indica otra fuente bioquímica común y abundante, resistente a la degradación biológica. Dichos compuestos, se asume que corresponden a los amino azúcares acetilados; los cuales, son el segundo mayor constituyente de grupos funcionales amidas en biomacromoléculas, los que se encuentran ampliamente en polímeros estructurales de plantas, animales y bacterias. Tal es el caso de la quitina, un polisacárido que existe en los exoesqueletos y paredes celulares de los artrópodos, copépodos, crustáceos, muchos hongos y algunas algas verdes. La quitina es insoluble en agua y en muchos solventes orgánicos, sin embargo, una variedad de bacterias pueden descomponerla usando las enzimas quitinasa y quitobiase, llevando a la formación del monómero 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa, también conocida como glucosamina (De Leeuw & Largeau, 1993).

Aunque los compuestos nitrogenados con grupos funcionales amida claramente dominan la composición del DON, hay una pequeña contribución de otras formas nitrogenadas, especialmente en muestras de aguas marinas profundas con un DON bajo. Esta contribución probablemente corresponde a grupos funcionales similares al indol y pirrol. Dichas estructuras se encuentran entre las formas nitrogenadas más estables de la geosfera, ya que representan gran parte del nitrógeno orgánico observado en petróleos, carbón y algunos sedimentos marinos (McCarthy et al., 1997).

B. Principio del Método.

B1. Métodos de Análisis de Especies Nitrogenadas.

Según Hansen y Koroleff (1999) hay tres grupos principales de métodos analíticos para la determinación de nutrientes:

- *Métodos manuales*, donde cada muestra es tratada individual y manualmente para cada variable.
- *Métodos automatizados*, los cuales son versiones automatizadas de los métodos manuales los cuales pueden ser combinados para realizar simultáneamente análisis multivariantes.
- *Sensores*, los cuales proveen una señal física que representa la concentración del analito en contacto con la muestra de agua de mar, preferiblemente sin un tratamiento químico previo.

Los métodos generales para el análisis de nutrientes -manuales o automatizados- utilizan el principio de la técnica Espectroscopía UV/Visible; en la cual, se convierte el nutriente deseado en un compuesto coloreado con una alta absorptividad molar para un rango adecuado en el espectro visible (Hansen & Koroleff, 1999).

Analíticamente, el DON y los iones amonio pueden ser determinados juntos y son referidos como "Nitrógeno Kjeldahl", un término que refleja la técnica usada para su determinación (APHA, 1999). El método 351.2 de la US-EPA, "Determinación de Nitrógeno Total Kjeldahl por Colorimetría Semi-Automática", consiste (en resumen) en el calentamiento de la muestra en presencia de ácido sulfúrico por 2 h 30 min (digestión); posteriormente, se enfría el residuo, se diluye y se realiza la determinación de iones amonio. En la digestión, se convierten los componentes nitrogenados de origen biológico como aminoácidos, proteínas y péptidos a iones amonio, pero no puede convertir los compuestos nitrogenados de algunos desechos industriales como aminas, compuestos nitro, hidrazonas, oximas, semicarbazonas y algunas aminas ternarias (US-EPA, 1993).

En la vigésima edición de los "Métodos Estándares para la Evaluación de Agua y Aguas Residuales", publicados por la Asociación de Salud Pública de los Estados Unidos de América

(APHA, por sus siglas en inglés) en 1999, se presentan metodologías para determinar nitrógeno total en agua. El nitrógeno total puede ser determinado a través de la oxidación digestiva, utilizando iones persulfato, de todas las formas digeribles de nitrógeno a nitrato, seguido de la cuantificación de los iones nitrato. Dicha metodología coincide con la determinación de nitrógeno Kjeldahl en las siguientes características: el nitrógeno molecular no es determinado y la recuperación de algunos compuestos orgánicos industriales que contienen nitrógeno es bajo. Entre sus diferencias, las especies químicas nitrogenadas obtenidas son diferentes y, por ende, sus procesos de cuantificación son diferentes; además, en los procesos de digestión, la metodología por oxidación digestiva tiene la capacidad de cuantificar algunos compuestos aromáticos que contienen nitrógeno (APHA, 1999).

Se han empleado cinco diferentes métodos para la determinación de iones nitrato en aguas naturales. Muchos de ellos no son lo suficientemente sensibles para permitir la determinación de bajas concentraciones o sufren de serias interferencias por otros constituyentes presentes en agua de mar, o poseen un paso lento que consume mucho tiempo involucrado en el método (Hansen & Koroleff, 1999). Dichos métodos se detallan a continuación:

- La determinación de la nitración de un compuesto orgánico como el 2,6-xilenol. Dicho método está sujeto a interferencias por iones cloruros.
- El método polarimétrico basado en la reducción catalítica del nitrato en presencia de iones uranilo.
- Algún compuesto orgánico que forme productos coloreados si son oxidados con iones nitrato en solución ácida como la brucina, difenilamina, difenilbenzidina y resorcinol.
- Electrodo de iones específicos para la determinación de iones nitrato en agua dulce. Su aplicación en agua de mar está limitada por las interferencias de muchos de los aniones comunes, especialmente por el cloruro.
- La reducción de nitrato en un sistema heterogéneo usando ya sea zinc metálico o cadmio en gránulos, polvo o limaduras.

La metodología a utilizar, en el presente trabajo de graduación, es un consolidado de tres técnicas empleadas en otros métodos de análisis de especies nitrogenadas: la conversión de todas las

especies nitrogenadas a iones nitratos, por medio de una digestión-oxidación por acción de los iones persulfato; la formación de un compuesto coloreado, producto de la reacción de los iones nitrato con la brucina; y, el análisis del compuesto coloreado mediante espectroscopía en la regiones ultravioleta y visibles (UV-VIS) del espectro electromagnético (la combinación de las últimas dos técnicas son conocidas como método de brucina).

B2. Espectroscopía UV-VIS.

La espectroscopía, en especial en la región visible del espectro electromagnético, tal vez sea uno de los métodos de análisis más usados. Se utiliza mucho en química clínica y en las determinaciones ambientales porque hay muchas sustancias que pueden convertirse en derivados coloridos en forma selectiva (Christian, 2009). La espectroscopía utiliza las interacciones de la radiación con la materia para obtener información sobre una muestra. En la región visible del espectro electromagnético, la muestra se estimula aplicándole energía en la forma de luz. Antes de aplicar el estímulo, el analito está predominantemente en su estado energético más bajo, es decir, en el estado basal. Entonces, el estímulo hace que algunas de las especies del analito transiten hacia un estado energético superior o estado excitado (Skoog, Holler & Crouch, 2008).

La luz monocromática, ya sea emitida por un LED o una lámpara y un filtro óptico, pasa a través de una cubeta, con un camino óptico (d) fijo, conteniendo la muestra. El logaritmo de la relación de las intensidades de luz (P) antes y después de pasar a través de la solución es llamada absorbancia (A), y se encuentra en una proporción directa a la concentración (c) del componente absorbente de acuerdo con la Ley de Beer-Lambert, **Ecuación 1**. A la constante ε se le llama absorptividad molar, y depende de la longitud de onda y de la naturaleza del material absorbente (Hansen & Koroleff, 1999).

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Ecuación 1.
(Hansen & Koroleff, 1999)

Es posible hacer cálculos cuantitativos cuando dos o más especies absorbentes en solución tienen espectros que se superponen. De acuerdo con la Ley de Beer-Lambert, la absorbancia total A , a determinada longitud de onda, es igual a la suma de las absorbancias totales de todas las especies

absorbentes. Cuando hay dos especies absorbentes, dicho comportamiento se describe en la **Ecuación 2**.

$$A = A_1 + A_2 = \varepsilon_1 c_1 d + \varepsilon_2 c_2 d$$

Ecuación 2.
(Christian, 2009)

Como muchas leyes físicas, la Ley de Beer-Lambert es una formulación idealizada de un proceso natural. De hecho, la relación entre la absorbancia y la concentración solamente es lineal hasta un valor cercano a 1.0-1.5 unidades de absorbancia (dependiendo del compuesto químico). Una absorbancia de 1.5 indica que solamente el 3% de la luz incidente pasa a través de la cubeta (Hansen & Koroleff, 1999).

Las transiciones, que ocurren en la región UV-VIS, son de tipo electrónicas (donde los electrones de la molécula ascienden a un nivel mayor de energía electrónica) y se deben a la absorción de radiación por tipos específicos de grupos, enlaces y grupos funcionales en la molécula. La longitud de onda de absorción, y su intensidad, depende de esos tipos. La longitud de onda de absorción es una medida de la energía ($h\nu$) que se requiere en la transición. A los grupos que absorben radiación en una molécula se les llama cromóforos. Una molécula que contiene un cromóforo se llama cromógeno. Un auxocromo no absorbe radiación por sí mismo, pero si está presente en una molécula, puede aumentar la absorción de un cromóforo o desplazar la longitud de onda de absorción cuando se une al cromóforo. Los cambios espectrales se pueden clasificar como sigue: desplazamiento batocrómico, el máximo de la absorción se desplaza a longitudes de onda mayores; desplazamiento hipsocrómico, el máximo de la absorción se desplaza a longitudes de onda menores; hipercromía, aumento en absortividad molar (ε); e, hipocromía, disminución en absortividad molar (ε). Cuando hay enlaces múltiples (dobles o triples) separados sólo por un enlace sencillo se dice que están conjugados. Los orbitales π en ellos se traslapan, con lo que disminuye la brecha de energía entre los orbitales adyacentes. El resultado es un desplazamiento batocrómico en el espectro de absorción, y en general, un aumento de la intensidad (Christian, 2009).

El equipo utilizado para dicha técnica es un espectrómetro o espectrofotómetro; el cual, descompone la radiación policromática en distintas longitudes de onda. Todos los espectrómetros

deben contener: una fuente de radiación continua en las longitudes de onda que interesan; un monocromador para seleccionar una banda angosta de longitudes de onda del espectro de la fuente; una celda para la muestra; un detector o transductor, para convertir energía radiante en energía eléctrica, y un instrumento para interpretar la respuesta del detector. La muestra puede estar antes o después del monocromador. Entre los tipos de espectrómetro, se encuentra el espectrómetro de haz doble (**Figura 4**); el cual, tiene dos trayectorias de luz: una para la muestra y otra para el testigo o la referencia. En una distribución común, el haz procedente de la fuente llega a un espejo vibracional o rotatorio que en forma alternada hace pasar el rayo a través de la celda de referencia y la celda de muestra, y desde cada una hasta el detector. De hecho, el detector ve alternativamente el haz de referencia y el de la muestra, y su salida es proporcional a la relación de las intensidades de los dos haces, P_0/P (Christian, 2009).

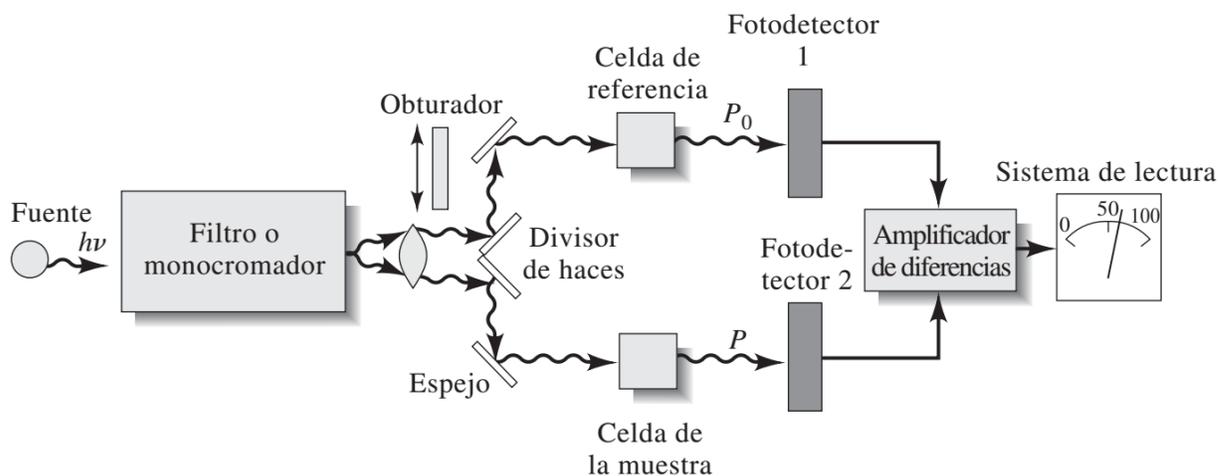


Figura 4. Diseño instrumental para un espectrómetro de doble haz para la región UV-VIS. La radiación proveniente del filtro o monocromador se divide en dos haces que atraviesan de manera simultánea las celdas de referencia y de la muestra antes de chocar con los fotodetectores que se han hecho corresponder (Skoog et al., 2008).

B3. Digestión Oxidativa Usando Iones Persulfato.

La oxidación de compuestos orgánicos nitrogenados con persulfato de potasio, $K_2S_2O_8$, fue introducida por Koroleff en 1969 (D'Elia et al., 1977). En la reacción, hay tres procesos que ocurren simultáneamente: La descomposición térmica del persulfato, la remoción de persulfato por la

reacción con el material orgánico y la remoción del material orgánico hasta que es oxidado a sus componentes inorgánicos (Goulden & Anthony, 1978).

I. Descomposición Térmica del Persulfato.

Kolthoff y Miller (1951) estudiaron la cinética de descomposición del persulfato de potasio en medio acuoso (*Ecuación Química 2*) en detalle en un rango de pH amplio (0-13) en soluciones acuosas enriquecidas con H_2O^{18} entre 50 y 90 °C. La descomposición es de primer orden para persulfato y es catalizado por iones hidrógeno (*Ecuación 3*). El valor de la constante de la ecuación cinética de descomposición k_0 , es $6.0 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2} = 11552 \text{ min}$) y $2.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2} = 33 \text{ min}$) para 50 y 90 °C respectivamente en una solución de hidróxido de sodio al 0.1 M.



Ecuación Química 2.
(Kolthoff & Miller, 1951)

$$-\frac{d}{dt}[S_2O_8^{2-}] = k_1[S_2O_8^{2-}] + k_2[H^+][S_2O_8^{2-}]$$

$$k_0 = k_1 + k_2[H^+]$$

$$-\frac{d}{dt}[S_2O_8^{2-}] = k_0[S_2O_8^{2-}]$$

Ecuación 3.
(Kolthoff & Miller, 1951)

II. Reacción del Persulfato con los Compuestos Nitrogenados.

Koroleff encontró que se obtiene más de un producto en la oxidación de la materia orgánica nitrogenada con persulfato en medio ácido; mientras que, bajo condiciones alcalinas, se produce únicamente nitrato (citado en D'Elia et al., 1977). Dicho comportamiento contrasta con los compuestos orgánicos fosforados, que pueden fácilmente romperse a compuestos inorgánicos al calentar a ebullición la muestra en una solución ácida de persulfato (Valderrama, 1981).

Koroleff estudió la oxidación en un medio alcalino y obtuvo recuperaciones cuantitativas como iones nitrato de una gran variedad de compuestos orgánicos nitrogenados, en muestras que incluyen aguas residuales con alto contenido de nitrógeno orgánico; los resultados son comparables favorablemente con la digestión Kjeldahl. En algunos casos,

los anillos heterocíclicos de cinco miembros no son liberados; sin embargo, las cantidades de dichos compuestos en aguas naturales son tan pequeños que esto puede ser despreciado (citado en Hansen & Koroleff, 1999). Nydahl, (1978) estimó la recuperación para varios compuestos nitrogenados; siendo para la mayoría cuantitativos (mayor a 90%), exceptuando compuestos que poseen un doble enlace carbono nitrógeno; tales como: la antipirina, con una recuperación del 45%, y el sulfato de hidracina, 0.1%.

En lo que respecta a aspectos cinéticos, Goulden y Anthony (1978) reportan el tiempo de digestión para ácido nicotínico (un reactivo reportado previamente como lentamente oxidable) en un máximo de 367 segundos a un pH de 12 y una temperatura de 90 °C para un sistema autoclave de flujo continuo haciendo pasar espiras de borosilicato a través de un baño de calentamiento, preparado con una mezcla acuosa de 90% v/v de etilenglicol. La oxidación completa del material orgánico con persulfato necesita alrededor de un exceso de diez veces de oxígeno. Usando 10 mL de la solución oxidante (100 mg de $K_2S_2O_8$) y 10 mL de la muestra, el contenido total de carbono de la muestra no debe exceder 20 mg/L o una Demanda Química de Oxígeno (COD, por sus siglas en inglés) de 50 mg/L (Hansen & Koroleff, 1999).

III. Condiciones de digestión.

El tiempo de calentamiento debe ser suficiente para descomponer el exceso de iones persulfato. De otra manera, para el caso de la determinación de iones nitrato por reducción con cadmio metálico -método más usado para la determinación de iones nitratos- el exceso de iones persulfato puede oxidar el cadmio metálico en el paso reductor de los iones nitrato, dando concentraciones de iones cadmio, Cd^{2+} , lo suficientemente grandes para precipitar como hidróxido y dejar la superficie de cadmio sin efecto. Koroleff trató de desarrollar la digestión a 100 °C por 20 min en un recipiente abierto; sin embargo, no fue posible descomponer todos los iones persulfato y tuvo que reducirlo con yodo o iones sulfito (citado en Nydahl, 1978). D'Elia et al. (1977) realizaron pequeñas modificaciones con respecto a Koroleff: Las condiciones de temperatura fueron de 120 °C y se realizaron en una autoclave; la cual, es posible sustituir por una olla de presión. Por su parte, Nydahl (1978) determinó el tiempo mínimo requerido para la auto descomposición completa de

los iones persulfato, siendo 90 min a 100 °C -en un baño de agua a ebullición- y 15 min a 120 °C -en una olla de presión-.

Huang y Zhang (2009) realizaron la determinación de fósforo disuelto total en aguas naturales (usando matrices de agua destilada y agua de mar artificial) utilizando la digestión de persulfato neutro a temperaturas inferiores al punto de ebullición en un horno; siendo la temperatura y tiempo óptimo de 90 °C y 16 h. El uso de temperaturas abajo del punto de ebullición también minimiza la pérdida de muestra debido a la ebullición y se pueden dejar un mayor número de muestras sin monitoreo constante.

B4.Método de la Brucina.

I. Propiedades Químicas de la Brucina.

La brucina, **Bru**, $C_{23}H_{26}O_4N_2$ (**Figura 5, Ia**), es un alcaloide, el derivado 9,10-dimetoxi de la estricnina, **Str**, $C_{21}H_{22}O_2N_2$ (**Figura 5, Ib**), que se encuentran en las semillas de *Strychnos nuxvomica*, L. y *Strychnos ignatti*, Berg. Estructuralmente, la brucina es una amina ternaria que contiene una amida cíclica (lactama).

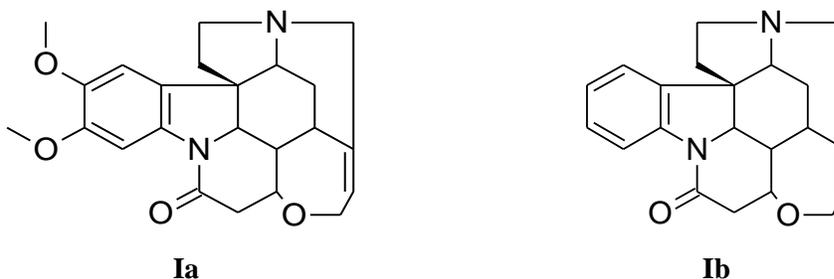
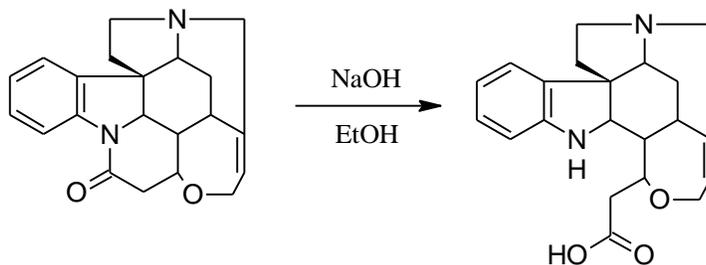


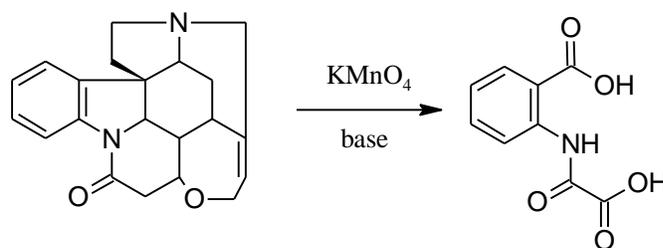
Figura 5. Fórmulas estructurales de la brucina (**Ia**) y la estricnina (**Ib**). Formulas estructurales fueron elaboradas, a partir de las disponibles en Lide (2005), utilizando el software ACD/ChemSketch 2017.1.2 (<https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>).

La hidrólisis de la estricnina con hidróxido de sodio alcohólico rompe el grupo lactama formando un aminoácido (**Ecuación Química 3**). El grupo amina ternaria de la brucina puede formar sales cuaternarias al reaccionar con proporciones molares de haluros de alquilo. La oxidación con permanganato de potasio de la estricnina para formar el ácido N-oxalilantranílico (**Ecuación Química 4**), sugiere un enlace directo de un átomo de nitrógeno a un núcleo bencénico. Al reducir el grupo amida a amina, el producto de

reducción tiene solamente un átomo de oxígeno; el cual, es pasivo a la reacción con reactivos con grupos carbonilo y tricloruro de fósforo, lo que sustenta la conclusión que dicho átomo de oxígeno pertenece a un éter cíclico (Holmes, 1950).



Ecuación Química 3.
(Holmes, 1950)



Ecuación Química 4.
(Holmes, 1950)

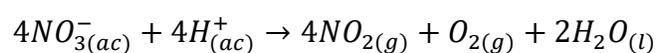
Nota: Las fórmulas estructurales de las **Ecuaciones Químicas 3 y 4** fueron elaboradas utilizando el software ACD/ChemSketch 2017.1.2 (<https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>).

II. Reacción de Formación del Cromóforo.

Una de las reacciones características de la brucina es la formación de una coloración intensa naranja-roja con trazas de ácido nítrico (Holmes, 1950). Dicha reacción es utilizada como prueba de identificación de iones nitrato y se reporta que pueden detectarse hasta 6×10^{-8} g de ácido nítrico en ácido sulfúrico concentrado (Cheronis, Entrikin & Hodnett, 1965).

En un intento por interpretar la reacción entre la brucina y los iones nitrato, Piccardi y Legittimo (1976) examinaron el comportamiento de la brucina con algunos agentes oxidantes: La brucina es parcialmente oxidada en ácido sulfúrico al 60% por una solución de sulfato de cerio (IV), dando primero un compuesto naranja y luego un amarillo. Al realizar un estudio potenciométrico con sulfato de cerio (IV) o dicromato de potasio, la relación molar entre la brucina y el agente oxidante, en el salto de potencial, es de 1:2. El permanganato de potasio, clorato de potasio y el agua de cloro también oxidan la brucina con la formación de un compuesto amarillo; esta reacción

no es cuantitativa, debido a que inclusive en bajas concentraciones, comienza la degradación oxidativa. Masini, Aragon y Nyasulu (1997) burbujearon dióxido de nitrógeno a través de una solución de brucina en ácido sulfúrico y la reacción ocurre rápidamente. Al colocar una solución de nitrato al 0.1 M en ácido sulfúrico al 7 M en agua a ebullición por 20 min, enfriar a temperatura ambiente y añadir una solución de brucina, la velocidad de reacción fue más rápida que a temperatura ambiente; razón por la cual, ellos supusieron que las condiciones de acidez y temperatura permiten la conversión de iones nitrato a dióxido de nitrógeno (*Ecuación Química 5*).



Ecuación Química 5.
(Masini et al., 1997)

Masini et al. (1997) estudiaron a detalle la electroquímica de la brucina involucrada en la formación del complejo coloreado cuando reacciona con los iones nitrato en ácido sulfúrico concentrado (*Figura 6*):

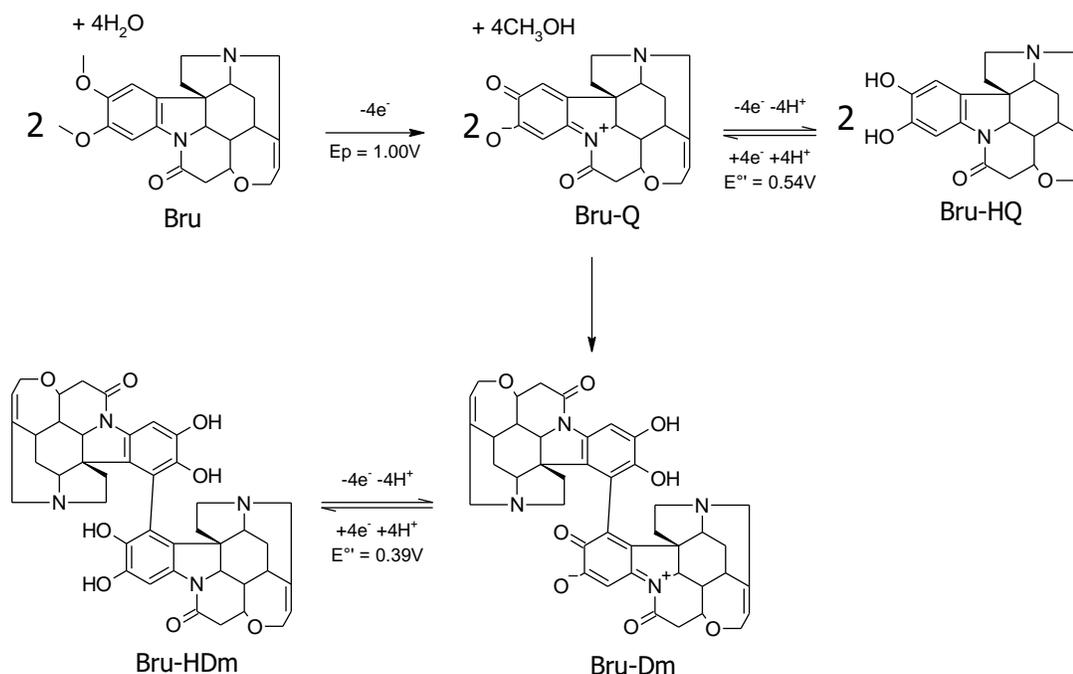


Figura 6. Diagrama de las ecuaciones químicas que describen el comportamiento óxido-reducción de la brucina involucrada en la reacción con iones nitrato en ácido sulfúrico concentrado (Masini et al., 1997). Formulas estructurales elaboradas utilizando el software ACD/ChemSketch 2017.1.2 (<https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>).

Siguiendo una oxidación, con una solución de Ce (IV), a una razón de dos electrones por mol ($E_p = 1.00$ vs Ag/AgCl), la brucina, **Bru**, reacciona para formar un aminocromo de color rojo, **Bru-Q**, (bruciquinona) y metanol. Dicho intermediario posee absorciones máximas en 513 y 537 nm (característico de muchos aminocromos) y es mejor representado por la forma zwitteriónica por las siguientes observaciones experimentales: La falta de extracción por solventes orgánicos, la extracción pobre en un electrodo "orgánico" (carbono más hexadecano) y la similitud del espectro visible con otros aminocromos. La bruciquinona se reduce, a una razón de dos electrones por mol ($E^{\circ} = 0.54$ V), para formar una hidroquinona, **Bru-HQ**, y también dimeriza, para formar un dímero de color amarillo, **Bru-Dm**. En un intento por aislar dicho dímero, se probaron extracciones con distintos solventes orgánicos. No se observó extracción alguna en un rango de pH de 0 a 13; lo cual, soporta la suposición de que el dímero es también un aminocromo.

pH = 0

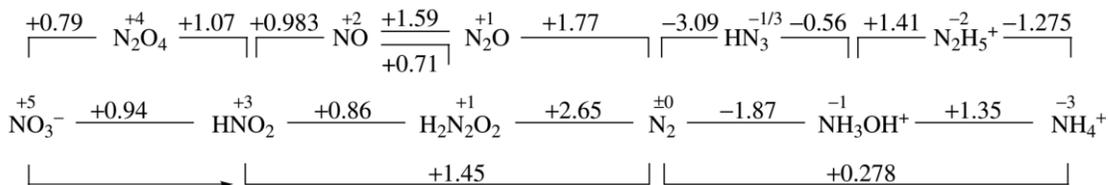
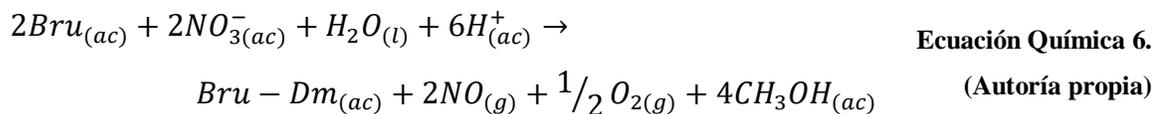


Figura 7. Diagrama de Latimer de las especies nitrogenadas en medio acuoso, los valores corresponden a los potenciales estándares de reducción, en V (Hammerl & Klapötke, 2011).

Holty y Potworowski (1972) realizaron un estudio detallado de estequiometría de la brucina con el nitrato y encontraron absorbancias máximas cercanas al consumo del exceso de la brucina (equivalente a 7 mg·N/L), si se asume una relación estequiométrica de 1:1. Basado en las observaciones recopiladas previamente y a los potenciales estándares de reducción de las especies químicas nitrogenadas a un pH de 0 (**Figura 7**), es posible proponer una reacción que describa la reacción entre la brucina y los iones nitrato (**Ecuación Química 6**).



III. Observaciones Experimentales del Método.

Noll (1945) desarrolló el método de brucina para la determinación de contenido de nitrato de sodio en agua de caldera (usado para reducir el fenómeno de corrosión). El método utiliza 5 mL de muestra, 0.2 mL del reactivo de brucina al 5% (volumen total del análisis de 15.2 mL). El rango utilizado, en dicho método, se encuentra entre 0-50 mg·NO₃⁻/L (equivalente a un rango entre 0-11 mg·N/L) y se reportaron porcentajes de recuperación de hasta 100%. Además, se evaluaron interferencias en temperatura de las soluciones (no observables entre 20-80 °C), iones nitrito (hasta 10.0 mg·NO₂⁻/L), iones ortofosfato (hasta 200 mg·PO₄³⁻/L), iones cloruro (hasta 1000 mg·Cl⁻/L) y otros iones presentes en la matriz como iones ferroso y férrico (hasta 20 mg·Fe/L), iones amonio (hasta 50 mg·N/L), iones calcio y magnesio (hasta 250 mg·CaCO₃/L) y silicato de sodio (hasta 200 mg·SiO₂/L). Se presentaron interferencias en materia orgánica, en particular, la que aporta color a la solución.

Fisher, Ibert y Beckman (1958) desarrollaron una metodología para determinar iones nitrato, iones nitrito o la mezcla de ambos, en matrices acuosas, utilizando el reactivo de brucina. Entre sus resultados, indicaron que en una solución de ácido sulfúrico al 20%, en presencia de una mezcla de iones nitrato y nitrito, se generó un cambio de color debido a la presencia de iones nitrito, los iones nitrato no reaccionaron. Al incrementar la concentración del ácido sulfúrico al 50% se observa un cambio de coloración debido a la presencia de ambos iones.

Jenkins y Medsker (1964) desarrollaron el método de brucina para matrices de agua dulce, estuarina y oceánica. En dicho método, se utiliza un reactivo mixto de ácido sulfanílico y brucina con posterior calentamiento en agua a ebullición por 20 min para desarrollar el color y eliminar los iones nitrito por diazotización y posterior hidrólisis. Posteriormente, se enfría las muestras a temperaturas entre 15 a 25 °C para inhibir el cambio de color y realizar la posterior medición. El método utiliza 10 mL de muestra, 0.5 mL del reactivo mixto de brucina al 1% (volumen total del análisis de 22.5 mL). El rango utilizado fue entre 0.05-0.8 mg·N/L, el coeficiente de variación reportado para

una muestra estuarina con concentración media de 0.287 mg·N/L fue de 1.7%. y se obtuvieron porcentajes de recuperación arriba del 95%. Se evaluaron interferencias en iones nitrito (hasta 0.5 mg·NO₂⁻/L), iones ferroso y férrico (hasta 1 mg/L), iones calcio (hasta 100 mg/L) y magnesio (hasta 100 mg/L). Dicha metodología es la base del método 352.1 aprobado por la US-EPA (1971).

Petriconi y Papee (1971) determinaron que los efectos de la temperatura en las soluciones analizadas son la mayor causa de inconsistencias con el desarrollo del método; por lo cual, su control debe ser riguroso. Holty y Potworowski (1972) encontraron discrepancias en la linealidad entre la absorbancia y la concentración de iones nitrato fuera del rango de trabajo de 0.1-2 mg·N/L (US-EPA, 1971). Se evaluó una curva de calibración hasta 100 mg·N/L a diferentes tiempos de desarrollo del color y con una temperatura de 100 °C (*Figura 8*), logrando apreciar que el corto tiempo de desarrollo del color puede minimizar la posibilidad de que dichas anomalías ocurran hasta un cierto nivel.

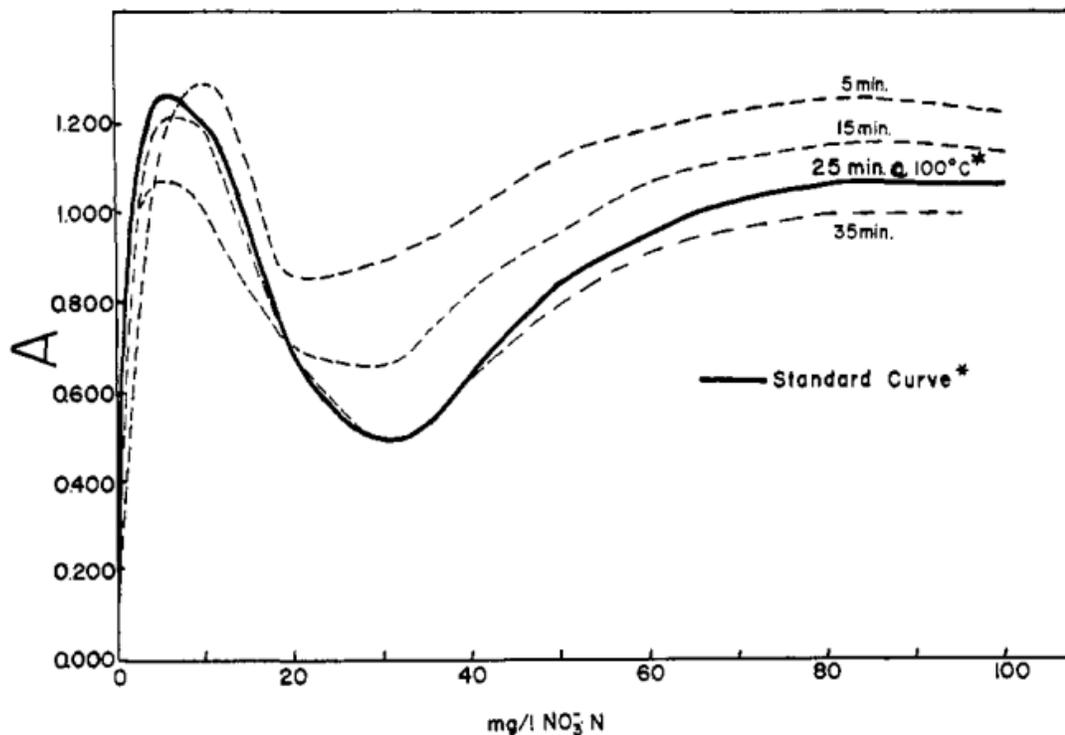


Figura 8. Absorbancia vs concentración de nitrato (mg·N/L), en función del tiempo de desarrollo del color. Todas las curvas fueron desarrolladas con soluciones a 100 °C (Holty & Potworowski, 1972).

Ante tal situación, Holty y Potworowski (1972) sugieren tres alternativas; de las cuales, la alternativa que consume menos tiempo es añadir suficiente brucina extra para prevenir el decrecimiento de la curva de absorbancia en altas concentraciones de nitrato.

B5.El Efecto Matriz.

La matriz de la muestra puede influenciar en la señal analítica (absorbancia). Si las matrices del estándar de referencia y la muestra difieren, la calibración puede ser imprecisa. La razón se puede deber a que existan constituyentes en la muestra que aumenten o disminuyan la señal analítica o que puedan interferir con la reacción química formada en la producción de la señal. La sal de mar también puede causar errores en la señal espectrofotométrica. Estos "efectos de sal" generan ya sea una disminución en la absorbancia analítica por los iones del agua de mar o un efecto de capacidad buffer del agua de mar que interfiera con la reacción de determinación. Los efectos de sal pueden ser ignorados si los estándares y blancos son preparados con agua de mar libre de nutrientes o agua de mar baja en nutrientes (LNSW por sus siglas en inglés) o agua de mar artificial (ASW, por sus siglas en inglés). La salinidad debe ser igual o similar a la de las muestras. Esta es la mejor solución para muchos análisis de aguas cuando las variaciones de salinidad son pequeñas y una LNSW no puede ser encontrada o preparada (Hansen & Koroleff, 1999).

La salinidad es una medida del contenido de sales en el agua de mar. El concepto actual de salinidad está intrínsecamente relacionado con la metodología de medida de dicha variable, siendo la conductimetría la más utilizada (De Mora, 1999). La conductividad de una muestra se mide en relación con un material de referencia, Agua Marina Estándar, y es convertida a salinidad -a través de una fórmula empírica- en unidades prácticas de salinidad (psu, por sus iniciales en inglés). La salinidad del agua de mar estándar es de 35 psu; mientras que, la del agua dulce, tiene un máximo de 1 psu (Müller, 1999).

El Agua de Laboratorio Grado 3, es usualmente lo suficientemente pura para utilizarla en el análisis de nutrientes. Se define como la adecuada para la mayor parte del trabajo del laboratorio en química en medio acuoso y para la preparación de soluciones de reactivos; debe ser producida, por

ejemplo, por destilación simple, por deionización o por osmosis inversa. A menos sea especificado lo contrario, esta debe ser usada para el trabajo analítico ordinario (ISO 3696:1987).

Tanto como para la matriz de estándares y blancos en análisis de nutrientes, tres propiedades del agua de mar artificial son importantes, ya que pueden afectar con el resultado analítico: fuerza iónica, salinidad y capacidad amortiguadora. Una solución de cloruro de sodio de una concentración equivalente a la salinidad de la muestra usualmente satisface el primer y segundo requerimiento. Los problemas encontrados con las potenciales impurezas usados para la preparación de la ASW pueden introducir errores que pueden afectar en el análisis (Hansen & Koroleff, 1999).

El ASW se prepara a partir de la formulación resumida en la **Tabla 2**. Las sales gravimétricas se secan a 100 °C previo a su uso y se preparan soluciones de las sales volumétricas cuyas concentraciones son confirmadas por titulación Mohr. El pH de la solución es ajustado a 8.2; el cual, también puede lograrse al equilibrar dicha solución con el contenido de dióxido de carbono del medio ambiente, tres días posteriores a su preparación (Kester et al., 1967).

Tabla 2. Composición para 1 kg de Agua de Mar Artificial. Salinidad 35.00 psu. pH 8.2 (Kester et al., 1967).

A. Sales gravimétricas.		
Sal	Masa molecular (g·mol⁻¹)	g·Sal/kg
NaCl	58.44	23.926
Na ₂ SO ₄	142.04	4.008
KCl	74.56	0.677
NaHCO ₃	84.00	0.196
KBr	119.01	0.098
H ₃ BO ₃	61.83	0.026
NaF	41.99	0.003
B. Sales Volumétricas.		
Sal	Masa molecular (g·mol⁻¹)	mol/kg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203.33	0.05327
CaCl ₂ · 6H ₂ O	147.03	0.01033
SrCl ₂ · 6H ₂ O	266.64	0.00009
C. Agua destilada hasta 1,000.00 g.		

C. Validación del Método.

Según la normativa ISO 9000:2015, se define validación como: "la confirmación, a través de la disposición de evidencia objetiva que los requerimientos para un uso específico previsto o aplicación han sido cumplidos. La evidencia objetiva necesaria para una validación es el resultado de una prueba u otra forma de determinación como cálculos de desempeño alternativos o la revisión de documentos". Los métodos de análisis validados son necesarios para muchos propósitos: fortalecimiento de regulaciones, control de importación-exportación, en laboratorios acreditados, intuiciones académicas. Desde sus inicios en 1884, AOAC International se ha dedicado a la validación de métodos analíticos a través de ensayos en múltiples laboratorios (Lauwaars, 1998). Entre los métodos de validación que AOAC Internacional ofrece, se encuentra el Programa de Métodos Oficiales regido por los Requerimientos de Rendimiento de un Método Estándar (SMPRs, por sus siglas en inglés); dichos requerimientos son un consenso de estándares desarrollado por las partes interesadas en un proceso muy controlado que asegure que los usuarios, organizaciones de investigación, departamentos gubernamentales y consumidores trabajen juntos para crear un estándar que cumpla con las demandas de la comunidad analítica y tecnológica. Los SMPRs, son voluntarios, la AOAC International no puede y no debe imponer el uso de los SMPRs. Con la finalidad de promover uniformidad en los SMPRs, la AOAC International desarrolló una guía documentada (AOAC International, 2016).

Según la clasificación de métodos de AOAC International (2016), los requerimientos mínimos de rendimiento a cumplir para la validación en un laboratorio para un método cuantitativo de una traza o contaminante (≥ 100 g/Kg) son los siguientes: Rango de trabajo, límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés), recuperación, sesgo y precisión. Adicionalmente se tomarán en cuenta los parámetros de validación de selectividad, linealidad y estimación de incertidumbre, definidos por EURACHEM en la segunda edición de la Guía de Laboratorio para la Validación (Magnusson & Örnemark, 2016).

C1. Límite de Cuantificación.

Se define como la concentración mínima de masa de analito en una determinada matriz que puede ser reportada como un resultado cuantitativo (AOAC International, 2016). Una de las herramientas

para la determinación del LOQ es el uso de blancos. Los más recomendables son los Blancos de Muestra (muestras matrices sin presencia de analito) pero también pueden utilizarse Blancos de Reactivos (muestras matrices elaboradas a partir de reactivos). Para el caso de Blancos de Reactivo, los reactivos utilizados durante el proceso analítico (incluyendo disolventes utilizados para la extracción o disolución) se analizan para determinar si contribuyen a la señal de la medida. Una de las metodologías recomendadas consiste en realizar una medida de diez réplicas de blanco reactivo, calcular la desviación estándar, s_0 (**Ecuación 4**), a partir de la media aritmética, \bar{x} , (**Ecuación 5**), y aplicar la **Ecuación 6** (Magnusson & Örnemark, 2016).

$$s_0 = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

Ecuación 4.
(Miller & Miller, 2010)

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Ecuación 5.
(Miller & Miller, 2010)

Para la **Ecuación 4** y la **Ecuación 5**, x , representa el resultado de una medición u observación (Miller & Miller, 2010).

$$LOQ = k_Q \cdot s'_0$$

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 6.
(Magnusson & Örnemark, 2016)

La **Ecuación 6** aplica cuando los resultados del Blanco no se corregirán durante el uso rutinario del método; donde, s'_0 es la desviación estándar de la media; n , es el número de réplicas de observaciones promediadas cuando se informan resultados para los que cada réplica es obtenida siguiendo enteramente el procedimiento de medición. El valor por defecto de k_Q es 10 según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) y si la desviación estándar es aproximadamente constante a bajas concentraciones, este multiplicador corresponde a un coeficiente de variación, CV, de 10%. Los multiplicadores de 5 y 6 también han sido usado ocasionalmente, lo cual corresponde a valores de CV de 20% y 17% respectivamente (Magnusson & Örnemark, 2016). El coeficiente de variación es calculado empleando la **Ecuación 7**.

$$CV(\%) = \frac{s_0}{\bar{x}} \times 100$$

Ecuación 7.
(Miller & Miller, 2010)

C2. Rango y Linealidad.

Rango de trabajo es el intervalo sobre el cual el método demuestra resultados con una incertidumbre aceptable. El límite inferior corresponde al límite de cuantificación LOQ. El límite superior está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analíticas (La sensibilidad analítica es el cambio en la respuesta del instrumento el cual corresponde con el cambio de una cantidad medida). Un ejemplo de esto es el efecto de aplanamiento en valores altos de absorbancia en la espectroscopía UV/Vis (Magnusson & Örnemark, 2016).

Con la finalidad de lograr el rango de trabajo del método se deben tener disponibles muestras con concentraciones conocidas y blancos, las muestras deben pasar por completo todo el procedimiento de medición, las concentraciones deben de cubrir preferiblemente todo el rango de interés y el instrumento debe haber sido calibrado de acuerdo con el procedimiento sugerido. Los valores obtenidos (señal dada por el equipo) son graficados en el eje-y contra las concentraciones conocidas de las muestras (eje-x). El rango de trabajo y linealidad son juzgadas por inspección visual del gráfico, soportada por la estadística y por el gráfico de residuales de la regresión lineal (Magnusson & Örnemark, 2016). En adelante, consideraremos que la curva de calibración lineal tiene la forma algebraica descrita en la **Ecuación 8**; donde, b es la pendiente de la línea recta y a es el intercepto en el eje-y. La media de los valores de x es \bar{x} y la media de los valores de y es \bar{y} .

$$y = a + bx$$

Ecuación 8.
(Miller & Miller, 2010)

Un método común para estimar qué tan bien los puntos experimentales se ajustan a una línea recta es calcular el Coeficiente de Producto-Momento, r (**Ecuación 9**). Este estadístico es comúnmente referido simplemente como "coeficiente de correlación" debido a que, en ciencias cuantitativas, es mucho más comúnmente usado que otros coeficientes de correlación. r solamente puede tomar valores en el rango de $-1 \leq r \leq +1$. Un valor de r de -1 describe una correlación negativa perfecta; similarmente, cuando r tiene un valor de $+1$, tenemos una correlación positiva perfecta. Cuando no hay correlación entre x y y , el valor de r es cercano a cero. Para decidir si una curva o línea recta se ajusta a la información dada por la calibración, se ocupa el coeficiente de determinación, R^2 ; el cual, para el caso de una línea recta, es el valor de r elevado al cuadrado; siendo 1 el valor

máximo, que indica un ajuste del 100% entre los valores de la curva de calibración y la ecuación de la línea recta (Miller & Miller, 2010).

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad \text{Ecuación 9. (Miller \& Miller, 2010)}$$

En cualquier análisis de calibración el error aleatorio global del resultado surgirá de una combinación de las contribuciones al error de varias etapas del análisis. En casos de heterocedasticidad, donde los errores experimentales varían con el valor del analito, los datos deberán ser tratados mediante métodos de regresión ponderados. La ponderación permite que la recta calculada pase cerca de los puntos donde el error es más pequeño. Este resultado se logra dando a cada punto, de un número total de n puntos, una ponderación inversamente proporcional a la varianza correspondiente en la dirección y , s_i^2 . Las ponderaciones individuales w_1, w_2, w_3 y similares vienen dadas por la **Ecuación 10** (Miller & Miller, 2010).

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}/n} \quad \text{Ecuación 10. (Miller \& Miller, 2010)}$$

La pendiente, b_w , y el intercepto, a_w , de la regresión lineal (ajuste de mínimos cuadrados) están dadas por la **Ecuación 11** y **Ecuación 12**, respectivamente. En dichas ecuaciones, \bar{y}_w y \bar{x}_w (**Ecuación 13**) representan la media ponderada de los datos de las variables y y x , respectivamente (Miller & Miller, 2010).

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i - n \bar{x}_w^2} \quad \text{Ecuación 11. (Miller \& Miller, 2010)}$$

$$a_w = \bar{y}_w - b \bar{x}_w \quad \text{Ecuación 12. (Miller \& Miller, 2010)}$$

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{n} \quad \text{Ecuación 13. (Miller \& Miller, 2010)}$$

La desviación estándar para una concentración estimada, $S_{x_{ow}}$, está dada por la **Ecuación 14**; donde, \hat{y} es el valor estimado de y -aplicando los valores calculados de b_w y a_w en la **Ecuación 8-**

y_0 y w_0 corresponden al valor medio y la ponderación de los valores obtenidos (señales dada por el equipo) para la concentración estimada (Miller & Miller, 2010).

$$S_{x_{ow}} = \frac{S_{(y/x)_w}}{b} \cdot \left\{ \frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)} \right\}^{1/2}$$

Ecuación 14.

(Miller & Miller, 2010)

$$S_{(y/x)_w} = \left\{ \frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2}$$

C3. Selectividad.

La selectividad analítica se refiere al grado en la cual el método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferentes de otros componentes de similar comportamiento. Las interferencias pueden causar un sesgo al incrementar o disminuir la señal atribuida a una medida. La selectividad de un método se investiga estudiando su habilidad de medir el analito de interés en muestras a las cuales se le agregaron intencionalmente interferencias específicas (aquellas que se considere probable de encontrar en las muestras). Se recomienda analizar muestras de ensayo que contengan varias interferencias sospechadas en la presencia de los analitos de interés (Magnusson & Örnemark, 2016).

C4. Sesgo y Recuperación.

El sesgo es la diferencia entre el valor esperado de los resultados de análisis y el valor aceptado de referencia. El sesgo es el error total sistemático y se complementa con el error aleatorio (AOAC International, 2016). Existen tres enfoques generales para determinar sesgo: análisis de materiales de referencia, experimentos de recuperación usando muestras adicionadas y comparación de resultados obtenidos con otro método (Magnusson & Örnemark, 2016).

El Material de Referencia ideal es un Material de Referencia Certificado. Comparado con el amplio rango de tipos de muestras y analitos encontrados por los laboratorios, la disponibilidad de Materiales de Referencia es limitado, pero es importante que el material seleccionado sea apropiado para el uso. En ausencia de Materiales de Referencia adecuados, se puede utilizar estudios de recuperación para dar una indicación del nivel de sesgo probable (Magnusson & Örnemark, 2016).

La recuperación es la fracción o porcentaje del analito que es recuperado cuando la muestra de prueba es analizada usando el método completo (AOAC International, 2016). La recuperación por adición es una de las técnicas que puede ser utilizada cuando no hay un Material de Referencia Certificado con una matriz apropiada para el analito de interés. La matriz para utilizar en dicha técnica debe ser razonablemente caracterizada para determinar que es suficientemente representativa de la matriz de interés (Magnusson & Örnemark, 2016).

Una de las metodologías recomendadas consiste en medir diez veces la matriz de blanco o medir la muestra sin adición y la muestra con adición del analito de interés sobre un rango de concentraciones. Se realiza la comparación entre la media del valor adicionado, \bar{x}' , con el valor medio de la matriz blanco o muestra sin adición, \bar{x} , con la concentración añadida, $x_{adicion}$ (Magnusson & Örnemark, 2016). Se calcula la recuperación relativa de adición a diferentes concentraciones utilizando la **Ecuación 15**. La recuperación media esperada para un analito cuya concentración se encuentre entre 100 µg/Kg a 10 mg/Kg es entre 80-110% (AOAC International, 2016).

$$R(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{adicion}} \times 100 = \frac{x_{analizado}}{x_{adicion}} \times 100$$

Ecuación 15.
(Magnusson & Örnemark, 2016)

C5. Precisión.

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones establecidas (AOAC International, 2016). Este parámetro es usualmente expresado por parámetros estadísticos que describan la distribución de los resultados, típicamente la desviación estándar (o desviación estándar relativa), calculada de los resultados obtenidos al realizar repetibilidad en condiciones específicas (Magnusson & Örnemark, 2016). Las condiciones específicas para evaluar repetibilidad son aquellas en donde resultados de las muestras de prueba son obtenidos independientemente con el mismo método en ítems de prueba idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador usando el mismo equipo en intervalos de tiempo corto (AOAC International, 2016). Una de las metodologías recomendadas consiste en medir entre 6-15 réplicas de blancos de muestra adicionados a diversas concentraciones en todo el intervalo de trabajo. Se determina la desviación estándar o la desviación estándar relativa de los resultados de acuerdo con la **Ecuación 4** y **Ecuación 7**, respectivamente (Magnusson & Örnemark, 2016). Las desviaciones

estándares relativas esperadas para un analito cuya concentración se encuentre en 100 µg/Kg y 1 mg/Kg son 15 y 11%, respectivamente (AOAC International, 2016).

C6. Estimación de la Incertidumbre.

La incertidumbre se define como un parámetro asociado con el resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden razonablemente ser atribuidos al mensurando (Ellison & Williams, 2012). En cualquier experimento real analítico estarán presentes dos tipos de errores: aleatorios (afectan la precisión de la medida) y sistemáticos (generan sesgo en la medida). Estos pueden ser combinados para dar una incerteza en el resultado final, el cual provee un rango realista de valores donde probablemente se encuentre el valor real de una medida (Miller & Miller, 2010).

I. Pasos para la Estimación de la Incertidumbre.

Los pasos para estimar la incertidumbre se describen a continuación (Ellison & Williams, 2012):

- **Paso 1. Especificar el mensurando.** Escriba una idea clara de lo que será medido, incluyendo la relación entre el mensurando y las cantidades de entrada de las cuales esta depende (por ejemplo, constantes, valores de estándares de calibración, cantidades medidas y otros).
- **Paso 2. Identifique las fuentes de incerteza.** Enliste las posibles fuentes de incerteza. Esto debe incluir fuentes que contribuyen con la incerteza de los parámetros en la relación a los especificados en el Paso 1, pero también puede considerar otras fuentes y debe mencionar fuentes que provienen de suposiciones químicas.
- **Paso 3. Cuantifique los componentes de incertidumbre.** Estime el tamaño del componente de la incerteza asociado con cada potencial fuente de incerteza identificado. Cada componente debe estar expresado como una incertidumbre estándar y estará asociada a una fuente individual o como efecto combinado de varias fuentes. Cuando un componente de incertidumbre fue evaluado experimentalmente de la dispersión de medidas repetidas, su incertidumbre estándar puede ser expresada como

su desviación estándar. Si los límites de confianza, $\pm a$, son dados sin un nivel de confianza y no es conocido el tipo de distribución de las variables, se puede asumir una distribución rectangular con una incertidumbre estándar de acuerdo con la **Ecuación 16**. (Ellison & Williams, 2012)

$$u_{(x)} = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

Ecuación 16.
(Ellison & Williams, 2012)

- **Paso 4. Calcule la incerteza combinada.** Las incertidumbres estándares (obtenidas en el Paso 3) deben ser combinadas de acuerdo con las reglas apropiadas, para dar una incertidumbre estándar. Una metodología recomendada para el cálculo de la incertidumbre estándar combinada, u_z , es el “método de la hoja de cálculo” (Kragten, 1994) basado en la fórmula general de la propagación de errores (**Ecuación 17**).

$$u_z^2 = \sum_i \left(\frac{\partial Z}{\partial x_i} \right)^2 u_{x_i}^2$$

Ecuación 17.
(Kragten, 1994)

El apropiado factor de cobertura debe ser aplicado para dar una incertidumbre expandida, U (**Ecuación 18**). Para un aproximado nivel de confianza del 95%, k usualmente es fijada en 2.

$$U = k \cdot u_z$$

Ecuación 18.
(Ellison & Williams, 2012)

II. Reglas para la Propagación de Errores Aleatorios.

Las reglas de propagación de errores aleatorios pueden ser divididas en tres grupos (Miller & Miller, 2010):

- **Combinaciones lineales.** En este caso, el valor final, y , es calculado de la combinación de las variables a , b , c y similares, descritas en la **Ecuación 19**; donde, k , k_a , k_b , k_c y similares son constantes. La varianza (definida como la desviación estándar elevada al cuadrado) tiene la propiedad importante que la varianza de una suma o diferencia de cantidades independientes es igual a la suma de las varianzas (**Ecuación 20**).

$$y = k + k_a a + k_b b + k_c c + \dots$$

Ecuación 19.
(Miller & Miller, 2010)

$$\sigma_y = \sqrt{(k_a \sigma_a)^2 + (k_b \sigma_b)^2 + (k_c \sigma_c)^2 + \dots}$$

Ecuación 20.
(Miller & Miller, 2010)

- **Expresiones multiplicativas.** Si y es calculado de una expresión del tipo descrito en la **Ecuación 21** (donde a , b , c y d son cantidades medidas independientemente y k es una constante); entonces, hay una relación entre los cuadrados de las desviaciones estándares relativas, descrita por la **Ecuación 22**.

$$y = kab/cd$$

Ecuación 21.
(Miller & Miller, 2010)

$$\frac{\sigma_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_c}{c}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_d}{d}\right)^2}$$

Ecuación 22.
(Miller & Miller, 2010)

III. Reglas para la Propagación de Errores Sistemáticos.

Las reglas de propagación de errores sistemáticos pueden ser divididos también en tres grupos (Miller & Miller, 2010):

- **Combinaciones lineales.** Si y , es calculado de la combinación de las variables a , b , c y similares, descritas en la **Ecuación 19**; donde, Δa , Δb , Δc y similares, son sus correspondientes errores sistemáticos; entonces, el error sistemático en y , Δy , es calculado de acuerdo con la **Ecuación 23**.

$$\Delta y = k_a \Delta a + k_b \Delta b + k_c \Delta c + \dots$$

Ecuación 23.
(Miller & Miller, 2010)

- **Expresiones multiplicativas.** Si y es calculado de una expresión del tipo descrito en la **Ecuación 21** (donde a , b , c y d son cantidades medidas independientemente y k es una constante); entonces, hay una relación entre los errores sistemáticos relativos, descrita por la **Ecuación 24**.

$$(\Delta y/y) = (\Delta a/a) + (\Delta b/b) + (\Delta c/c) + (\Delta d/d)$$

Ecuación 24.
(Miller & Miller, 2010)

METODOLOGÍA.

Para el cumplimiento del objetivo del presente trabajo de graduación, se diseñó y ejecutó la siguiente secuencia de actividades:

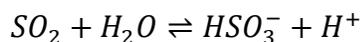
1. Desarrollo de la metodología.

La metodología desarrollada se resume en el diagrama de operaciones (*Figura 9*) y se detalla en el procedimiento estándar operacional (*Anexo A*). Debido a que la metodología se compone de la unión de diferentes técnicas, fue necesario realizar modificaciones para acoplar dichas técnicas. A continuación, se detallan las pruebas y modificaciones realizadas en cada una de las técnicas que llevaron al desarrollo de la metodología:

- **Digestión en persulfato alcalino (Pasos 1-3).** Basado en las condiciones de digestión oxidativa, descritas en el marco teórico, se evaluó el uso de los instrumentos: olla de presión (3 h a 120 °C), hot plate -para el uso de un baño de maría- (90 min a 95 °C) y horno de convección (16 h a 90 °C, 95 °C y 110 °C) y se determinó las condiciones en las cuales es posible oxidar en su totalidad las especies químicas nitrogenadas y descomponer la mayor cantidad de iones persulfato. Dado que no se logró descomponer en su totalidad los iones persulfato (**Ver Sección 1. Análisis Teórico y Resultados**), se añadió un agente reductor como los iones bisulfito (0.25 g/mL) y se dejó reposar la mezcla por 3 h a temperatura ambiente (27 °C). La elección de los iones bisulfito se fundamentó en que reacciona con los iones persulfato, en medio básico, para formar únicamente iones sulfato (*Ecuación Química 7*); y que, el exceso de los iones bisulfito es eliminado al adicionar ácido, liberándolo como dióxido de azufre (*Ecuación Química 8*). Las concentraciones de iones persulfato e iones hidróxido usadas están sustentadas en las cantidades descritas en Hansen y Koroleff (1999), con la modificación que se quintuplicaron para añadir 1 mL de solución de persulfato alcalino ($K_2S_2O_8$ 0.185 M + NaOH 0.375 M) para 5 mL de muestra en cada uno de los viales de 40 mL. Antes de proceder con la adición de la solución de iones bisulfito, se restaura el volumen perdido por evaporación, durante la digestión oxidativa, con agua destilada hasta un volumen de 5 mL en cada uno de los viales.



Ecuación Química 7.
(Elaborada a partir de Vanýsek, 2005)



Ecuación Química 8.
(Patnaik, 2003)

- **Método de la Brucina (Pasos 4-6 y A-B).** Para dicho procedimiento, se realizaron las modificaciones siguientes a la metodología descrita en Jenkins y Medsker (1964): Se redujo a la mitad la cantidad de muestra a utilizar (5 mL de muestra) y se duplicó la cantidad de solución de brucina a agregar (1 mL al 1%); cuadruplicando así, la concentración de la brucina, con el objeto de prevenir el decrecimiento de absorbancia en altas concentraciones de nitrato, como fue sugerido por Holty y Potworowski (1972).

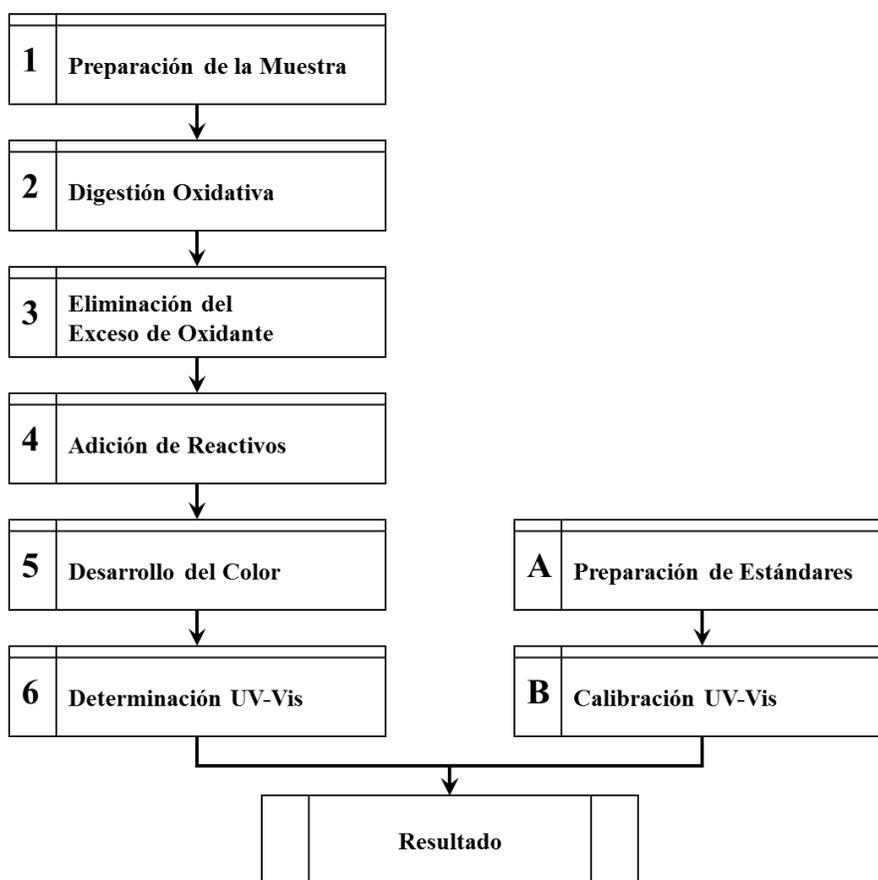


Figura 9. Diagrama de operaciones para la determinación de nitrógeno total por el método de brucina, utilizando la digestión con persulfato alcalino (Elaboración propia, EP).

La base del procedimiento utilizado, para el Método de la Brucina, fue el siguiente: Al vial con la muestra previamente digerida y reducida, se añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitó para eliminar el exceso de iones sulfito como dióxido de azufre. Posteriormente, se añadió 1 mL del reactivo de brucina (disolución de sulfato de brucina heptahidratado, Sigma-Aldrich 237868, en agua al 1%) y, lentamente, 4 mL de ácido sulfúrico concentrado; se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente (27 °C) por 1 h 30 min. Se obtuvo una lectura de la absorbancia contra agua destilada a 410 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 1700, usando una cubeta de cuarzo con un camino óptico de 1-cm.

2. Calibración de los instrumentos de medición asociados al análisis.

Debido a que tanto la cristalería como los instrumentos de medición a utilizar no son nuevos, fue necesario asociarles una incertidumbre actualizada; para ello, se utilizó como referencia, las normas internacionales utilizadas para la determinación de las variables de masa y volumen. Cabe mencionar que la incertidumbre de la variable correspondiente a absorbancia, que mide el Espectrofotómetro UV-VIS, no fue medida directamente, sino que se asoció a la incertidumbre estándar de la muestra, generada por el ajuste de mínimos cuadrados ponderados de la curva de calibración (*Ecuación 14*).

- a) **Masa.** Fue determinada la repetibilidad y exactitud a través de la verificación con los patrones de masa disponibles (100-mg, 500-mg, 1-g y 100-g); se usó como referencia el método estándar ASTM E898-88 (2013); el cual, indica la medida de una serie de observaciones, del mismo patrón, en la misma dirección; con las cuales, se determinó la desviación estándar (*Ecuación 4*), coeficiente de variación (*Ecuación 7*) y sesgo absoluto (*Ecuación 25*) y sesgo relativo (*Ecuación 26*).

$$\Delta x = \bar{x} - x_{ref} \quad \text{Ecuación 25.} \\ \text{(Magnusson \& Örnemark, 2016)}$$

$$\Delta x(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad \text{Ecuación 26.} \\ \text{(Magnusson \& Örnemark, 2016)}$$

b) Volumen

- **Micropipeta (1000- μ L y 5000- μ L).** Fue determinado el error aleatorio y sistemático a través del método gravimétrico, se usó como referencia, el método ISO 8655.6 (2002). Se realizaron 10 ciclos de medida con cada micropipeta en cada nivel de volumen, (incluyendo volumen nominal y 50% del volumen nominal), utilizando agua destilada (ISO 3696:1987, Grado 3). Se registraron las variables de masa, m (balanza Ohaus PA214C); temperatura del agua, t_w (termómetro Control Company, 23609-174); humedad relativa, φ (higrómetro-termómetro, ThermoPro TP50); temperatura ambiente, t_a (higrómetro-termómetro, ThermoPro TP50) y presión atmosférica, P_a (datos tomados del Sistema de Referencia Territorial, Estación 61: UES. SNET-MARN). El tiempo de lectura fue de aproximadamente un minuto y posteriormente, a la lectura constante de los 10 ciclos, se dejó el recipiente de pesaje en la balanza por el tiempo de la realización de los 10 ciclos; información que sirvió para determinar la pérdida de masa por evaporación. Para la micropipeta de 1000- μ L se consideraron los valores de lectura 100 μ L abajo del valor mostrado por el instrumento de medición, debido a que dicha micropipeta mostró un desfase de aproximadamente 100 μ L en las lecturas preliminares realizadas. Se utilizó la misma punta de micropipeta para la realización de los 10 ciclos en cada micropipeta; debido a que el cambio de micropipetas durante los análisis será mínimo (una por cada reactivo y su reemplazo cuando se estime conveniente).

El volumen corregido a 20 °C fue obtenido utilizando la **Ecuación 27**; dicha ecuación, describe la corrección de empuje que se genera entre el desplazamiento de aire, ρ_a , al introducir el patrón de masa, $\rho_b = 8000 \text{ kg/m}^3$, y el desplazamiento de aire al introducir el agua en cada ciclo, ρ_w (ISO/TR 20461, 2000).

$$V_{20} = \frac{m}{\rho_b} \cdot \frac{\rho_b - \rho_a}{\rho_w - \rho_a} \quad \text{Ecuación 27.} \\ \text{(ISO/TR 20461, 2000)}$$

La densidad del agua se calculó a través de la Ecuación de Kell (**Ecuación 28**) donde a_0, a_1, a_2, a_3 y a_4 son constantes empíricas y equivalen a: $a_0 = 999.88308 \text{ kg/m}^3$,

$a_1 = 6.32693 \times 10^{-2} \text{ }^\circ\text{C}^{-1} \cdot \text{kg}/\text{m}^3$, $a_2 = 8.523829 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-2} \cdot \text{kg}/\text{m}^3$, $a_3 = 6.943248 \times 10^{-5} \text{ }^\circ\text{C}^{-3} \cdot \text{kg}/\text{m}^3$ y $a_4 = 3.821216 \times 10^{-7} \text{ }^\circ\text{C}^{-4} \cdot \text{kg}/\text{m}^3$ (ISO/TR 20461, 2000).

$$\rho_w = \sum_{i=0}^4 a_i t_w^i \quad \text{Ecuación 28.} \\ \text{(ISO/TR 20461, 2000)}$$

La densidad del aire se calculó a través de la **Ecuación 29**, donde $t_{a0} = 273.15 \text{ }^\circ\text{C}$, $k_1 = 0.34844 \text{ (Kg}/\text{m}^3)\text{ }^\circ\text{C}/\text{hPa}$, $k_2 = -0.00252 \text{ kg}/\text{m}^3$, $k_3 = 0.020582 \text{ (kg}/\text{m}^3)\text{ }^\circ\text{C}$ (ISO/TR 20461, 2000).

$$\rho_a = \frac{k_1 P_a + \varphi(k_2 t_a + k_3)}{t_a + t_{a0}} \quad \text{Ecuación 29.} \\ \text{(ISO/TR 20461, 2000)}$$

Una vez obtenidas las 10 medidas corregidas de volumen, se determinó la desviación estándar (**Ecuación 4**), coeficiente de variación (**Ecuación 7**), sesgo absoluto (**Ecuación 25**) y relativo (**Ecuación 26**) para cada nivel de volumen.

- **Balón Volumétrico (50-mL y 100-mL).** Se determinó el error aleatorio y sistemático a través del método gravimétrico. Se usó como referencia, el método ISO 4787 (2010). Los balones volumétricos fueron llenados con una piseta, cuya punta se ubicó a una distancia de unos pocos milímetros abajo de la línea de graduación a evaluar, de tal manera que las paredes del instrumento volumétrico sobre la línea de graduación no se humedecieron. Se evaluó la diferencia de masa entre el instrumento volumétrico o recipiente de recepción vacío y el mismo material con el volumen a evaluar. Se realizaron 10 ciclos de medida con cada uno de los balones volumétricos, se utilizó agua destilada (ISO 3696:1987, Grado 3) y se registraron las mismas variables que serán utilizadas para la calibración de las micropipetas. El tiempo de lectura fue de aproximadamente un minuto. A través del cálculo de las 10 medidas corregidas de volumen (**Ecuación 27**), fue posible determinar la desviación estándar (**Ecuación 4**), coeficiente de variación (**Ecuación 7**), sesgo absoluto (**Ecuación 25**) y relativo (**Ecuación 26**) para cada nivel de volumen.

3. Validación de la metodología.

Basado en la guía de validación EURACHEM y SMPRs de la AOAC Internacional, se definieron los parámetros y criterios de validación para dicha metodología; clasificada, como métodos cuantitativos para analitos presentes en concentraciones traza:

- a) **Rango y Linealidad (Curva de Calibración).** Se evaluó una curva de calibración preliminar con concentraciones mayores a la estequiométrica para determinar el rango de trabajo útil del método. Posteriormente, se evaluaron siete niveles de concentración (incluyendo cero), dentro del rango determinado. Para la eliminar datos anómalos, se evaluó, en cada nivel, el estadístico Test de Grubbs (**Ecuación 30**); donde, y_{vs} corresponde al dato que se sospecha como anómalo. Se estableció como hipótesis nula, H_0 , la ausencia de datos anómalos para un contraste de dos colas. (Miller & Miller, 2010).

$$G = |y_{vs} - \bar{y}|/s_y$$

Ecuación 30.
(Miller & Miller, 2010)

- b) **Límite de Cuantificación.** Se evaluaron quince muestras de Blanco Reactivo (ASW), y se determinaron su media y desviación estándar. El límite de cuantificación fue calculado utilizando la **Ecuación 6**.

- c) **Selectividad.** Se evaluaron soluciones de nitrato a una concentración dentro del rango de trabajo útil junto con cada posible interferente en la concentración límite o máxima, encontrada en la literatura citada, y en la mitad de dicha concentración (Detalle de la elaboración de dichas soluciones se encuentra en el **Anexo D**). Los resultados obtenidos se contrastaron contra una concentración de control, medida siete veces, $n = 7$ (preparación detallada en el **Anexo A**), a través del estadístico t (**Ecuación 31**), donde μ corresponde al valor obtenido en la muestra con el interferente; y, n , s y \bar{x} corresponden a los estadísticos descriptivos de la muestra de control. Se estableció como hipótesis nula, H_0 , que no hay diferencia significativa entre la medición con y sin interferente para un contraste de dos colas (Miller & Miller, 2010).

$$t = (\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{n}/s$$

Ecuación 31.
(Miller & Miller, 2010)

El análisis de posibles interferentes se dividió en tres categorías:

- Interferentes nutrientes. Esta categoría incluye los iones fosfato, PO_4^{3-} , con una concentración límite regulada por la NSO 13.49.01 (2009), de 15 mg·P/L; y iones silicato, SiO_4^{4-} , cuya concentración utilizada, 0.7 mg·Si/L, está basada en los datos obtenidos por Raimbault et al. (2008).
- Interferentes oxidantes provenientes de aguas residuales (NSO 13.49.01, 2009). Esta categoría incluye los iones hierro trivalente, Fe^{3+} , con una concentración límite regulada de 10 mg·Fe/L; iones cromo hexavalente, Cr^{6+} , con una concentración límite regulada de 1.0 mg·Cr/L; y iones manganeso heptavalente, Mn^{7+} , con una concentración límite regulada de 2.0 mg·Mn/L.
- Interferentes oxidantes provenientes de procesos de desinfección en agua potable (NSO 13.07.01, 2008). Esta categoría incluye al cloro residual como iones hipoclorito, ClO^- , con una concentración límite regulada de 1.1 mg·Cl/L; y, iones clorato, ClO_3^- , con una concentración límite regulada de 0.7 mg/L.

d) Precisión y Exactitud. Se evaluaron diez veces una muestra compuesta, a la concentración de 10.00 mg·N/L (Preparación detallada en el *Anexo A*). Dicha muestra, se preparó a partir de Materiales Certificados de Referencia de iones nitrato (Merck 1.19811.0500, 1000-mg·N/L) y Nitrógeno Kjeldahl (AccuStandard WC-TKN-10X-1, 1000-mg·N/L) en una proporción de 1:1 en ASW. A partir de los resultados obtenidos, se calculó la recuperación relativa de adición (*Ecuación 15*) y la desviación estándar relativa de los resultados (*Ecuación 7*).

e) Capacidad de Digestión. Se evaluaron ocho diferentes especies nitrogenadas (a través del análisis de la metodología validada) por medio del cálculo de la recuperación relativa de adición, (*Ecuación 15*) por septuplicado (El detalle de la preparación de dichas soluciones se encuentra en el *Anexo D*). La selección de especies nitrogenadas se ha realizado con base en la composición de la DIN y de los grupos funcionales principales presentes en DON, reportados por McCarthy et al., (1997) y se resumen en la *Tabla 3*. Las fórmulas estructurales de los compuestos orgánicos seleccionados son representadas en la *Figura 10*.

Tabla 3. Especies químicas nitrogenadas utilizadas para el estudio de la capacidad de digestión.

ID.	Compuesto	Fórmula Química	Fuente (Iones o Grupo Funcional Objetivo)	Masa Molar (g/mol)	Masa Nitrógeno Molar (g/mol)
Compuestos Inorgánicos Nitrogenados (DIN)					
NI1	Nitrato de Potasio (Control)	KNO ₃	Iones Nitrato	101.1032	14.0067
NI2	Nitrito de Sodio	NaNO ₂	Iones Nitrito	68.99527	14.0067
NI3	Cloruro de Amonio	NH ₄ Cl	Iones Amonio	53.49146	14.0067
Compuestos Orgánicos Nitrogenados (DON)					
NO1	Urea	CH ₄ N ₂ O	Aminoácidos Hidrolizables	60.055260	28.0134
NO2	Clorhidrato de Glucosamina	C ₆ H ₁₄ NO ₅ Cl	Amidas No Hidrolizables	215.632060	14.0067
NO3	Clorhidrato de Tiamina (Vitamina B1)	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ OCl ₂ S	Nitrógenos aromáticos (Metabolitos secundarios)	337.263120	56.0268
NO4	Indol-3-acetato de Potasio (IAA-K)	C ₁₀ H ₈ NO ₂ K	Indol (Ácidos Nucleicos)	213.274320	14.0067
NO5	Metilcobalamina (Vitamina B12)	C ₆₃ H ₉₁ O ₁₄ N ₁₃ CoP	Pirroles (Metabolitos secundarios)	1344.382301	182.0871

Nota: Las masas molares fueron calculadas a partir de las Masas Atómicas Estándares disponibles en Lide (2005).

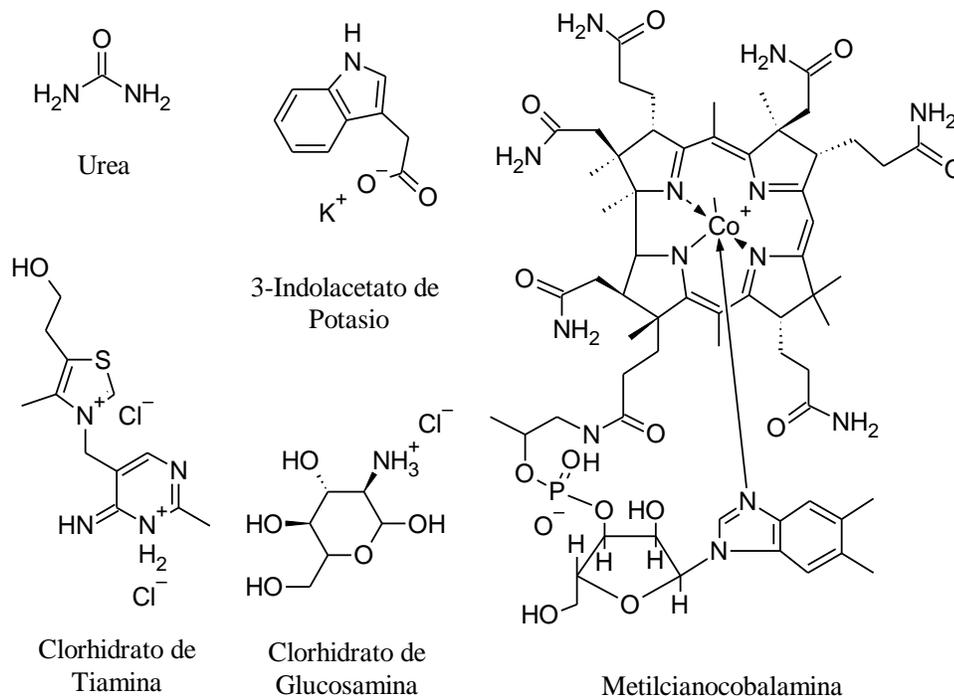


Figura 10. Fórmula estructural de los compuestos orgánicos nitrogenados seleccionados para la evaluación de la capacidad de digestión. Las fórmulas estructurales elaboradas, a partir de las disponibles en Lide (2005), utilizando el software ACD/ChemSketch 2017.1.2 (www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/).

4. Estimación de la incertidumbre expandida de la metodología.

La fórmula utilizada para la determinación de la concentración de esta metodología (c_{TPN}), está descrita en la **Ecuación 32**. A partir de dicha ecuación, se evaluaron las fuentes de incertidumbre asociadas a cada uno de los factores; los cuales, se simplifican en el diagrama de la **Figura 11**:

$$c_{TPN} = c_o \times D \times (R)^{-1} \times f_{dig} \times f_{red} \times f_{color}$$

Ecuación 32.
Autoría propia.

- El factor c_o corresponde a la concentración de nitrógeno total de la muestra en la cubeta de cuarzo, dicha concentración fue obtenida a través de la regresión lineal y ajuste por mínimos cuadrados de las variables, absorbancia y concentración de nitratos, utilizadas para la elaboración de la curva de calibración. Se consideró el ajuste de mínimos cuadrados ponderado para lograr trasladar los respectivos errores aleatorios y sistemáticos relativos a la preparación de las soluciones estándares utilizadas para la construcción de dicha curva. Dentro de la preparación de la solución de reserva (solución de partida para la elaboración de soluciones estándares) se consideraron variables de masa y volumen; razón por la cual, deben ser consideradas en la propagación de incertidumbres de dicho factor, principalmente, en el error sistemático.
- El factor R corresponde a la recuperación (**Ecuación 15**). Dicho factor consideró variables como la concentración (calculada a partir de la curva de calibración) de la matriz de blanco (agua de mar artificial, ASW), la muestra con adición y la concentración añadida (calculada con base en los valores reportados en los estándares de referencia certificados a utilizar). Dado que no existe un Material de Referencia Certificado (CRM) apropiado para dicha metodología (que contenga especies nitrogenadas orgánicas e inorgánicas) se preparó dicha muestra de prueba a partir de dos CRM que se diluirán en ASW; razón por la cual, se consideró la variable volumen dentro del cálculo de la propagación de incertidumbres de dicho factor.

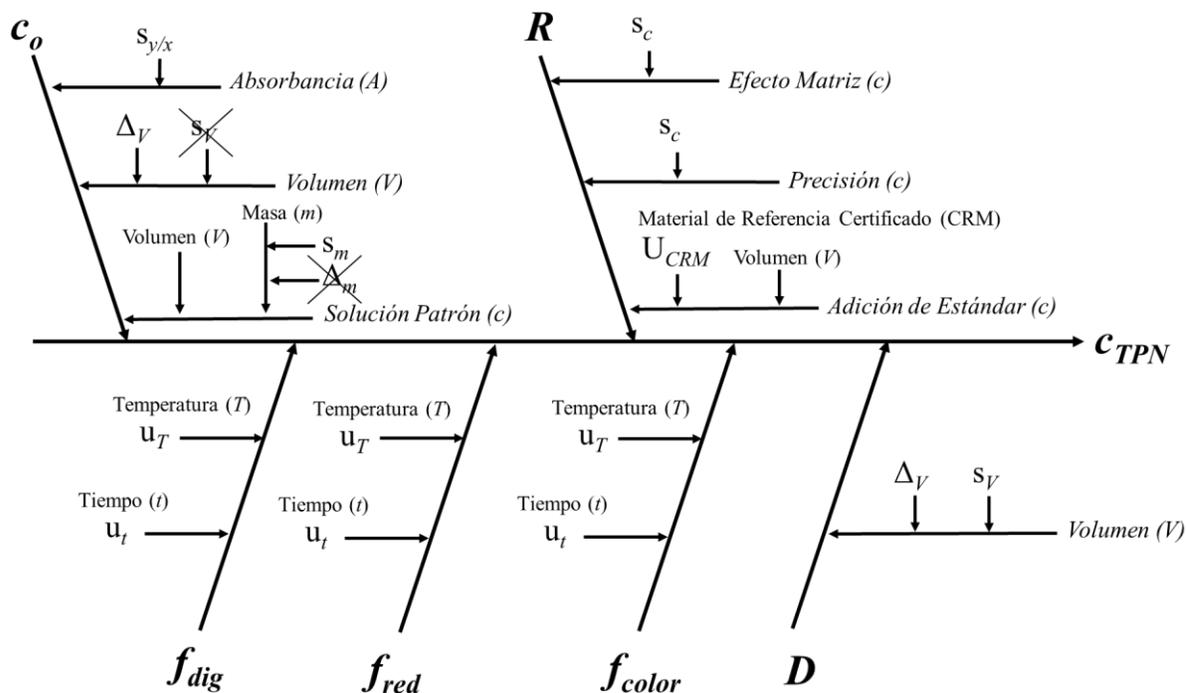


Figura 11. Diagrama simplificado de las fuentes de incertidumbre de la determinación de nitrógeno total por el método de brucina, utilizando la digestión con persulfato alcalino (Elaboración propia). Las fuentes de incertidumbre tachadas no se tomaron en cuenta, considerando que la precisión de la absorbancia debido a la concentración s_c reflejará la combinación de las incertidumbres aleatorias asociadas con la elaboración de la curva de calibración.

- El factor D corresponde al factor de disolución de la muestra; influenciado por la variable de volumen, la cual, estará caracterizada a través de la calibración de los instrumentos de medición de volumen.
- El factor f_{dig} corresponde al efecto cinético involucrado en la digestión de las muestras. Goulden y Anthony (1978) reportan que la cinética de reacción involucrada en la oxidación de las especies nitrogenadas es menor a los tiempos reportados para la digestión; razón por la cual, podemos considerar que la reacción predominante al finalizar la digestión es la descomposición de los iones persulfato. Según Kolthoff y Miller (1951), la cinética de descomposición es de pseudo primer orden (cuando el pH es constante) y posee un comportamiento descrito por la **Ecuación 33**.

$$c = c_0 e^{-kt}$$

Ecuación 33.

$$k = \ln \frac{c_0}{c} \cdot t^{-1}$$

(Atkins & de Paula, 2006)

Se evaluó el efecto de dicho factor, mediante la comparación entre las absorbancias de la curva de calibración control y la curva de calibración en donde se ha realizado una variación en temperatura o tiempo, usando el estadístico t (**Ecuación 34**); donde, \bar{d} y s_d corresponden a la media (**Ecuación 5**) y desviación estándar (**Ecuación 4**) de la diferencia entre absorbancias de las curvas evaluadas. Se estableció como hipótesis nula, H_0 , que no hay diferencias significativas entre las curvas evaluadas para un contraste de dos colas (Miller & Miller, 2010).

$$t = \bar{d} \cdot \sqrt{n}/s_d$$

Ecuación 34.

(Miller & Miller, 2010)

Al haber una diferencia significativa entre curvas, se compararon las pendientes de las curvas para identificar si estas son paralelas y si la diferencia significativa entre curvas no es dependiente de la concentración de los iones nitrato, mediante el uso del estadístico t - estableciendo como hipótesis nula, H_0 , que no hay diferencias significativas entre las pendientes de las curvas evaluadas para un contraste de dos colas- (**Ecuación 35**); en donde b corresponde a las pendientes de las curvas de calibración y F corresponde al estadístico de la Prueba F, que evalúa la variación significativa entre el cuadrado de las desviaciones estándares en el eje y , $s_{(y/x)}^2$, del ajuste de mínimos cuadrados de cada una de las curvas de calibración.

$$F_{b_1-b_2} = \frac{s_{(y/x)_1}^2}{s_{(y/x)_2}^2}$$

$$s_{(y/x)p}^2 = \frac{(n_1 - 2) \times s_{(y/x)_1}^2 + (n_2 - 2) \times s_{(y/x)_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

Ecuación 35.

(Andrade & Estévez-Pérez, 2014)

$$t_{b_1-b_2} = \frac{b_1 - b_2}{s_{(y/x)p}^2 \times \sqrt{\frac{1}{\sum_i (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum_i (x_{i2} - \bar{x}_2)^2}}}$$

Una vez determinadas las variables que generan diferencias significativas en las curvas de calibración, se determinaron las constantes cinéticas en función de variaciones en el tiempo (**Ecuación 33**), k , y temperatura -comportamiento descrito por la Ecuación de Arrhenius- (**Ecuación 36**), J y H , para estimar la incertidumbre asociada a dicho factor.

$$k = J e^{-\frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T}} = J e^{H \times \frac{1}{T}}$$

Ecuación 36.
(Atkins & de Paula, 2006)

- El factor f_{red} corresponde al efecto cinético involucrado en la eliminación del exceso de oxidante por la adición de bisulfito. Para simplificar dicho efecto, se agregó un exceso del agente reductor (0.25 g/mL, aproximadamente 13 veces más que la concentración agregada de persulfato previo al proceso de digestión) para que la cinética de la reacción sea de pseudo primer orden (Atkins & de Paula, 2006), cumpliendo con el comportamiento cinético descrito en la **Ecuación 33**. Para determinar el efecto de dicho factor, se realizó el procedimiento descrito en el factor f_{dig} .
- El factor f_{color} corresponde al efecto cinético involucrado en la formación del complejo coloreado. Dicha cinética, según Masini et al. (1997), es de segundo orden y posee un comportamiento descrito por la **Ecuación 37**. Para determinar el efecto de dicho factor, se realizó el procedimiento descrito en el factor f_{dig} .

$$\frac{1}{c} = \frac{1}{c_0} - kt$$

Ecuación 37.
(Atkins & de Paula, 2006)

ANÁLISIS TEÓRICO Y RESULTADOS.

1. Desarrollo de la metodología.

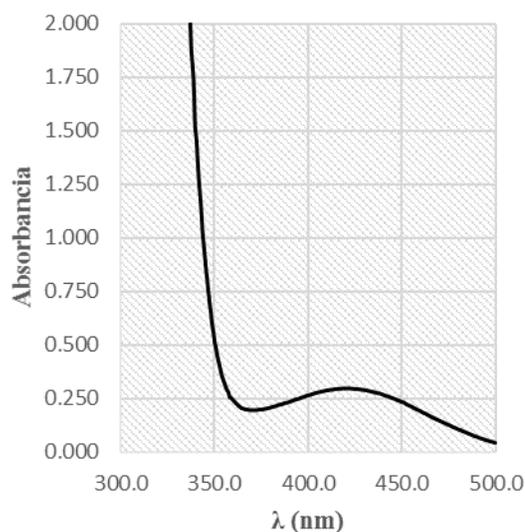


Figura 12. Curva de absorción contra longitud de onda del cromóforo de la brucina, utilizando una solución de nitrato a una concentración de 2.00 mg·N/L (EP).

Se realizaron pruebas preliminares únicamente para el método de la brucina, (utilizando soluciones estándares de nitrato de potasio) con la finalidad de identificar la tonalidad del cromóforo esperado. A la solución obtenida, color amarillo, se realizó un espectro de absorción a diferentes longitudes de onda (**Figura 12**) obteniendo dos picos de absorción en 338 y 418 nm. Su forma coincide con las descritas en el análisis de la brucina a altas concentraciones de nitrato (Holty & Potworowski, 1972) y la longitud de onda máxima obtenida dentro la región visible se encuentra dentro del rango descrito en el método de brucina -entre 400 a 420 nm- (Noll, 1945)

Se mantuvieron fijas las variables de volumen y orden de adición de los reactivos para el método de la brucina, descritas en la Metodología, y se evaluaron tres diferentes técnicas de digestión oxidativa. Los resultados se registran en la **Tabla 4**. A partir de dichos resultados, se optó para su validación el uso del horno de convección a una temperatura de 90 °C por 16 h. Es relevante mencionar, que uno de los principales inconvenientes observados en la digestión es la evaporación de la muestra, evidenciando cristales -presumiblemente persulfato de potasio- al utilizar olla de presión y horno de convección; las condiciones seleccionadas (digestión oxidativa a 90 °C por 16 h), son las que presentan la menor cantidad de cristales y evaporación de la mezcla.

Tabla 4. Comparación de diferentes técnicas de digestión oxidativa para compuestos orgánicos nitrogenados a diferentes temperaturas -T, °C- y tiempos -t, h- (EP).

N.º	Instrumento	T (°C)	t (h)	Absorbancia (Color)	
				S/NaHSO ₃	C/NaHSO ₃
1	Hot Plate	95	1.5	1.721 (N)	0.168 (A)
2	Olla de presión	120	3.0	1.212 (N)	0.414 (A)
3	Horno de convección	90	16.0	0.312 (N)	0.043 (A)
4	Horno de convección	95	16.0	2.683 (R)	0.125 (A)
5	Horno de convección	110	16.0	2.709 (N)	0.386 (A)

Nota: Leyenda de colores: Amarillo (A), naranja (N) y rojo (R).

2. Calibración de los instrumentos de medición asociados al análisis.

Identificado el procedimiento a realizar, se realizó la calibración de los instrumentos de medición para el método a validar. Las variables de los instrumentos de medición corresponden a masa y volumen. El detalle de los datos registrados, para cada calibración, se encuentra en el **Anexo B**.

- a) **Masa.** Para la variable de masa, se calcularon la media (**Ecuación 5**), desviación estándar (**Ecuación 4**), coeficiente de variación (**Ecuación 7**), sesgo absoluto (**Ecuación 25**) y sesgo relativo (**Ecuación 26**) para cada uno de los patrones de masa disponibles. Los resultados de la calibración de la variable masa son registrados en la **Tabla 5**. A continuación, se detalla los cálculos realizados para las diez medidas registradas para el patrón de masa de 100-g:

Media:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} = \frac{1000.0088 \text{ g}}{10} = 100.00088 \text{ g}$$

Desviación estándar:

$$s_x = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} = \sqrt{1.6 \times 10^{-8} \text{ g}^2 / 9} = 4.2 \times 10^{-5} \text{ g}$$

Coefficiente de variación:

$$CV(\%) = \frac{s_0}{\bar{x}} \times 100 = \frac{4.2 \times 10^{-5} \text{ g}}{100.00088 \text{ g}} \times 100 = 4.2 \times 10^{-5} \%$$

Sesgo absoluto:

$$\Delta x = \bar{x} - x_{ref} = 100.00088 \text{ g} - 100.00000 \text{ g} = 8.8 \times 10^{-4} \text{ g}$$

Sesgo relativo:

$$\Delta x(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 = \frac{100.00088 \text{ g} - 100.00000 \text{ g}}{100.00000 \text{ g}} \times 100\% = 8.8 \times 10^{-4}\%$$

- b) **Volumen.** Previo al cálculo de los estadísticos realizados para la variable masa, es necesario transformar los cálculos de diferencia de masa en volumen. Para cada set de datos registrados (diferencia de masa, temperatura del agua, temperatura del aire, humedad y presión atmosférica) se calcula el volumen corregido a 20 °C (*Ecuación 27*) a partir de la densidad del agua (*Ecuación 28*) y la densidad del aire (*Ecuación 29*). Los resultados de la calibración de la variable volumen son registrados en la *Tabla 5*.

Densidad del agua:

$$\rho_w = \sum_{i=0}^4 a_i t_w^i$$

$$\begin{aligned} \rho_w &= 999.88308 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} + 6.32693 \times 10^{-2} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}\cdot\text{kg}\cdot\text{m}^{-3} \times 27.6 \text{ }^\circ\text{C} \\ &\quad + 8.523829 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-2}\cdot\text{kg}\cdot\text{m}^{-3} \times (27.6 \text{ }^\circ\text{C})^2 \\ &\quad + 6.943248 \times 10^{-5} \text{ }^\circ\text{C}^{-3}\cdot\text{kg}\cdot\text{m}^{-3} \times (27.6 \text{ }^\circ\text{C})^3 \\ &\quad + 3.821216 \times 10^{-7} \text{ }^\circ\text{C}^{-4}\cdot\text{kg}\cdot\text{m}^{-3} \times (27.6 \text{ }^\circ\text{C})^4 \end{aligned}$$

$$\rho_w = 1009.77 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

Densidad del aire:

$$\rho_a = \frac{k_1 P_a + \varphi(k_2 t_a + k_3)}{t_a + t_{a0}}$$

$$\begin{aligned} \rho_a &= \frac{0.34844 (\text{kg}\cdot\text{m}^{-3})\cdot^\circ\text{C}\cdot\text{hPa}^{-1} \times 943.9 \text{ hPa}}{28.5 \text{ }^\circ\text{C} + 273.15 \text{ }^\circ\text{C}} \\ &\quad + \frac{44\%(-0.00252 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} \times 28.5 \text{ }^\circ\text{C} + 0.020582 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot^\circ\text{C})}{28.5 \text{ }^\circ\text{C} + 273.15 \text{ }^\circ\text{C}} \end{aligned}$$

$$\rho_a = 1.083 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

Volumen corregido a 20 °C:

$$V_{20} = \frac{m}{\rho_b} \cdot \frac{\rho_b - \rho_a}{\rho_w - \rho_a} = \frac{0.9936 \text{ g}}{8000 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}} \cdot \frac{8000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} - 1.083 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}}{1009.77 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} - 1.083 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}} = 0.9849 \text{ mL} = 984.9 \text{ }\mu\text{L}$$

Tabla 5. Resultados de la calibración de los instrumentos de medición para el método a validar (EP).

Variable masa, m (g)						
Instrumento	m_{ref}	\bar{m}	s_m	CV(%)	Δm	$\Delta m(\%)$
Balanza Analítica	100.0000	100.00088	4.2×10^{-5}	4.2×10^{-5}	$+8.8 \times 10^{-4}$	8.8×10^{-4}
	1.0000	0.99998	4.2×10^{-5}	4.2×10^{-3}	-2.0×10^{-5}	4.2×10^{-3}
	0.5000	0.49997	4.8×10^{-5}	9.7×10^{-3}	-3.0×10^{-5}	6.0×10^{-3}
	0.1000	0.09999	8.8×10^{-5}	8.8×10^{-2}	-1.0×10^{-5}	1.0×10^{-2}
Variable volumen, V (μ L)						
Instrumento	V_{ref}	\bar{V}	s_V	CV(%)	ΔV	$\Delta V(\%)$
Balón Volumétrico 100-mL	100,000	98,198.4	86.5	0.1	-1801.6	1.8
Balón Volumétrico 50-mL	50,000	49,192.4	58.0	0.1	-807.6	1.6
Micropipeta 5000- μ L	5,000	4,789.6	32.4	0.7	-210.4	4.2
	3,750	3,640.9	33.6	0.9	-109.1	2.9
	2,500	2,420.0	4.1	0.2	-80.0	3.2
	1,500	1,446.2	3.5	0.2	-53.8	3.6
	500	474.1	3.1	0.6	-25.9	5.2
	1,000	996.3	2.1	0.2	-3.7	0.4
Micropipeta 1000- μ L	750	740.1	4.3	0.6	-9.9	1.3
	500	497.4	0.8	0.2	-2.6	0.5
	300	298.6	0.7	0.2	-1.4	0.5

Detalle de los instrumentos calibrados: Balanza analítica OHAUS PA214C; balones volumétricos Pyrex de 100-mL y 50-mL; y, micropipetas Gilson de 5000- μ L y 1000- μ L.

3. Validación de la metodología.

a) **Rango y Linealidad (Curva de Calibración).** Se evaluó la respuesta de absorbancia contra concentración de iones nitrato (estándar de la metodología validada) en un amplio rango para determinar el rango útil a validar (**Figura 13**) bajo las siguientes condiciones de temperatura y tiempo para las Etapas 2, 3 y 5 de la metodología (**Figura 9**); las cuales llamaremos “condiciones de validación”: Digestión oxidativa, 90 °C y 16 h; eliminación del exceso de oxidante, 27 °C y 3 h; y, desarrollo del color, 27 °C y 1 h 30 min.

Se observaron resultados sin anomalías significativas en la sensibilidad debajo de 2.00 mg·N/L; razón por la cual, se definió como límite superior una concentración de 1.50 mg·N/L. A partir de dicho valor, se distribuyó equitativamente la curva de calibración en siete niveles de concentración: 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 y 1.50 mg·N/L.

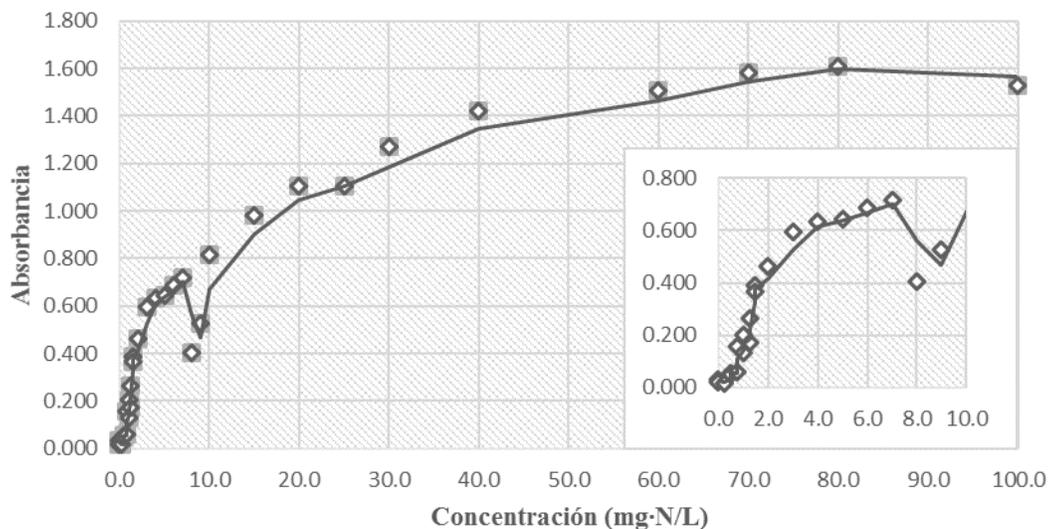


Figura 13. Curva de Absorbancia contra un amplio rango de concentración de nitrógeno total (mg·N/L) para determinar el rango útil de la metodología validada. La curva presentada en la parte inferior derecha representa una ampliación. Curva de tendencia elaborada usando una media móvil con un período de dos (EP).

Propagación de errores en la preparación de la curva de calibración. Previo al análisis de los resultados obtenidos, fue necesario realizar una propagación de errores sistemáticos y aleatorios correspondientes a la elaboración de la curva de calibración del método validado (procedimiento detallado en el *Anexo A*). Dentro de la elaboración de la solución de reserva es posible aplicar las reglas de propagación de errores aleatorios y sistemáticos para combinaciones lineales y expresiones multiplicativas.

El registro de la masa de nitrato de potasio constituye un ejemplo de una combinación lineal (*Ecuación 19*), debido a que su valor es el producto de la diferencia entre la masa del recipiente con el compuesto, m_{KNO_3+Rec} , y el recipiente vacío, m_{Rec} . Se aplican la *Ecuación 23* para estimar la propagación del error sistemático y la *Ecuación 20* para estimar la propagación del error aleatorio.

Masa de nitrato de potasio registrada:

$$m_{KNO_3} = m_{KNO_3+Rec} - m_{Rec} = 0.7209 \text{ g}$$

Propagación del error sistemático:

$$\Delta m_{KNO_3} = +\Delta m_{KNO_3+Rec} - \Delta m_{Rec} = +8.8 \times 10^{-4} \text{ g} - 8.8 \times 10^{-4} \text{ g} = 0 \text{ g}$$

Propagación del error aleatorio:

$$s_{m_{KNO_3}} = \sqrt{\left(+s_{m_{KNO_3+Rec}}\right)^2 + \left(-s_{m_{Rec}}\right)^2}$$

$$s_{m_{KNO_3}} = \sqrt{\left(4.2 \times 10^{-5} \text{ g}\right)^2 + \left(4.2 \times 10^{-5} \text{ g}\right)^2} = 5.9 \times 10^{-5} \text{ g}$$

La determinación de concentración de la solución de reserva elaborada constituye un ejemplo de una expresión multiplicativa (**Ecuación 21**), debido a que su valor es el producto de la relación entre las variables de masa (m_{KNO_3}), volumen (V), masa molar de nitrato de potasio (MM_{KNO_3}) y masa molar de nitrógeno por mol de nitrato de potasio (MM_{N-KNO_3}). Se aplican la **Ecuación 22** para estimar la propagación del error aleatorio y la **Ecuación 24** para estimar la propagación del error sistemático.

Concentración de solución de reserva:

$$c(\text{mg}\cdot\text{N/L}) = \frac{m_{KNO_3}}{V} \times \frac{MM_{N-KNO_3}}{MM_{KNO_3}} = \frac{0.7209 \text{ g}}{0.1 \text{ L}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \times \frac{14.0067 \text{ g/mol}}{101.1032 \text{ g/mol}}$$

$$c(\text{mg}\cdot\text{N/L}) = 998.7 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$$

Propagación del error aleatorio:

$$s_c = c \times \sqrt{\left(\frac{s_{m_{KNO_3}}}{m_{KNO_3}}\right)^2 + \left(\frac{s_V}{V}\right)^2}$$

$$s_c = 998.7 \text{ mg}\cdot\text{N/L} \times \sqrt{\left(\frac{5.9 \times 10^{-5} \text{ g}}{0.7209 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{8.65 \times 10^{-5} \text{ L}}{0.1 \text{ L}}\right)^2} = 0.9 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$$

Propagación del error sistemático:

$$\Delta c = c \times \left[\left(\frac{\Delta m_{KNO_3}}{m_{KNO_3}}\right) + \left(\frac{\Delta V}{V}\right) \right] = 998.7 \text{ mg}\cdot\text{N/L} \times \left[\frac{-1.8016 \times 10^{-3} \text{ L}}{0.1 \text{ L}} \right] = -18 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$$

Similar análisis (expresión multiplicativa) se realizó para la determinación de las concentraciones de los estándares usados para la elaboración de la curva de calibración (procedimiento detallado en el **Anexo A**). La propagación de errores correspondiente se resume en la **Tabla 6**. Dichos resultados indican un error sistemático significativo como para no ser ignorado; razón por la cual, se utilizarán las concentraciones corregidas, $c + \Delta c$, en los cálculos posteriores.

Tabla 6. Propagación de errores aleatorios y sistemáticos en la elaboración de la curva de calibración (EP).

N.º	c	s_c	CV(%)	Δc	$\Delta c(\%)$	$c + \Delta c$
1	0.25	7.1×10^{-4}	0.28	-0.02	-8.9	0.23
2	0.50	3.4×10^{-3}	0.69	-0.05	-9.9	0.45
3	0.75	7.0×10^{-3}	0.93	-0.06	-8.5	0.69
4	1.00	7.0×10^{-3}	0.70	-0.10	-9.8	0.90
5	1.25	3.6×10^{-3}	0.29	-0.15	-11.6	1.10
6	1.50	4.1×10^{-3}	0.27	-0.17	-11.1	1.33

Nota. Detalle de variable: c corresponde a la concentración de los estándares de nitrógeno total (nitrato de potasio) en mg·N/L.

Agrupación de datos previo al ajuste de mínimos cuadrados. Para la determinación de la pendiente y del intercepto de la regresión lineal, se agruparon varios datos de curvas de calibración realizadas durante el presente trabajo de graduación (*Anexo C*) -en “condiciones de validación”-, utilizando el estadístico t de mínima diferencia entre curvas (*Ecuación 34*) como criterio de comparación: Se inició estableciendo como “curva control”, la curva de calibración con el mayor valor del coeficiente de determinación, cuadrado del coeficiente de correlación (*Ecuación 9*), y esta se comparó una a una con cada curva de calibración registrada. Los pares de datos provenientes de las curvas de calibración con un estadístico t calculado menor al valor crítico, 2.45 para seis grados de libertad ($GL = 6$) en un intervalo de confianza del 95% - $CI = 95\%$ o $P = 0.05$ - (Miller & Miller, 2010), se agruparon a los pares de datos (x, y) de la curva de calibración de control. Se obtuvieron un total de 8 datos de absorbancia para cada nivel de concentración (exceptuando en el nivel de 0.00 mg·N/L, donde se registraron 15 datos); de los cuales, sus máximos y mínimos fueron evaluados en busca de datos anómalos usando el Test de Grubbs (*Ecuación 30*) y se presentan en la *Tabla 7*.

Para ejemplificar las operaciones realizadas para calcular el coeficiente de determinación, se tomaron los pares de datos correspondientes a la curva de control (*Anexo C, Curva 1*):

Coeficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{\{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]\}^2}{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]} = \frac{(0.2746)^2}{1.3647 \times 0.0571} = 0.97$$

Tabla 7. Datos utilizados para el cálculo de la ecuación de la línea recta que describe la curva de calibración (EP).

N.º	x	y								n	\bar{y}	s_y	CV(%)
1	0.00	0.046	0.034	0.034	0.057	0.048	0.043	0.029	0.043	15	0.045	0.014	30
		0.048	0.058	0.072	0.060	0.020	0.043	0.052					
2	0.23	0.078	0.093	0.067	0.109	0.084	0.096	0.135	0.093	8	0.094	0.021	22
3	0.45	0.112	0.106	0.130	0.134	0.088	0.123	0.181	0.113	8	0.115	0.016	14
4	0.69	0.137	0.190	0.168	0.165	0.132	0.170	0.186	0.128	8	0.160	0.024	15
5	0.90	0.234	0.229	0.220	0.193	0.216	0.160	0.187	0.161	8	0.200	0.029	15
6	1.10	0.262	0.254	0.254	0.252	0.218	0.232	0.217	0.200	8	0.236	0.023	10
7	1.33	0.298	0.327	0.322	0.267	0.343	0.379	0.269	0.247	8	0.307	0.044	15
C	0.67	0.110	0.130	0.178	0.158	0.142	0.158	0.152		7	0.153	0.016	11
R	1.00	0.183	0.212	0.198	0.210	0.173	0.150	0.196	0.189	10	0.187	0.021	11
		0.197	0.159										

Notas. Detalle de variables: x corresponde a la concentración de los estándares de nitrógeno total (nitrato de potasio) expresados en mg-N/L; y, y corresponde a absorbancia. Datos en negrita corresponden a datos anómalos y son omitidos para los cálculos de los estadísticos descriptivos \bar{y} , s_y y CV(%). La fila “C” corresponde a los datos de absorbancia de la muestra control y la fila “R” corresponde a los datos de absorbancia de la muestra compuesta (utilizada para el estudio de la precisión y exactitud, cuyo valor de x corresponde a la concentración presente en el análisis, posterior a su dilución de 1:10).

Para ejemplificar los cálculos realizados para la aplicación del estadístico t de mínima diferencia entre curvas, se tomaron los pares de datos de absorbancia (de los cuales se obtiene su diferencia para cada nivel de concentración, d) correspondientes a la curva de control y de la curva en donde se varió la temperatura de digestión (**Anexo C, Curva 1 y Curva 3**). Se estableció como hipótesis nula, H_0 , que no hay diferencias significativas entre las curvas evaluadas para un contraste de dos colas. El valor crítico de t para $GL = 6$ y $P = 0.05$ es 2.45 (Miller & Miller, 2010).

Media de las diferencias entre absorbancias:

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{n} = \frac{+0.262}{7} = +0.0374$$

Desviación estándar de las diferencias entre absorbancias:

$$s_d = \sqrt{\sum (d_i - \bar{d})^2 / (n - 1)} = \sqrt{1.46 \times 10^{-3} / 6} = 0.0156$$

Estadístico t de mínima diferencia entre curvas:

$$t = \bar{d} \cdot \sqrt{n} / s_d = 0.0374 \cdot \sqrt{7} / 0.0156 = 6.34$$

Para ejemplificar los cálculos realizados para la evaluación de datos anómalos en cada nivel de concentración (máximos y mínimos de cada uno de los sets de datos) se utilizará un dato anómalo (y_{vs}), la absorbancia máxima del tercer nivel de concentración, 0.181 (*Tabla 7*). El valor de G crítico para $n = 8$ y $P = 0.05$ es de 2.126 (Miller & Miller, 2010).

Test de Grubbs.

$$G = |y_{vs} - \bar{y}|/s_y = |0.181 - 0.123|/0.027 = 2.150$$

Al graficar los pares de datos agrupados (*Figura 14*), se observa una dispersión mayor en los pares correspondientes a los niveles de mayor concentración; esto es verificable por medio de la gráfica de residuales (*Figura 15*) y confirma la presencia de heterocedasticidad de los datos; razón por la cual, se realizó un ajuste de mínimos cuadrados ponderados (Miller & Miller, 2010).

Ajuste de mínimos cuadrados ponderados. Considerando que los coeficientes de variación de los datos en la variable x (*Tabla 6*) son mucho menores a los obtenidos en la variable y (*Tabla 7*), la ponderación (*Ecuación 10*) únicamente fue realizada a partir de las desviaciones estándares de la absorbancia para cada nivel de concentración (*Tabla 7*).

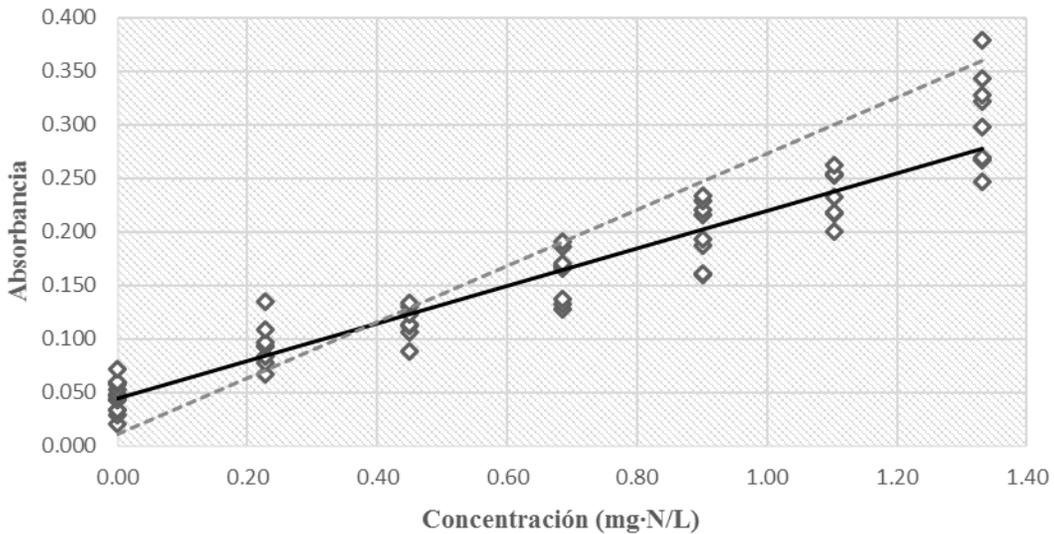


Figura 14. Curva de absorbancia contra concentración de nitrógeno total (mg·N/L) en el rango validado. La línea negra representa el ajuste de mínimos cuadrados ponderados (*Ecuación 38*) con un R^2 de 0.919. La línea entrecortada representa una curva de calibración omitiendo los pasos de digestión oxidativa y eliminación del exceso de oxidante -método de la brucina- (EP).

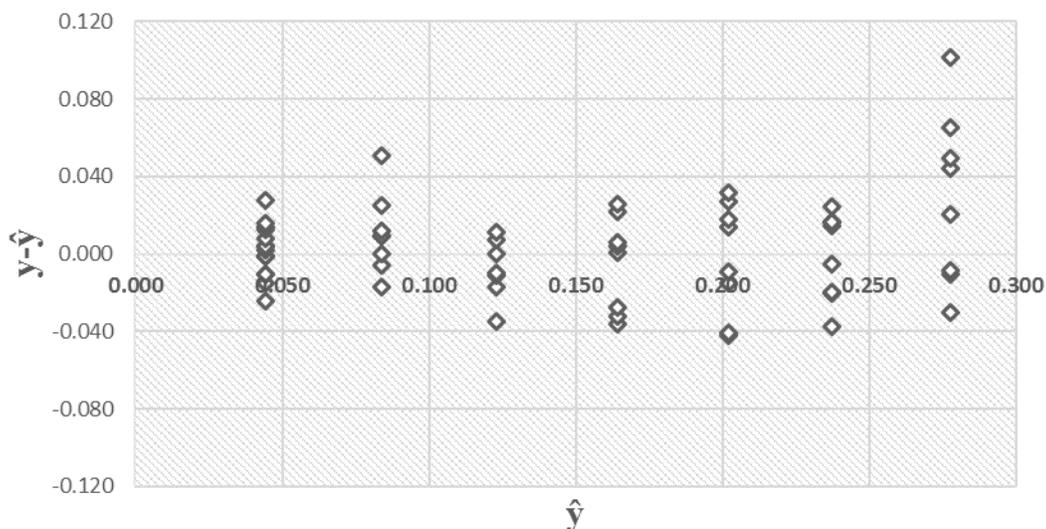


Figura 15. Gráfica de residuales de la curva de calibración en el rango validado. Es posible observar heterocedasticidad en los datos; justificando así el uso de una regresión lineal ponderada (EP).

Para ejemplificar dicho cálculo, tomaremos el cuadrado del inverso de la desviación estándar del primer nivel de concentración, s_1^{-2} -dato calculado a partir de la desviación estándar, s_1 , disponible en la **Tabla 7**- y la sumatoria de dicha variable $\sum_i s_i^{-2}$ (**Tabla 8**).

Ponderación:

$$w_1 = \frac{s_1^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}/n} = \frac{5102}{16608/7} = 2.150$$

Tabla 8. Cálculos realizados para el ajuste de mínimos cuadrados (EP).

N.º	x	y	s_y	s_y^{-2}	w	wx	wy	wxy	wx ²
1	0.00	0.045	0.014	5102	2.150	0.000	0.09675	0.0000	0.0000
2	0.23	0.094	0.021	2268	0.956	0.220	0.08986	0.0207	0.0506
3	0.45	0.115	0.016	3906	1.646	0.741	0.18929	0.0852	0.3333
4	0.69	0.160	0.024	1736	0.732	0.505	0.11712	0.0808	0.3485
5	0.90	0.200	0.029	1189	0.501	0.451	0.10020	0.0902	0.4058
6	1.10	0.236	0.023	1890	0.797	0.877	0.18809	0.2069	0.9644
7	1.33	0.307	0.044	517	0.218	0.290	0.06693	0.0890	0.3856
Σ				16608	7.000	3.084	0.84824	0.5728	2.4882

Notas. Detalle de variables: x corresponde a la concentración de los estándares de nitrógeno total (nitrato de potasio) expresados en mg·N/L; y, y corresponde a la absorbancia.

Posterior a la ponderación de los datos, se realizó el ajuste de mínimos cuadrados, calculando las medias ponderadas de cada variable, \bar{x}_w y \bar{y}_w (**Ecuación 13**); la pendiente, b_w (**Ecuación 11**); y, el intercepto, a_w (**Ecuación 12**). La sumatoria de las variables wx , wy , wxy , wx^2 y sus cálculos preliminares se encuentran disponibles en la **Tabla 8**.

Medias ponderadas:

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{n} = \frac{3.084}{7} = 0.44 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$$

$$\bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{n} = \frac{0.84824}{7} = 0.121$$

Pendiente (ajuste de mínimos cuadrados ponderado):

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} = \frac{0.5728 - 7 \times 0.44 \times 0.121}{2.4882 - 7 \times (0.44)^2} = 0.1766 \text{ (mg}\cdot\text{N/L)}^{-1}$$

Intercepto (ajuste de mínimos cuadrados ponderado):

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w = 0.121 - 0.1766 \times 0.44 = 0.0433$$

A partir de los resultados, se formuló la ecuación de línea recta (**Ecuación 38**) que describe la relación entre las variables de concentración de nitrógeno total (mg·N/L) y absorbancia.

$$A = 0.1766 \times c(\text{mg}\cdot\text{N/L}) + 0.0433$$

Ecuación 38.
(Autoría propia)

- b) **Límite de Cuantificación.** A partir de la **Ecuación 38**, se calcularon las concentraciones de cada una de las absorbancias de la lectura del primer nivel de concentración (blanco reactivo). Para ejemplificarlo, tomamos la primera absorbancia registrada en la **Tabla 7**:

Cálculo de concentración a partir de la ecuación de la línea recta:

$$c(\text{mg}\cdot\text{N/L}) = \frac{A - 0.0433}{0.1766} = \frac{0.046 - 0.0433}{0.1766} = 0.02 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$$

Posteriormente, se calcula la media (**Ecuación 5**) y desviación estándar (**Ecuación 4**) de las concentraciones de los blancos reactivo; obteniendo valores de 0.0092 mg·N/L y

0.0757 mg·N/L, respectivamente. Finalmente, es calculado el límite de cuantificación (LOQ) utilizando la **Ecuación 6**:

Límite de cuantificación:

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} = \frac{0.0757 \text{ mg}\cdot\text{N/L}}{\sqrt{15}} = 0.020 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$$

$$LOQ = k_Q \cdot s'_0 = 10 \times 0.020 \text{ mg}\cdot\text{N/L} = 0.20 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$$

Dado que el valor del límite de cuantificación es menor al segundo nivel de concentración (0.23 mg·N/L), se puede afirmar que el rango de la metodología validada se encuentra entre 0.20 a 1.33 mg·N/L.

- c) **Selectividad.** Se aplicó el estadístico t , con un contraste de dos colas, para la comparación de una media experimental con un valor conocido (**Ecuación 31**), siendo la media experimental, -y su respectiva desviación estándar- la concentración promedio de las absorbancias de la muestra de control (referidas en la **Tabla 7** y calculadas usando la **Ecuación 38**); y, el valor de la concentración de la absorbancia de la muestra control en presencia de un interferente (dichas observaciones experimentales se encuentran registradas en el **Anexo D**).

La muestra control se describe con una media de 0.621 mg·N/L y una desviación estándar de 0.093 mg·N/L. El valor crítico de t para $GL = 5$ y $P = 0.05$ es 2.57 (Miller & Miller, 2010). Los resultados de dicho estudio se resumen en la **Tabla 9**.

Se ejemplifica el cálculo del estadístico t usando la concentración obtenida para la muestra con iones cromo hexavalentes a una concentración de 1.00 mg·Cr/L.

Estadístico t de comparación de una media experimental con un valor conocido:

$$t = (\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{n}/s = (0.621 - 0.832) \cdot \sqrt{6}/0.093 = 5.56$$

Tabla 9. Resultados del estudio de selectividad para la presente metodología (EP).

N.º	Probables interferentes	c_{int}	c_{TPN} (mg·N/L)	$t_{calc.}$	
1	Iones clorato, ClO_3^-	0.700	mg· ClO_3^- /L	0.724	2.71
		0.350		0.735	3.01
2	Iones hipoclorito, ClO^-	1.111	mg·Cl/L	0.638	0.45
		0.556		0.558	1.65
3	Iones fosfato, PO_4^{3-}	15.000	mg·P/L	0.667	1.20
		7.500		0.564	1.50
4	Iones silicato, SiO_4^{4-}	0.700	mg·Si/L	0.547	1.96
		0.350		0.530	2.41
5	Iones hierro (III), Fe^{3+}	10.000	mg·Fe/L	1.945	34.90
		5.000		2.961	61.67
6	Iones cromo (VI), Cr^{6+}	1.000	mg·Cr/L	0.832	5.56
		0.500		0.587	0.90
7	Iones manganeso (VII), Mn^{7+}	2.000	mg·Mn/L	0.621	0.00
		1.000		0.610	0.30

Los resultados en negrita indican que el t calculado es mayor al valor crítico ($t = 2.57$, $GL = 5$) significativamente en un nivel mayor al 5% ($P = 0.05$); lo que confirma que el probable interferente evaluado es un interferente.

d) Precisión, Exactitud y Capacidad de Digestión. A partir de los datos obtenidos de absorbancia para cada una de las muestras a evaluar (*Anexo D*), se calcularon las concentraciones (*Ecuación 38*), media (*Ecuación 5*), desviación estándar (*Ecuación 4*) y coeficiente de variación (*Ecuación 7*). Se aplicó la *Ecuación 15* para determinar la recuperación relativa de adición de cada una de las muestras. Los resultados del estudio de recuperación se resumen en la *Tabla 10*. Se ejemplifica el cálculo de la recuperación relativa de adición usando la concentración obtenida para la muestra compuesta (con una concentración de 10.00 mg·N/L y cuya elaboración se detalla en el *Anexo A*); la cual es descrita con una media de 0.813 mg·N/L, desviación estándar de 0.118 mg·N/L y un coeficiente de variación (precisión) de 14.46%; y, la concentración obtenida para los blancos reactivo, descrita en el cálculo el límite de cuantificación. Es importante aclarar, que la muestra compuesta fue diluida en un factor de 10; razón por la cual, las concentraciones obtenidas tanto para blancos reactivos como para la muestra compleja son multiplicados por dicho factor en el cálculo de recuperación relativa.

Recuperación relativa de adición:

$$R(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{adicion}} \times 100 = \frac{0.813 \times 10 - 0.009 \times 10}{10.00} \times 100 = \frac{8.04}{10.00} \times 100 = 80.4\%$$

Tabla 10. Resultados del estudio de exactitud y capacidad de digestión para la presente metodología (EP).

ID	Analito	x_{an}	$s_{x_{an}}$	x_{ad}	$s_{x_{ad}}$	Δx_{ad}	R	ΔR	$R + \Delta R$	s_R
CRM	Nitrato de sodio + glicina	8.04	1.40	10.00	0.02	-0.23	80.4	-1.9	78.5	14.0
NI1*	Nitrito de sodio	1.36	0.09	1.23	0.01	-0.16	110.6	-14.4	96.2	7.4
NI2*	Cloruro de amonio	1.24	0.12	1.24	0.01	-0.16	100.0	-13.3	86.7	9.7
NO1*	Urea	0.92	0.11	1.35	0.01	-0.19	68.1	-9.6	58.5	8.2
NO2*	Clorhidrato glucosamina	1.12	0.09	1.24	0.01	-0.15	90.3	-10.9	79.4	7.3
NO3*	Clorhidrato de tiamina	0.94	0.10	1.10	0.01	-0.14	85.5	-10.9	74.6	9.1
NO4*	Indol-3-acetato de potasio	1.21	0.10	1.25	0.01	-0.15	96.8	-11.6	85.2	8.0
NO5	Metilcobalamina	1.38	0.23	1.32	0.01	-0.09	104.5	-7.1	97.4	17.4

Notas. Detalle de variables: x_{an} es la concentración de nitrógeno total analizada (en mg·N/L), diferencia entre la muestra y el blanco reactivo; x_{ad} es la concentración preparada para cada una de las muestras; y, R es la recuperación relativa de adición para cada una de las muestras evaluadas. Las muestras con asterisco (*) fueron evaluadas a un tiempo de eliminación del exceso de oxidante de 27 h.

4. Cuantificación de los componentes de incertidumbre de la metodología.

Con base a la fórmula elaborada para determinar la concentración de nitrógeno total (*Ecuación 32*), se identifican seis factores; a los cuales, se les debe cuantificar su incertidumbre para realizar la respectiva estimación de incertidumbre combinada. Dicha estimación se realizará para el análisis asociado a la muestra compuesta (elaborada a partir de dos Materiales de Referencia Certificado). A continuación, se detalla el proceso de cuantificación de cada uno de los componentes de incertidumbre de la metodología:

- a) c_0 . Dicho factor (con un valor de 8.13 mg·N/L) recae únicamente en la elaboración de la curva de calibración. Debido a que la propagación de errores sistemáticos fue considerada en la corrección de las concentraciones de las soluciones utilizadas para elaborar la curva de calibración, la fuente de incertidumbre no cuantificada es la desviación estándar de la concentración determinada, s_{x_0} ; la cual, se expresa como una incertidumbre estándar, calculada a partir de la *Ecuación 14*.

Para dicho cálculo, se retoman los valores calculados previamente en el ajuste de mínimos cuadrados ponderados, correspondientes a \bar{y}_w (0.121), \bar{x}_w (0.433 mg·N/L) y b_w (0.1766 L/mg·N); w_0 (*Ecuación 10*) es calculado a partir de s_0 (tomado de la *Tabla 7* como la desviación estándar de los datos de absorbancia de la muestra compuesta, 0.021) y de la sumatoria de la variable s^{-2} (*Tabla 8*); y_0 corresponde a la media de los datos de

Tabla 11. Cálculos realizados para la cuantificación de la desviación estándar de la concentración determinada (EP).

N.º	x	y	s _y	w	wx	wx ²	ŷ	(y - ŷ) ²	w(y - ŷ) ²
1	0.00	0.045	0.014	2.150	0.000	0.0000	0.0433	2.89x10 ⁻⁶	6.21x10 ⁻⁶
2	0.23	0.094	0.021	0.956	0.220	0.0506	0.0839	1.02x10 ⁻⁴	9.75x10 ⁻⁵
3	0.45	0.115	0.016	1.646	0.741	0.3333	0.1228	6.08x10 ⁻⁵	1.00x10 ⁻⁴
4	0.69	0.160	0.024	0.732	0.505	0.3485	0.1652	2.70x10 ⁻⁵	1.98x10 ⁻⁵
5	0.90	0.200	0.029	0.501	0.451	0.4058	0.2022	4.84x10 ⁻⁶	2.42x10 ⁻⁶
6	1.10	0.236	0.023	0.797	0.877	0.9644	0.2376	2.56x10 ⁻⁶	2.04x10 ⁻⁶
7	1.33	0.307	0.044	0.218	0.290	0.3856	0.2782	8.29x10 ⁻⁴	1.81x10 ⁻⁴
Σ				7.000	3.084	2.4882	1.1332	1.03x10⁻³	4.09x10⁻⁴

Nota. Detalle de variables: x corresponde a la concentración de los estándares de nitrógeno total (nitrato de potasio) expresados en mg·N/L; y, y corresponde a la absorbancia.

absorbancia de la muestra compuesta, 0.187 (*Tabla 7*); y, la sumatoria de las variables wx^2 , $w(y - \hat{y})^2$ y sus cálculos preliminares se encuentran disponibles en la *Tabla 11*.

Desviación estándar en el eje y:

$$S_{(y/x)w} = \left\{ \frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2} = \sqrt{\frac{4.09 \times 10^{-4}}{5}} = 9.04 \times 10^{-3}$$

Desviación estándar de la concentración determinada:

$$u_{c_0} = S_{x_{ow}} = \frac{S_{(y/x)w}}{b} \cdot \left\{ \frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y}_w)^2}{b^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)} \right\}^{1/2}$$

$$u_{c_0} = \frac{9.04 \times 10^{-3}}{0.1766} \cdot \sqrt{\frac{1}{0.962} + \frac{1}{7} + \frac{(0.187 - 0.121)^2}{0.1766^2 (2.4882 - 7 \times 0.433^2)}} = 0.058 \text{ mg·N/L}$$

- b) **R.** Dicho factor es calculado a partir de la *Ecuación 15* (obteniendo un valor de 80.39%); a la cual, es posible aplicarle las reglas de propagación de errores para una combinación lineal (*Ecuación 19*) y una expresión multiplicativa (*Ecuación 21*) tanto para errores aleatorios (provenientes de la preparación de la muestra compleja y la dispersión de absorbancia de la lectura de las muestras blanco y muestra compuesta) y sistemáticos (únicamente provenientes de la preparación de la muestra compleja). Dichos cálculos se presentan en la *Tabla 10*, obteniendo un error aleatorio de 13.98% y un sistemático de -1.87%. Para evitar aplicar doblemente la propagación de error para una operación en

particular de la metodología, se ha omitido la incerteza asociada a la disolución de la muestra y se ha asumido que dicho factor está como una constante.

- c) **D.** Debido a que la muestra elaborada (10.00 mg·N/L) está arriba del rango útil de la metodología, fue necesaria diluirla en un factor de 10. Dicho proceso de dilución consistió en la toma de 0.5 mL de muestra y 4.5 mL de blanco reactivo (ASW) como solvente. Dicho proceso de dilución implica una adición de volúmenes (combinación lineal, **Ecuación 19**) y el uso de una relación de volúmenes (final contra inicial) que deriva en un factor adimensional (expresión multiplicativa, **Ecuación 21**). Al aplicar las reglas de propagación de errores en dicha relación, se obtiene un error aleatorio de 0.067 y un error sistemático de -0.48.
- d) f_{dig} . Se evaluaron dos curvas de calibración en donde se variaron las condiciones de tiempo -15 h 30 min- (**Anexo C, Curva 2**) y temperatura -85 °C- (**Anexo C, Curva 3**) en la Etapa de Digestión Oxidativa; cada una de estas, se comparó con la curva de control (16 h y 90 °C) mediante el estadístico t de mínima diferencia entre curvas con un contraste de dos colas (**Ecuación 34**), obteniendo una diferencia significativa para la variable de temperatura. Dichos resultados, se resumen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados de la evaluación de variables que influyen en la concentración de la metodología validada: Comparación entre curvas de calibración con una modificación en sus variables contra la curva de control (EP).

Etapa	Factor	Variable	\bar{d}	s_d	t_{calc}
Digestión oxidativa	f_{dig}	Tiempo (15h 30min)	- 0.0094	0.0242	1.03
		Temperatura (85°C)	+0.0374	0.0156	6.34
Eliminación del exceso de oxidante	f_{red}	Tiempo (27h)	- 0.1682	0.1312	3.14
		Temperatura (50°C)	- 0.0040	0.0195	0.54
Desarrollo del color	f_{color}	Tiempo (2h 30min)	- 0.0014	0.0291	0.13
		Temperatura (50°C)	- 0.2629	0.1301	5.35

Notas. Detalle de variables: \bar{d} y s_d , corresponde a la media y desviación estándar de la diferencia entre absorbancia de la curva a evaluar contra la de control; la cual, se encuentra en condiciones de validación (**Ver Sección 3a. Análisis Teórico y Resultados**). Los resultados en negrita indican que el estadístico t calculado es significativamente mayor, en un nivel del 5% ($P = 0.05$), al valor crítico $-t = 2.45$, $GL = 6$ - (Miller & Miller, 2010); lo que indica que, a dichas condiciones, hay una diferencia significativa entre las absorbancias de la curva de calibración donde se realizó un cambio en una de las variables y la curva de control.

Debido a que la variable de temperatura (a las condiciones evaluadas) presentó una diferencia significativa de absorbancias, es necesario caracterizar dicha diferencia en función de la temperatura (el cual posee un comportamiento cinético de primer orden) y evaluar una variación menor para poder atribuirle su respectiva incertidumbre.

Al comparar gráficamente ambas curvas de calibración (**Figura 16**), se observó paralelismo; el cual, se confirmó estadísticamente por medio del estadístico t para mínima diferencia entre pendientes (**Ecuación 35**) con un contraste de dos colas. El valor crítico de t es 2.45 ($GL = 6$ y $P = 0.05$). El valor de la sumatoria de las variables $(x_{i1} - \bar{x}_1)^2$ y $(x_{i1} - \bar{x}_1)^2$ es el mismo, debido a que dichas curvas fueron elaboradas en los mismos niveles de concentración y se encuentra expresado como la sumatoria de $(x_i - \bar{x})^2$ en la **Tabla 13**; así como también, sus cálculos preliminares. Los valores de las pendientes b_0 y b_1 son tomados de las ecuaciones de la línea recta obtenidas del ajuste de mínimos cuadrados y expresados en la **Figura 16**. Previo al cálculo del estadístico t , se confirmó que no hubiese diferencias significativas entre varianzas, con un contraste de dos colas, a través de la prueba F de las varianzas de las curvas evaluadas; siendo 7.146 el valor crítico de F para 5 grados libertad en el numerador y denominador.

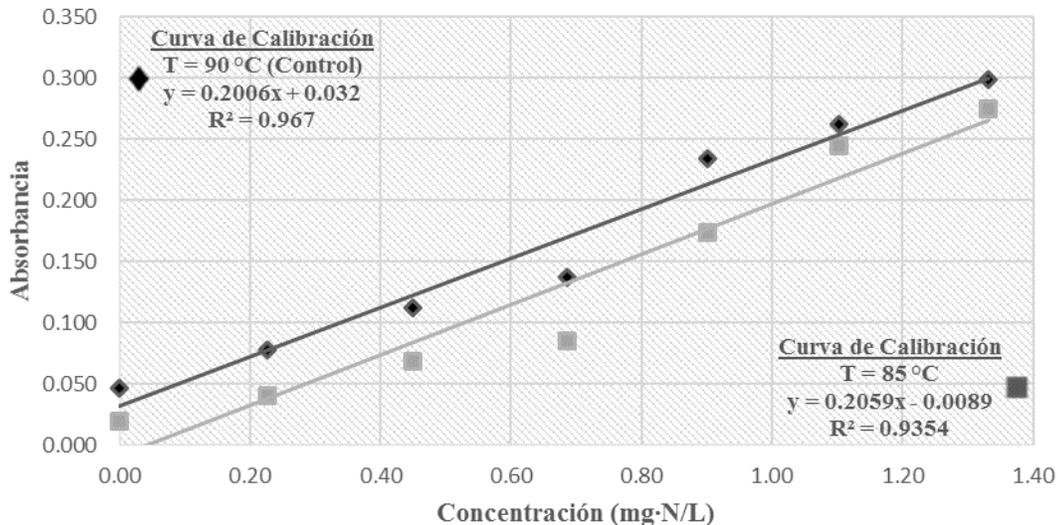


Figura 16. Efecto del cambio de temperatura en la Etapa de Digestión Oxidativa en la curva de calibración de la metodología validada (EP).

Para el cálculo de la desviación estándar en el eje-y, se aplicó la **Ecuación 14** (únicamente la ecuación que corresponde a $S_{(y/x)}$) considerando que debido a que en cada nivel se posee un solo dato (tanto para la curva de control como la evaluada), la ponderación para todos los niveles será de 1. El valor de la sumatoria de la variable $(y_i - \hat{y}_i)^2$ y sus cálculos preliminares se encuentran en la **Tabla 13**.

Desviación estándar para el eje-y ($w_i = 1$):

$$S_{(y/x)0} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{1.81 \times 10^{-3}}{5}} = 0.0190$$

Prueba F:

$$F_{b_1-b_0} = \frac{s_{(y/x)1}^2}{s_{(y/x)0}^2} = \frac{(0.0284)^2}{(0.0190)^2} = 2.234$$

Desviación estándar para el eje y ponderada:

$$S_{(y/x)p} = \sqrt{\frac{(n_1 - 2) \times s_{(y/x)1}^2 + (n_2 - 2) \times s_{(y/x)0}^2}{n_1 + n_2 - 4}}$$

$$S_{(y/x)p} = \sqrt{\frac{(7 - 2) \times (0.0284)^2 + (7 - 2) \times (0.0190)^2}{7 + 7 - 4}} = 0.0242$$

Tabla 13. Cálculos realizados para la cuantificación del estadístico t para mínima diferencia entre pendientes (EP).

N.º	x	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$	y_0	\hat{y}_0	$(y_0 - \hat{y}_0)^2$	y_1	\hat{y}_1	$(y_1 - \hat{y}_1)^2$
1	0.00	-0.67	0.4489	0.046	0.032	1.96×10^{-4}	0.019	-0.009	7.84×10^{-4}
2	0.23	-0.44	0.1936	0.078	0.078	0.00×10^{-0}	0.040	0.038	4.00×10^{-6}
3	0.45	-0.22	0.0484	0.112	0.122	0.00×10^{-0}	0.068	0.084	2.56×10^{-4}
4	0.69	+0.02	0.0004	0.137	0.170	1.09×10^{-3}	0.085	0.132	2.21×10^{-3}
5	0.90	+0.23	0.0529	0.234	0.213	4.41×10^{-4}	0.174	0.177	9.00×10^{-6}
6	1.10	+0.43	0.1849	0.262	0.253	8.10×10^{-5}	0.244	0.218	6.76×10^{-4}
7	1.33	+0.66	0.4356	0.298	0.299	1.00×10^{-6}	0.275	0.265	1.00×10^{-4}
Σ	4.70	0.00	1.3647	1.167	1.167	1.81×10^{-3}	0.905	0.905	4.04×10^{-3}

Notas. Detalle de variables: x corresponde a la concentración de los estándares de nitrógeno total (nitrato de potasio) expresados en $\text{mg} \cdot \text{N/L}$; y_0 corresponde a las absorbancias de la curva de calibración control; y, y_1 corresponde a las absorbancias de la curva de variación de temperatura en el paso de digestión.

Estadístico t:

$$t_{b_1-b_0} = \frac{b_1 - b_0}{s_{(y/x)p}^2 \times \sqrt{\frac{1}{\sum_i (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum_i (x_{i0} - \bar{x}_0)^2}}} = \frac{0.2059 - 0.2006}{0.0242 \times \sqrt{\frac{1}{1.3647} + \frac{1}{1.3647}}} = 0.18$$

Considerando la existencia del paralelismo entre las curvas de calibración, es posible asumir que el efecto de la variación de la absorbancia, para esta etapa, se debió únicamente a la cantidad de persulfato de potasio sin descomponerse después del proceso de digestión. La cantidad inicial de persulfato de potasio presente en el vial fue calculada (a partir de los detalles de la metodología, dados en el *Anexo A*), así como también convertida a un equivalente de nitrógeno total, basado en la estequiometría de la reacción entre los iones nitrato con la brucina (*Ecuación Química 6*) y la reacción entre los iones persulfato con los iones sulfito (*Ecuación Química 7*). Posteriormente, se calculó la concentración de persulfato presente al final del análisis por dilución (asumiendo que el persulfato no ha reaccionado en las etapas previas).

Concentración inicial de persulfato:

$$c_I = \frac{n}{V} = \frac{m/MM}{V} = \frac{2.000 \text{ g} \cdot \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 / 270.322 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{40 \text{ mL} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}} = 0.185 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$$
$$c_I = 0.185 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 \times \frac{2e^- \text{ mol}^{-1} \cdot \text{KNO}_3}{2e^- \text{ mol}^{-1} \cdot \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8} \times \frac{1 \text{ mol} \cdot \text{N}}{1 \text{ mol} \cdot \text{KNO}_3} \times \frac{14.0067 \text{ g} \cdot \text{N}}{1 \text{ mol} \cdot \text{N}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$
$$c_I = 2591 \text{ mg} \cdot \text{N} / \text{L}$$

Concentración inicial de persulfato al final del análisis por dilución:

$$c'_I V'_I = c_I V_I$$
$$c'_I = \frac{c_I V_I}{V'_I} = \frac{1 \text{ mL} \cdot 2591 \text{ mg} \cdot \text{N} / \text{L}}{12 \text{ mL}} = 215.9 \text{ mg} \cdot \text{N} / \text{L}$$

Teniendo en cuenta que la descomposición de iones persulfato, a pH constante, posee una cinética de primer orden (*Ecuación Química 2*) es posible determinar las constantes cinéticas k (*Ecuación 33*), J (*Ecuación 36*) y H (*Ecuación 36*). Utilizando la *Ecuación 38* se determinan las concentraciones (mg·N/L) de las absorbancias de los

blancos -0.0696 mg·N/L a 90 °C y 0.1357 mg·N/L a 85 °C- (**Tabla 13**). Dichas concentraciones se consideraron como las concentraciones finales de la descomposición cinética, posterior a las 16 h (c_0 y c_1).

Determinación de la constante cinética k .

$$k_0 = \ln \frac{c'_1}{c_0} \cdot t^{-1} = \ln \frac{215.9 \text{ mg}\cdot\text{N/L}}{0.07 \text{ mg}\cdot\text{N/L}} \cdot (16 \text{ h})^{-1} = 0.502 \text{ h}^{-1}$$

Determinación de las constantes cinéticas J y H .

$$\frac{k_0}{k_1} = \frac{J e^{H \times \frac{1}{T_0}}}{J e^{H \times \frac{1}{T_1}}} = e^{H \times \left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_1} \right)}$$

$$H = \frac{\ln \frac{k_0}{k_1}}{\left(\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T_1} \right)} = \frac{\ln \frac{0.502}{0.461}}{\left(\frac{1}{363.15 \text{ K}} - \frac{1}{358.15 \text{ K}} \right)} = -2216 \text{ K}$$

$$J = \frac{k_0}{e^{H \times \frac{1}{T_0}}} = \frac{0.502 \text{ h}^{-1}}{e^{-2216 \text{ K} \times \frac{1}{363.15 \text{ K}}}} = 224.3 \text{ h}^{-1}$$

Una vez determinadas las constantes cinéticas de primer orden que rigen la descomposición de los iones persulfato en el proceso de digestión en función de la temperatura (J y H), se calculó la constante cinética en función del tiempo para una disminución de temperatura de 2 °C (88 °C) -0.485 h⁻¹-, se determinó la concentración del blanco a dicha temperatura -0.0914 mg·N/L- y se obtuvo la diferencia entre concentraciones -0.0218 mg·N/L-. Asumiendo que dicha diferencia es equivalente (o menor) a un aumento de temperatura de 2 °C y considerando que la diferencia de concentración posee una distribución rectangular, se calculó la incertidumbre estándar (**Ecuación 16**) para dicho factor.

Cálculo de incertidumbre estándar (distribución rectangular):

$$u_{f_{dig}} = \frac{d_{c_0-c_3}}{\sqrt{3}} = \frac{0.0218 \times 2}{\sqrt{3}} = 0.0252$$

e) f_{red} . Se realizó un proceso de evaluación similar al utilizado para f_{dig} , obteniendo diferencias significativas para la variable de tiempo -**Tabla 12**- (Datos disponibles en el **Anexo C, Curva 9**). Al comparar gráficamente la curva de calibración con la variación de tiempo y la curva de control (**Figura 17**), no se observó paralelismo y se asume que el efecto de variación de las absorbancias, en este factor, depende de la concentración de nitrógeno total y de los iones persulfato sin descomponerse.

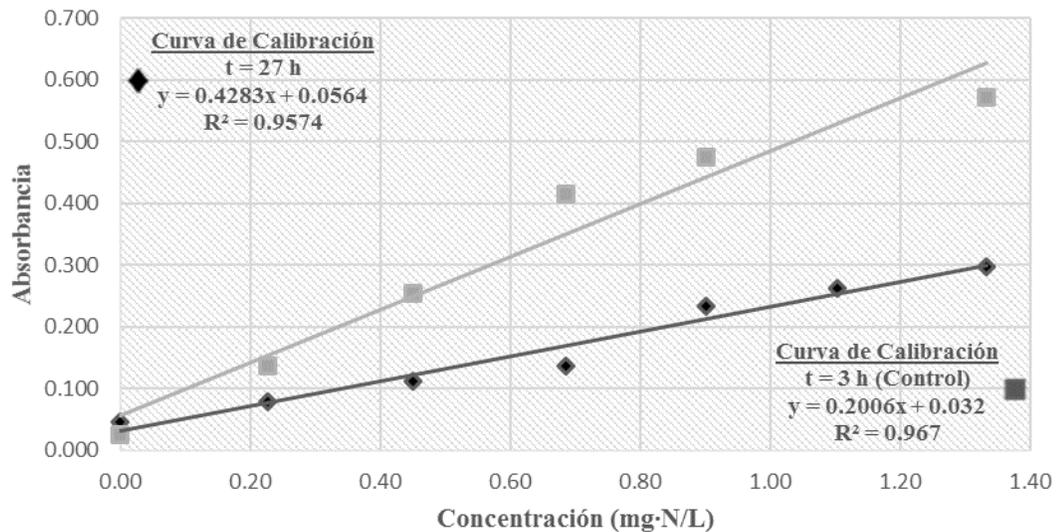


Figura 17. Efecto del cambio de tiempo en la Etapa de Eliminación del Exceso de Oxidante en la curva de calibración de la metodología validada (EP).

Asumiendo que la eliminación del exceso del oxidante por acción de los iones sulfito (en medio básico) sigue una cinética de pseudo primer orden (Atkins & de Paula, 2006), con un comportamiento descrito por la **Ecuación 33**, y considerando la relación de concentración de una mezcla de componentes con absorbancia a través de la Ley de Beer-Lambert (**Ecuación 2**), fue posible separar la contribución de la concentración de iones nitrato y persulfato en la absorbancia a través del análisis de la pendiente e intercepto de las ecuaciones de línea de las curvas de calibración. Se consideró como la curva de calibración en un tiempo inicial ($t_0 = 0$ h) la curva de control y se definió como tiempo final la diferencia de tiempos entre cada curva de calibración ($t_f = 24$ h).

Desarrollo algebraico:

$$A = b \times c(\text{mg N/L}) + a = A_{NO_3^-} + A_{K_2S_2O_8^{2-}}$$

$$d\varepsilon \times c = d\varepsilon \times c_0 e^{-kt} \Rightarrow A = A_0 \times e^{-kt}$$

$$A = b_{24}c + a_{24} = b_0c \times e^{-k_b t} + a_0 \times e^{-k_a t}$$

$$A_{NO_3^-} = b_{24}c = b_0c \times e^{-k_b t}$$

$$A_{K_2S_2O_8^{2-}} = a_{24} = a_0 \times e^{-k_a t}$$

De manera similar a los cálculos realizados en el factor f_{dig} , se calculó la constante cinética k para la pendiente e intercepto $-k_b = 0.0316 \text{ h}^{-1}$ y $k_a = 0.0235 \text{ h}^{-1}$ (datos tomados de las ecuaciones de la línea recta obtenidas del ajuste de mínimos cuadrados y expresados en la **Figura 17**), se determinó la absorbancia para un período de tiempo menor (3.5 h) a $0.90 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$ $-0.216-$ y se calculó su concentración, utilizando la ecuación de la línea recta de la curva de control como referencia $-0.9172 \text{ mg}\cdot\text{N/L}-$ para determinar la diferencia y aplicar la **Ecuación 16** para calcular la incertidumbre estándar de dicho factor: 0.0199.

- f) f_{color} . Se realizó un proceso de evaluación similar al utilizado para f_{dig} , obteniendo diferencias significativas para la variable de temperatura **-Tabla 12-** (Datos disponibles en el **Anexo C, Curva 5**). Al comparar gráficamente la curva de calibración con la variación de temperatura y la curva de control (**Figura 18**), no se observó paralelismo y se asume que el efecto de variación de las absorbancias, en este factor, depende de la concentración de nitrógeno total y de los iones persulfato sin descomponerse.

Asumiendo formación del color sigue una cinética de segundo orden (Masini et al., 1997), con un comportamiento descrito por la **Ecuación 37** (la cual, se multiplica por $1/d\varepsilon$ para convertir las concentraciones en absorbancias usando la **Ecuación 1**), y sustituyendo la constante cinética k por su equivalente en la **Ecuación 36**, se determinaron las constantes cinéticas J y H para un nivel de concentración de $0.90 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$. Se utilizaron, para el cálculo de las constantes cinéticas, las absorbancias estimadas, \hat{y} , de las curvas de calibración utilizadas (**Anexo C, Curva 1 y Curva 5**).

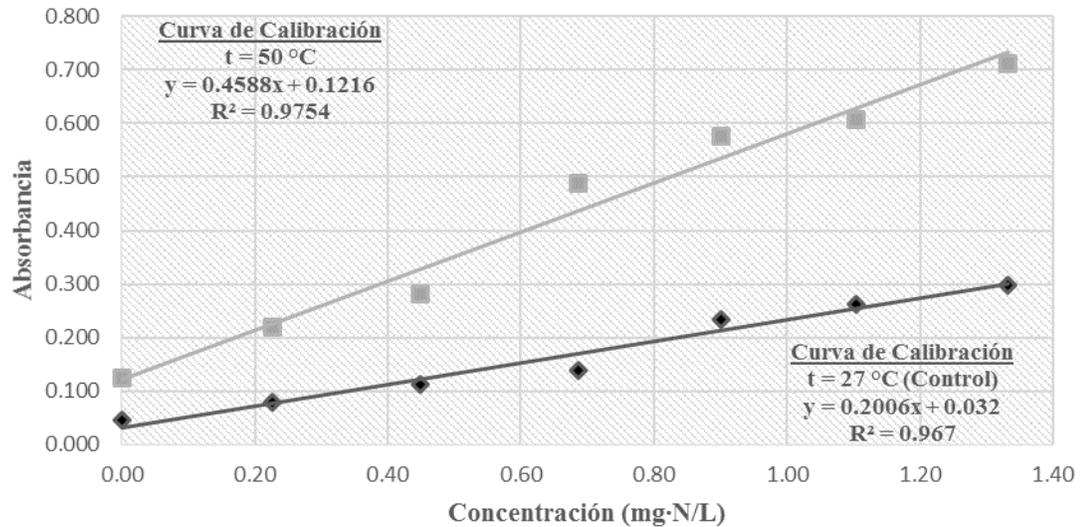


Figura 18. Efecto del cambio de temperatura en la Etapa de Desarrollo de Color en la curva de calibración de la metodología validada (EP).

Desarrollo algebraico:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} - \frac{k}{d\varepsilon}$$

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} - J' e^{H \times \frac{1}{T}}$$

$$\ln\left(\frac{1}{A_0} - \frac{1}{A}\right) = \ln(J') + H \times \frac{1}{T}$$

Determinación de las constantes cinéticas J y H :

$$H = \frac{\ln\left[\left(\frac{1}{A_0} - \frac{1}{A_1}\right) / \left(\frac{1}{A_0} - \frac{1}{A_2}\right)\right]}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} = \frac{\ln\left[\left(\frac{1}{0.010} - \frac{1}{0.213}\right) / \left(\frac{1}{0.010} - \frac{1}{0.535}\right)\right]}{\frac{1}{300.15 \text{ K}} - \frac{1}{323.15 \text{ K}}} = -123.21 \text{ K}$$

$$J' = \left(\frac{1}{A_0} - \frac{1}{A}\right) \times e^{-H \times \frac{1}{T}} = \left(\frac{1}{0.010} - \frac{1}{0.213}\right) \times e^{+123.21 \text{ K} \times \frac{1}{300.15 \text{ K}}} = +143.68$$

Una vez determinadas las constantes cinéticas de segundo orden que rigen la formación de color en función de la temperatura (J y H), se determinó la absorción para una temperatura de 28 °C (asumiendo que durante 1h 30 min de tiempo de desarrollo del color,

la temperatura varió únicamente 1 °C) a un nivel de concentración de 0.90 mg·N/L -0.219- y se calculó su concentración, utilizando la ecuación de la línea recta de la curva de control como referencia -0.9311 mg·N/L- para determinar la diferencia y aplicar la **Ecuación 16** para calcular la incertidumbre estándar de dicho factor: 0.0359.

5. Estimación de la incertidumbre expandida de la metodología.

Se utilizó el “método de la hoja de cálculo” (Kragten, 1994) para el cálculo de la incertidumbre estándar combinada. En dicha metodología, se elabora una tabla (**Tabla 14**) en donde se cuantifican las diferencias numéricas en el resultado final al cambiar uno de los componentes de la ecuación (cuya contribución es comparable en la **Figura 19**) para determinar la concentración de nitrógeno total de la metodología (**Ecuación 32**) al agregar la incertidumbre estándar asociada. Posteriormente, se aplicó la **Ecuación 17** para calcular la incertidumbre estándar combinada.

Cálculo de la concentración de nitrógeno total (Elemento de contraste):

$$c_{TPN} = 0.813 \text{ mg}\cdot\text{N/L} \times 10 \times (80.4\%)^{-1} \times 1 \times 1 \times 1 = 10.11 \text{ mg}\cdot\text{N/L}$$

Cálculo de la incertidumbre combinada de la metodología:

$$u_{c_{TPN}}^2 = \left(\frac{\partial C_{TPN}}{\partial c_o}\right)^2 u_{c_o}^2 + \left(\frac{\partial C_{TPN}}{\partial D}\right)^2 u_D^2 + \left(\frac{\partial C_{TPN}}{\partial R}\right)^2 u_R^2 + \left(\frac{\partial C_{TPN}}{\partial f_{dig}}\right)^2 u_{f_{dig}}^2 + \left(\frac{\partial C_{TPN}}{\partial f_{red}}\right)^2 u_{f_{red}}^2 + \left(\frac{\partial C_{TPN}}{\partial f_{color}}\right)^2 u_{f_{color}}^2$$

$$u_{c_{TPN}}^2 = 0.5184 + 0.0049 + 2.2201 + 0.0676 + 0.0441 + 0.1369 = 2.9920$$

$$u_{c_{TPN}} = 1.73$$

Se calculó la incertidumbre expandida, utilizando la **Ecuación 18** para un nivel de confianza del 95% ($k=2$). Adicionalmente, se aplicó la regla de propagación de errores sistemáticos para una expresión multiplicativa (**Ecuación 24**) para determinar el error sistemático asociado al método, siendo este de -0.72 mg·N/L. Se decidió expresar el resultado del análisis con una incertidumbre de dos cifras significativas, con la finalidad de mantener una consistencia en el coeficiente de variación obtenido y el redondeo realizado (Ellison & Williams, 2012).

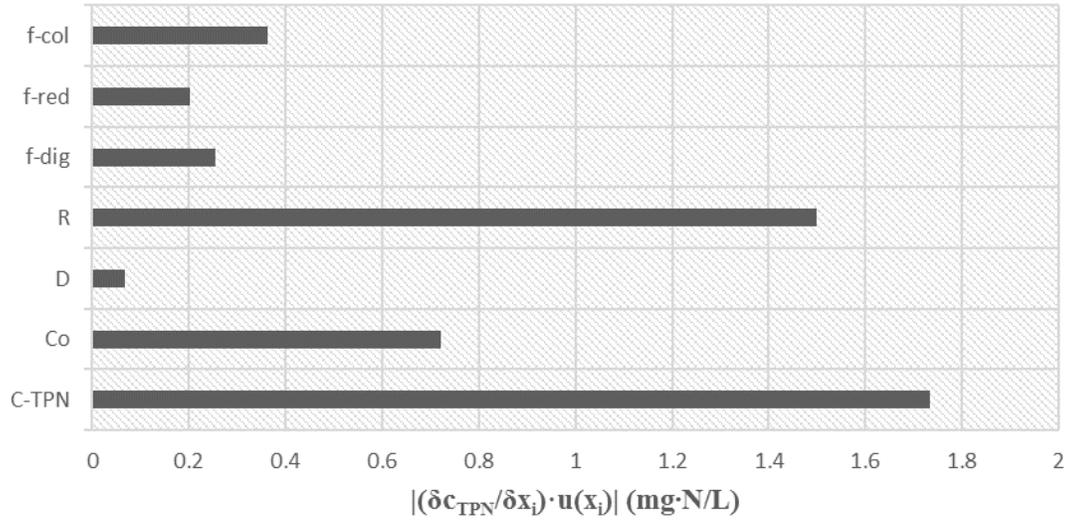


Figura 19. Contribución de cada componente en la incertidumbre estándar combinada c_{TPN} (EP).

Tabla 14. “Hoja de cálculo” utilizada para la determinación de la incertidumbre estándar combinada (EP).

	S_{c_o}	S_D	S_R	$S_{f_{dig}}$	$S_{f_{red}}$	$S_{f_{color}}$
c_o	0.871	0.813	0.813	0.813	0.813	0.813
D	10.00	10.07	10.00	10.00	10.00	10.00
R	80.39	80.39	94.37	80.39	80.39	80.39
f_{dig}	1.0000	1.0000	1.0000	1.0252	1.0000	1.0000
f_{red}	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0199	1.0000
f_{color}	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0359
$c_{TPN} + \left(\frac{\partial c_{TPN}}{\partial x_i}\right) u_{x_i}$	10.83	10.18	8.62	10.37	10.31	10.48
$\left(\frac{\partial c_{TPN}}{\partial x_i}\right) u_{x_i}$	0.72	0.07	-1.49	0.26	0.20	0.37
$\left(\frac{\partial c_{TPN}}{\partial x_i}\right)^2 u_{x_i}^2$	0.5184	0.0049	2.2201	0.0676	0.0400	0.1369

Notas. Los valores en negrita representan los cambios en cada uno de los componentes realizados para cuantificar el aporte individual que la incerteza de cada componente genera en el resultado final. Parámetros expresados en mg-N/L

Cálculo de la incertidumbre expandida:

$$U = k \cdot u_z = 2 \cdot 1.73 \text{ mg}\cdot\text{N}/\text{L} = 3.46 \text{ mg}\cdot\text{N}/\text{L}$$

Reporte del resultado de análisis.

$$c_{TPN} = Z + \Delta Z \pm U$$

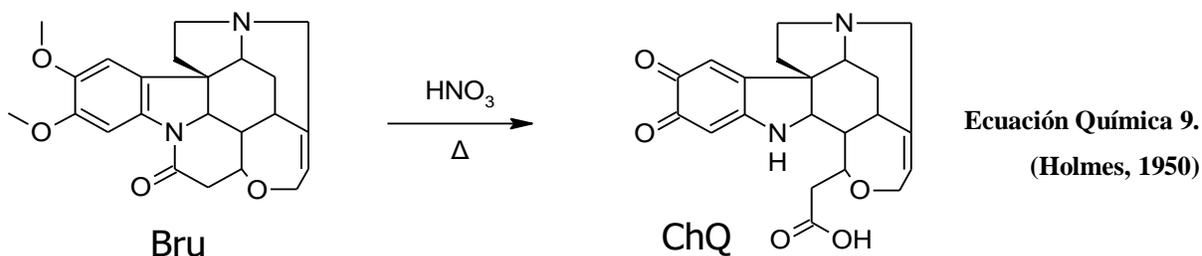
$$c_{TPN} = 10.11 \text{ mg}\cdot\text{N}/\text{L} - 0.72 \text{ mg}\cdot\text{N}/\text{L} \pm 3.46 \text{ mg}\cdot\text{N}/\text{L}$$

$$c_{TPN} = (9.4 \pm 3.5) \text{ mg}\cdot\text{N}/\text{L}$$

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

1. Desarrollo de la metodología.

Los colores obtenidos en las tres diferentes técnicas de digestión oxidativa sin la adición de iones bisulfito (*Tabla 4*) parecen concordar con los colores de la bruciquinona, **Bru-Q**, (rojo) y con la catecolina (**ChQ**), especie nitrada de la bruciquinona que posee unos cristales de color naranja-amarillentos que se forma cuando se eleva la temperatura en la reacción entre brucina y ácido nítrico, *Ecuación Química 9* (Gmelin, 1866). El color naranja indica la presencia de iones nitrato en las muestras de blanco; considerando que la absorbancia mínima medida era mucho mayor a la de agua de mar (0.010), se dedujo que la presencia de iones nitrato procedía del persulfato de potasio como impureza; razón por la cual, se trató de minimizar dicha interferencia -para los análisis posteriores- al cristalizar doblemente el reactivo oxidante en agua, siguiendo el procedimiento descrito en Hansen y Koroleff (1999). Debido a que el color amarillo característico del cromóforo de dicho análisis es obtenido en ausencia de nitratos (o al menos en una mezcla con una proporción mucho mayor de iones persulfato) se confirma que la formación del cromóforo no es una reacción selectiva entre los iones nitrato y la brucina; además, es posible inferir que a concentraciones bajas de bruciquinona, esta dimeriza en **Bru-Dm**.



2. Calibración de los instrumentos de medición asociados al análisis.

Al comparar los errores aleatorios y sistemáticos obtenidos para los balones volumétricos (*Tabla 5*) con la normativa ISO 1042:1998 se encontró que ambos balones volumétricos poseen un error aleatorio dentro de los errores máximos permisibles ($s_{V,MAX50} = 0.060$ mL y $s_{V,MAX100} = 0.100$ mL) y un error sistemático fuera de los errores máximos permisibles

($\Delta V_{MAX50} = 0.060 \mu\text{L}$ y $\Delta V_{MAX100} = 0.100 \mu\text{L}$). La fuente de error más probable atribuida a dichos instrumentos de medición es su grado de limpieza; debido a que dichos balones han sido utilizados previamente para la elaboración de soluciones con una amplia variedad de reactivos. Se sugiere realizar un lavado más agresivo, con una mezcla de permanganato de potasio e hidróxido de sodio, tal y como se encuentra detallado en el Anexo A de la norma ISO 4787:2010.

Al comparar los errores aleatorios y sistemáticos obtenidos para las micropipetas (*Tabla 6*) con la normativa ISO 8655-2:2002 se encontró que la micropipeta de 1000- μL posee un error aleatorio y sistemático dentro de los errores máximos permisibles ($s_{V,MAX} = 3.0\mu\text{L}$ y $\Delta V_{MAX} = 8.0\mu\text{L}$); sin embargo, es relevante aclarar que previamente se había realizado una corrección en la lectura de -100 μL ; la cual, es recomendable reajustar para posteriores análisis, así como la posterior calibración después de realizar dichos cambios. Para la micropipeta de 5000- μL se encontró que esta posee un error aleatorio y sistemático superior a los máximos permisibles ($s_{V,MAX} = 15.0 \mu\text{L}$ y $\Delta V_{MAX} = 40.0 \mu\text{L}$); revisando las posibles fuentes de error que se detallan en dicha normativa, se encuentra como posible causa de error aleatorio la reutilización de la punta de micropipeta para cada ciclo de lectura -que puede llegar hasta el 4.0%- y esto se confirma al evidenciar un aumento en el error aleatorio conforme el volumen medido aumentaba (a mayor superficie en contacto con el agua, mayor probabilidad de retención de líquido en la punta). Como actividades recomendables a realizar con la micropipeta de 5000- μL se sugiere realizarle un reajuste y no reutilizar las puntas de micropipeta durante el análisis, así como la posterior calibración después de realizar dichos cambios.

3. Validación de la metodología.

a) **Rango y Linealidad (Curva de Calibración).** Al comparar la curva de absorbancia contra un amplio rango de concentración de nitrógeno total (*Figura 13*) con la curva presentada en Holty y Potworowski (1972) -*Figura 8*- se observan formas similares, pero con diferencias significativas. Las absorbancias obtenidas son diferentes debido a que las condiciones de tiempo y temperatura para la Etapa de Desarrollo del Color -Etapa 5- son diferentes en cada procedimiento. Un aspecto relevante para notar es el hecho que el “pico”

obtenido en la curva de Holty y Potworowski (1972) coincide con el reportado, aunque se modificaron la relación de concentraciones entre la brucina y los estándares: Se esperaba que al variar dicha relación (la cual se cuadruplicó) se generaría un desplazamiento de ese “pico” a una concentración de los estándares equivalente al cambio realizado en la cantidad de brucina agregada; esto no sucedió, manteniendo un rango útil -0.2 a 1.33 mg·N/L- similar al registrado previamente por el método 352.1 de la US-EPA -0.1 a 2.0 mg·N/L-. Aunque dicha observación no afecta en el proceso de validación del método, no deja de ser curioso, considerando que aún no es conocido con claridad el mecanismo de la reacción entre los iones nitrato y la brucina.

Los valores de los coeficientes de determinación, R^2 , obtenidos al evaluar las curvas de calibración, ya sea de manera individual o combinada, no son menores a 0.8901, equivalente a un coeficiente de correlación de 0.9435 y un ajuste de los datos con respecto a la ecuación de la línea recta de un 89.01%. Dicha información es suficiente para afirmar que, en el rango validado, las variables de concentración de iones nitrato y absorbancia tienen una correlación lineal positiva.

Al comparar las curvas de calibración entre los métodos de la brucina con y sin la combinación de la digestión oxidativa (y posterior eliminación del exceso de oxidante) -**Figura 14**- es posible notar que la sensibilidad disminuye y existe un aumento en la absorbancia del blanco reactivo. El aumento de la absorbancia del blanco reactivo se debe a la existencia de remanentes de iones persulfato; el cual, es posible corroborar por el efecto generado por la temperatura en la Etapa de Digestión Oxidativa -Etapa 2- (**Figura 16**); en donde, no se altera la sensibilidad del análisis, sino que desplaza la curva de calibración en el eje vertical y de manera paralela. La disminución de la sensibilidad se puede explicar con la presencia de iones bisulfito disueltos en el medio; el cual, se puede corroborar por el efecto generado por el tiempo en la Etapa de Eliminación de Exceso de Oxidante - Etapa 3- (**Figura 17**); en donde, la sensibilidad aumenta conforme el agente reductor desaparece (ya sea por acción con los iones persulfato o por reacción con el oxígeno del aire). La presencia de ambos reactivos simultáneamente puede ser explicada en términos cinéticos; pues, la reacción entre los iones persulfato y los iones bisulfito es lenta

(consideremos que inclusive después de 3 h de reposo durante la Etapa 3, aún no ha reaccionado todo el bisulfito con los iones persulfato).

b) **Selectividad.** A partir de los resultados del estudio selectividad (*Tabla 9*), es necesario realizar un análisis individual, pues cada resultado es diferente:

- Iones hipoclorito (ClO^-), iones fosfato (PO_4^{3-}), iones silicato (SiO_4^{4-}) y iones manganeso heptavalente (Mn^{7+}). Los resultados indican que dichos iones no actúan como interferentes en las concentraciones evaluadas.
- Iones cromo hexavalente (Cr^{6+}). Debido a que no existe interferencia a la mitad de la concentración límite $-0.500 \text{ mg}\cdot\text{Cr}/\text{L}-$, se sugiere determinar la concentración de cromo y diluir la muestra hasta la concentración límite. Cabe destacar que el valor límite establecido para dicho estudio representa la concentración de cromo total; la cual, es aproximadamente 10 veces mayor a la concentración regulada para cromo hexavalente en aguas residuales (NSO 13.49.01, 2009).
- Iones hierro trivalente (Fe^{3+}). Debido a que se reportó interferencias en ambas concentraciones evaluadas, únicamente se puede estimar a partir de las referencias bibliográficas. De Mora (1999) establece que la especie mayoritaria de hierro en el agua de mar es el ion trivalente y debido al pH del medio $-8.2-$, este se encuentra principalmente en forma de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ en suspensión coloidal con una concentración de $3.5 \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1.95 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Fe}/\text{L}$). Kester et al. (1967) mencionan que, debido a las impurezas de las sales utilizadas en la preparación del agua de mar artificial, la concentración de hierro puede llegar a ser cuatro veces mayor ($7.8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{Fe}/\text{L}$) a la concentración presente en el agua de mar natural. Dado que el hierro es sedimentable, se sugiere (ante la duda de presencia de altas concentraciones de hierro) la centrifugación de la muestra seguido de un proceso previo de filtración.
- Iones clorato (ClO_3^-). Dado que los iones clorato poseen un comportamiento oxidante marcado, son análogos estructurales de los iones nitrato y considerando

que se reportaron interferencias en ambas concentraciones evaluadas; en el caso de sospechar la presencia de dicho interferente, se sugiere realizar otra técnica para su determinación, como la cromatografía de iones (Halstead, Edwards, Soracco & Armstrong, 1999).

- c) **Precisión.** El valor obtenido de precisión - $CV = 14.46\%$ - es cercano al valor esperado para un analito a una concentración de 1 mg/kg - $CV = 11\%$ - (AOAC Internacional, 2016) y es posible reducirlo al minimizar la variabilidad en la evaporación de las muestras durante la Etapa de Digestión Oxidativa; debido a que la adición de volumen para diluir hasta 5 mL es un aproximado y esto conlleva a agregar diferentes volúmenes de agua destilada, que no necesariamente diluirán la muestra hasta su volumen original, generando una variabilidad en volumen y por ende, en concentración. Dicha evaporación se podría reducir al utilizar recipientes más herméticos o al disminuir la temperatura de digestión (lo cual, se debe realizar con cuidado debido a que implicaría una disminución en la absorbancia).

Otro elemento que fue observado en este aspecto es la disminución del coeficiente de variación en los análisis de la capacidad de digestión cuando se realizó la determinación de algunas muestras con un tiempo en la Etapa 3 de 27 h (*Tabla 10*); los cuales, se encuentran debajo del valor esperado por la AOAC Internacional, 2016.

También, es importante recordar que la micropipeta de 5000- μL es la más utilizada durante la realización del método, lo que implica que hay una inferencia directa en su error aleatorio en la precisión del análisis. Razón por la cual, la disminución de la precisión puede lograrse al no reutilizar puntas de micropipeta durante el análisis.

- d) **Exactitud y Capacidad de Digestión.** Los valores de recuperación relativa tanto para exactitud como para capacidad de digestión son aceptables en la mayoría de los casos (*Tabla 10*). La única excepción corresponde a la muestra de urea. Considerando que la urea pertenece al grupo de materia orgánica nitrogenada hidrolizable y este en su totalidad representa únicamente un porcentaje menor al 10% del Nitrógeno Orgánico Disuelto (McCarthy et al., 1997), su contribución a la cuantificación de Nitrógeno Total es mínima;

razón por la cual, la variación de su recuperación con respecto a la recuperación de una muestra compuesta por los diferentes componentes que constituyen el Nitrógeno Total (en proporciones similares a las reportadas en los océanos) es despreciable.

4. Estimación de la incertidumbre expandida de la metodología.

La recuperación (en cuya propagación de errores se encuentra la precisión) y la desviación estándar de la concentración determinada (s_{x_0}) presentan mayores aportes como era de esperarse en los errores aleatorios. Para el caso del error sistemático de la metodología, las fuentes de error provienen de los factores de cálculo de recuperación (preparación de la solución compuesta) y dilución; ambos involucran la variable de volumen.

Variables que afectan la concentración de la metodología validada. Al analizar los resultados obtenidos de la estimación de la incertidumbre producto de la modificación de las variables involucradas en tres etapas de la metodología, donde existe un efecto cinético (Etapas 2, 3 y 5), se confirma la observación realizada por Petriconi y Papee (1971); la cual, indica que la temperatura es la variable que genera mayores inconsistencias en el método de la brucina; y consecuentemente, en la metodología validada.

Adicionalmente, se debe tomar en cuenta la variable tiempo, debido a que dicha variable forma parte del efecto cinético y de esta depende el pragmatismo del método en función del tiempo total del análisis. Hasta este momento, el tiempo promedio de realización de todas las etapas del método (omitiendo la preparación de la solución de reserva y soluciones de estándares usadas para la elaboración de la curva de calibración) es de aproximadamente 27 h; lo cual, impide realizar más de tres análisis durante la semana.

El hecho de que se obtuvieron curvas de calibración con una mejor sensibilidad al modificar la variable de tiempo en la Etapa de Eliminación del Exceso de Oxidante -Etapa 3- y en la temperatura de la Etapa de Desarrollo del Color -Etapa 5- indica que es posible mejorar la metodología al encontrar un equilibrio entre dichas variables. Dado que la adición del persulfato, así como su eliminación son los pasos (Etapas 2 y 3) que demandan mayor tiempo en la metodología (20-21 h), se podría considerar reducir el tiempo de digestión (aumentando

la concentración de persulfato que no se ha descompuesto) y aumentar el tiempo de eliminación del exceso de oxidante a una mayor temperatura (utilizando el horno de convección). No se considera práctico modificar la temperatura en la Etapa 5 debido a que dicha etapa es muy sensible a variaciones de temperatura (la variación en un grado centígrado puede generar una dispersión del 3.66% en la concentración final) y existe el riesgo de la formación de catecolina; contribuyendo a la absorbancia total del análisis.

CONCLUSIONES.

Con base al objetivo principal del presente trabajo de graduación, de los resultados obtenidos, de su análisis teórico y discusión, es posible concluir lo siguiente:

- Se ha logrado desarrollar una metodología para la determinación de nitrógeno total en agua de mar utilizando la técnica de digestión oxidativa con persulfato de potasio alcalino -a 90 °C y 16 h- (seguida de una eliminación del exceso de oxidante con bisulfito de sodio por 3 h a temperatura ambiente) y el método de brucina, con un desarrollo del color de 1 h 30 min a temperatura ambiente.
- Se calibraron los instrumentos de medición asociados al análisis para las variables de masa y volumen; siendo los instrumentos de medición de volumen los que obtuvieron errores sistemáticos significativos (al ser comparados los errores máximos permisibles de las normativas ISO 1042:1998 e ISO 8655-2:2002); provocando un error sistemático considerable en la elaboración de las soluciones estándares (CV entre 9 al 12%).
- Se validó la metodología desarrollada para la determinación de nitrógeno total en agua mar con los siguientes parámetros:
 - Rango lineal de trabajo: 0.20 – 1.33 mg·N/L.
 - Límite de cuantificación: 0.20 mg·N/L.
 - Selectividad: No se observa interferencias (diferencias significativas con respecto a una solución control) de iones hipoclorito (hasta 1.111 mg·Cl/L), iones fosfato (hasta 15.000 mg·P/L), iones silicato (hasta 0.700 mg·Si/L), iones cromo hexavalente (hasta 0.500 mg·Cr/L) y iones manganeso heptavalente (hasta 2.000 mg·Mn/L).
 - Precisión: Coeficiente de variación de 14.4%.
 - Exactitud: Recuperación relativa de adición de 78.5%.
- Se determinó la capacidad de digestión para compuestos inorgánicos y orgánicos nitrogenados obteniendo una recuperación relativa de adición aceptable de (96.2±7.4)% para nitrito de sodio, (86.7±9.7)% para cloruro de amonio, (79.4±7.3)% para clorhidrato de glucosamina,

(74.6±9.1)% para clorhidrato de tiamina, (85.2±8.0)% para indol-3-acetato de potasio y (97.4±17.4)% para metilcobalamina. Dichos resultados representan a un amplio rango de compuestos nitrogenados, asimilables dentro del ciclo del nitrógeno, que pueden ser analizados a través de dicha metodología.

- Se estimó la incertidumbre expandida del análisis para la muestra compuesta (utilizada para el estudio de precisión y exactitud), reportando un resultado de (9.4±3.5) mg·N/L. La variable de volumen (en los factores de dilución y recuperación) es la que aportó el error sistemático del análisis. Los factores de la concentración determinada por el ajuste de mínimos cuadrados (c_0) y recuperación (precisión de la muestra compuesta y muestra de blanco reactivo) son los que brindaron un mayor aporte en el error aleatorio del análisis.
- Las Etapas de Digestión Oxidativa, Eliminación del Exceso de Oxidante y Desarrollo del Color son dependientes de las variables cinéticas de temperatura y tiempo; las cuales, optimizadas adecuadamente, pueden aumentar la precisión del análisis y aumentar la sensibilidad. Es necesario, por tanto, realizar un estudio de análisis que complemente dicho trabajo de graduación.

RECOMENDACIONES.

Con la intención de enriquecer el conocimiento generado por la metodología validada, se recomienda realizar las siguientes actividades:

- Reajustar y calibrar nuevamente las micropipetas de 1000- μ L y 5000- μ L. A partir de los datos obtenidos, calcular nuevamente los errores sistemáticos atribuidos a la variable de volumen y repetir la validación.
- En la medida de lo posible, reducir la reutilización de las puntas de micropipeta para el análisis. Este aspecto puede influir negativamente en el costo total del análisis. Considerar evaluar si hay una diferencia significativa en los volúmenes pipeteados después de un proceso de lavado y secado (particularmente para las puntas de micropipetas de 5000- μ L).
- Realizar un estudio más exhaustivo para determinar la concentración límite en donde los iones hierro trivalente (Fe^{3+}) no actúan como interferentes. Evaluar la realización de procesos preliminares de centrifugación y filtración de muestras contaminadas con hierro.
- Realizar un estudio más detallado de la dispersión de volúmenes de muestras producto de la evaporación del agua en la Etapa de Digestión Oxidativa. Probar dicha dispersión utilizando viales ajustados con cinta de teflón o tubos de ensayo con tapón esmerilado.
- Realizar pruebas de capacidad de digestión para compuestos nitrogenados industriales como azocompuestos y nitrocompuestos.
- Realizar un estudio para la optimización del método al variar las variables de temperatura y tiempo en las Etapas de Digestión Oxidativa y Eliminación del Exceso de Oxidante. Considerar en esta actividad, un control de temperatura ambiente más estricto para la Etapa de Desarrollo del Color.
- Evaluar la variabilidad en la respuesta de análisis debido al cambio de la salinidad de la muestra; dicha actividad, puede expandir las matrices que la metodología puede analizar a aguas provenientes de estuarios, zonas en donde existe una mezcla entre agua de mar con agua dulce y hay mayores focos de contaminación (por ejemplo, puntos de descarga de aguas residuales).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Andrade, J.M. & Estévez-Pérez, M.G. (2014) Statistical comparison of the slopes of two regression lines: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 838. 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.057>.
- AOAC International (2016) Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. En *AOAC Official Methods of Analysis*. Disponible en <http://www.aoac.org>.
- APHA, 1999. *Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition*.
- ASTM E898-88 (2013) Standard test method of testing top-loading, direct-reading laboratory scales and balances.
- Atkins, P. & de Paula, J. (2006) *Physical Chemistry. Eight Edition*. New York: WH Freeman and Company.
- Bronk, D.A., Glibert, P.M. & Ward B.B. (1994). Nitrogen uptake, dissolved organic nitrogen release, and new production. *Science*, 265, 1843-1846. <https://doi.org/10.1126/science.265.5180.1843>.
- Cheronis, N.D., Entrikin, J.B., Hodnett, E.M. (1965) *Semimicro qualitative organic analysis. The systematic identification of organic compounds*. (p. 402) New York: Interscience Publishers.
- Christian, G.D. (2009) *Química Analítica. Sexta edición* (pp. 457-521). México, D.F.: McGraw-Hill/ Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Cooper, L.H.N. (1937). Oxidation-reduction potential in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 22 (1), 167-176. <https://doi.org/10.1017/S0025315400011929>.
- D'Elia, C.F., Steudler, P.A., & Corwin, N. (1977). Determination of total nitrogen in aqueous samples using persulfate digestion. *Limnology and Oceanography*, 22(4), 760-764. <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.4.0760>.

- De Leeuw, J.W. & Largeau, C. (1993) A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their roles in kerogen, coal, and petroleum formation. En Engel M.H., Macko S.A. (Eds) *Organic Geochemistry. Topics in Geobiology, Vol. 11*. Boston: Springer.

- De Mora, S.J. (1999). The oceanic environment. En Harrison, R.M. (Ed.). *Understanding our environment. An introduction to environmental chemistry and pollution. Third edition* (pp. 139-198). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

- Ellison, S.L.R. & Williams, A. (2012) *EURACHEM / CITAC guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement. Third edition*. Disponible en <http://www.eurachem.org>.

- Fisher, F.L., Ibert, E.R. & Beckman H.F. (1958) Inorganic nitrate, nitrite or nitrate-nitrite. Rapid colorimetric determination of microgram quantities in aqueous solution. *Analytical Chemistry*, 30(12), 1972-1974. <https://doi.org/10.1021/ac60144a027>.

- Gmelin, L. (1866) *Hand-book of Chemistry. Vol XVII. Organic Chemistry. Vol XI*. (pp. 358-360) London: Harrison and Sons.

- Goulden, P.D. & Anthony D.H.J. (1978) Kinetics of uncatalyzed peroxydisulfate oxidation of organic material in fresh water. *Analytical Chemistry*, 50(7), 953-958. <https://doi.org/10.1021/ac50029a032>.

- Halstead, J.A., Edwards, J., Soracco, R.J., Armstrong, R.W. (1999) Potential for chlorate interference in ion chromatographic determination of total nitrogen in natural waters following alkaline persulfate digestion. *Journal of Chromatography A*. 857(1-2), 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00757-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00757-8)

- Hammerl, A. & Klapötke, T.M. (2011) Nitrogen: Inorganic chemistry. En Scott, R.A. (Ed-in-chief) *Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry*. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0147>.

- Hansen, H.P., & Koroleff, F. (1999). Determination of nutrients. En Grasshoff, K., Kremling, K., & Ehrhardt, M. *Methods of seawater analysis. Third, completely revised and extended edition* (pp. 159-205). Weinheim: Wiley-VCH.

- Hoegh-Guldberg, O. & Dove, S. (2008) Primary production, nutrient recycling and energy flow through coral reef ecosystems. En Hutchings, P., Kingsford, M. & Hoegh-Guldberg O. (Eds.) *The great barrier reef. Biology, environment and management* (pp. 59-73). Collingwood: CSIRO Publishing.
- Holmes, H.L. (1950) The strychnos alkaloids. En Manske, R.H.F. & Holmes, H.L. (Eds.) *The Alkaloids. Chemistry and Physiology. Volume I* (pp. 375-500) New York: Academic Press, Inc. Publishers.
- Holty, J.G. & Potworowski, H.S. (1972) Brucine analysis for high nitrate concentrations. *Environmental Science & Technology*. 6(9), 835-837. <https://doi.org/10.1021/es60068a006>.
- Huang, X.L. & Zhang, J.Z. (2009) Neutral persulfate digestion at sub-boiling temperature in an oven for total dissolved phosphorus determination in natural waters. *Talanta*. 78(3), 1129-1135. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.029>.
- *ISO/TR 20461* (2000) Determination of uncertainty for volume measurements made using the gravimetric method.
- *ISO 1042:1998*. Laboratory glassware - One-mark volumetric flasks (Third revision).
- *ISO 3696:1987*. Water for analytical laboratory use -- Specification and test methods.
- *ISO 4787:2010*. Laboratory glassware -- Volumetric instruments -- Methods for testing of capacity and for use.
- *ISO 8655-2:2002*. Piston-operated volumetric apparatus - Part 2: Piston pipettes.
- *ISO 8655-6:2002*. Piston-operated volumetric apparatus -- Part 6: Gravimetric methods for the determination of measurement error.
- *ISO 9000:2015*. Quality management systems - Fundamentals and vocabulary.
- Jenkins, D. (1968). The differentiation, analysis and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters" En Baker, R. A. (Ed.). *Trace inorganics in water* (pp. 267-271). *Advances in Chemistry Series 73*. Washington, D.C.: American Chemical Society.

- Jenkins, D. & Medsker, L.L. (1964). Brucine method for determination of nitrate in ocean, estuarine, and fresh waters. *Analytical Chemistry*, 36(3), 610–612. <https://doi.org/10.1021/ac60209a016>.
- Keil, R.G. & Kirchman, D.L. (1991) Contribution of dissolved free amino acids and ammonium to the nitrogen requirements of heterotrophic bacterioplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 73, 1-10. <https://www.jstor.org/stable/24825387>.
- Kester, D.R., Duedall, I.W., Connors, D.N. & Pytkowicz, R.M. (1967) Preparation of artificial seawater. *Limnology and Oceanography*, 12(1), 176-179. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.1.0176>.
- Kolthoff, I.M. & Miller, I.K. (1951) The Chemistry of Persulfate. I. The Kinetics and Mechanism of the Decomposition of the Persulfate Ion in Aqueous Medium. *Journal of the American Chemical Society*, 73(7), 3055-3059. <https://doi.org/10.1021/ja01151a024>.
- Kragten, J. (1994) Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst*, 119, 2161-2165. <http://dx.doi.org/10.1039/AN9941902161>.
- Lauwaars, M. (2005) Methods validation: AOAC's three validation systems. En De Bievre, P. & Günzler, H. (Eds.) *Validation in chemical measurement* (pp. 163-166). Weinheim: Springer Berlin Heidelberg New York.
- Levitus, S., Conkright, M.E., Reid, J.L., Najjar R.G. & Mantyla A. (1993) Distribution of nitrate, phosphate and silicate in the world oceans. *Progress in Oceanography*, 31(3), 245-273. [https://doi.org/10.1016/0079-6611\(93\)90003-V](https://doi.org/10.1016/0079-6611(93)90003-V).
- Magnusson, B. & Örnemark, U. (2014) *EURACHEM guide: The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics. Second edition*. Disponible en <http://www.eurachem.org>.
- Masini, J., Aragon, S. & Nyasulu, F. (1997) Electrochemistry of brucine. 2. The brucine-based determination of nitrate. *Analytical Chemistry*, 69(6), 1077-1081. <https://doi.org/10.1021/ac960067y>.

- McCarthy, M. D., Pratum, T., Hedges, J. I., & Benner, R. (1997). Chemical composition of dissolved organic nitrogen in the ocean. *Nature*, 390(November), 150–154. <https://doi.org/10.1038/36535>.
- Miller, J.N. & Miller, J.C. (2010) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Sixth edition* (pp. 31-34, 43-44, 110-151). Gosport: Pearson Education Limited.
- Müller, T.J. (1999). Determination of salinity. En Grasshoff, K., Kremling, K., & Ehrhardt, M. *Methods of seawater analysis. Third, completely revised and extended edition* (pp. 41-73) Weinheim: Wiley-VCH.
- Noll, Ch.A. (1945) Determination of nitrate in boiler water by brucine reagent. *Analytical Chemistry*, 17(7), 426-428. <https://doi.org/10.1021/i560143a007>.
- NSO 13.07.01:08. Norma Salvadoreña Obligatoria. Agua, agua potable. Segunda actualización.
- NSO 13.49.01:09. Norma Salvadoreña Obligatoria. Agua, aguas residuales descargadas a un cuerpo receptor.
- Nydahl, F. (1978) On the peroxodisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate. *Water Research*, 12(12), 1123-1130. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90060-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90060-X).
- ONU (2015) A/70/L.1. Asamblea General. *Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible*. Versión en español.
- ONU (2017) A/RES/71/312. Asamblea General. Resolución 71/312. *Nuestros océanos, nuestro futuro: llamamiento a la acción*. Versión en español.
- Patnaik, P. (2002) *Handbook of Inorganic Chemicals*. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Petriconi, G.L. & Papee, H.M. (1971) On routine colorimetric determination of trace nitrates, by brucine, in the presence of chloride. *Water, Air, & Soil Pollution*, 1(1), 42-49. <https://doi.org/10.1007/BF00280778>.
- Piccardi, G. & Legittimo, P.C. (1977) Observations on the reaction between nitric acid and brucine. *Analytica Chimica Acta*, 91, 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)93674-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)93674-8).

- Raimbault, P., García, N. & Cerutti, F. (2008) Distribution of inorganic and organic nutrients in the South Pacific Ocean - evidence for long-term accumulation of organic matter in nitrogen-depleted waters. *Biogeosciences*, 5, 281-298. <https://doi.org/10.5194/bg-5-281-2008>.
- Redfield, A.C. (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 46(3), 230A, 205-221. <http://www.jstor.org/stable/27827150>.
- Sigma-Aldrich (2016) *Safety Data Sheet 237868. Brucine sulfate heptahydrate. Version 6.0.*
- Sigma-Aldrich (2017) *Safety Data Sheet 414891. Cadmium. Version 6.1.*
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. *Principios de Análisis Instrumental. Sexta edición* (pp. 336-366). México, D.F.: Cengage Learning Editores, S.A. de C.V.
- Smart, M.M., Reid, F.A. & Jones, J.R. (1981). A comparison of a persulfate digestion and the Kjeldahl procedure for determination of total nitrogen in freshwater samples. *Water Research*, 15, 919-921. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(81\)90148-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(81)90148-2).
- "Standard atomic weights (2001)" y "Physical Constants of Organic Compounds" en Lide, D.R., ed. (2005) *CRC Handbook of Chemistry and Physics. 85th edition*. Boca Raton: CRC Press LLC.
- US-EPA (1971) *Method 352.1: Nitrogen, nitrate (colorimetric, brucine) by spectrophotometer.*
- US-EPA (1993) *Method 351.2, Revision 2.0: Determination of total Kjeldahl nitrogen by semi-automated colorimetry.*
- US-EPA & The Ocean Conservancy (2006). *Volunteer Estuary Monitoring. A methods manual. Second edition.*
- Valderrama, J.C. (1981) The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10(2), 109-122. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(81\)90027-X](https://doi.org/10.1016/0304-4203(81)90027-X).
- Vanýsek, P. (2005) "Electrochemical Series" en Lide, D.R., ed. (2005) *CRC Handbook of Chemistry and Physics. 85th edition*. Boca Raton: CRC Press LLC.

- Vollenweider, R.A., Giovanardi, F., Montanari, G. & Rinaldi, A. (1998). Characterization of the trophic conditions of marine coastal waters with special reference to the NW Adriatic Sea: proposal for a trophic scale, turbidity and generalized water quality index. *Environmetrics*, 9, 329-357. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-095X\(199805/06\)9:3%3C329::AID-ENV308%3E3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-095X(199805/06)9:3%3C329::AID-ENV308%3E3.0.CO;2-9).
- Zehr, J.P. & Ward, B.B. (2002) Nitrogen cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1015-1024. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1015-1024.2002>.

ANEXO A.

Procedimiento estándar operativo de la metodología validada.

“Determinación de nitrógeno total en agua de mar, usando predigestión oxidativa con persulfato alcalino, por el método de brucina”

A. Alcance y aplicación.

- Este método cubre la determinación de las especies químicas nitrogenadas, oxidables con persulfato alcalino, presentes en agua de mar.
- El método está definido para un rango comprendido entre 0.20 a 1.33 mg·N/L (aplicando las correcciones de concentración por propagación de error sistemático en la elaboración de las soluciones estándares).

B. Resumen del método.

Este método está basado en la digestión oxidativa de las especies químicas nitrogenadas del agua de mar con iones persulfato en medio alcalino a temperaturas inferiores a ebullición para formar iones nitrato. Posteriormente, los iones nitrato reaccionan con el sulfato de brucina en una solución de ácido sulfúrico diluido a temperatura ambiente. El color del complejo obtenido es medido a 410 nm. El control de la temperatura ambiente para la formación del color es extremadamente crítico.

C. Selectividad.

- No se observa interferencias en presencia de iones hipoclorito (evaluado hasta una concentración de 1.111 mg·Cl/L), iones fosfato (hasta 15.000 mg·P/L), iones silicato (hasta 0.700 mg·Si/L), iones cromo hexavalente (hasta 0.500 mg·Cr/L) y iones manganeso (hasta 2.000 mg·Mn/L)
- Los iones hierro trivalente generan una interferencia positiva, se estima que dicho efecto es despreciable a concentraciones inferiores a 1.95 µg·Fe/L. La filtración de la muestra reduce la presencia de hierro trivalente (en forma de hidróxido férrico coloidal) en la muestra.

- Agentes oxidantes fuertes pueden causar interferencia. Dicha metodología no es capaz de discernir entre iones clorato y iones nitrato (producto de la digestión oxidativa).

D. Aparatos y materiales.

- Espectrofotómetro UV-VIS previamente encendido para su uso de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- Cubeta de cuarzo (camino óptico de 1-cm).
- Micropipetas de 1000- μ L y 5000- μ L (con sus respectivas puntas) previamente calibradas y ajustadas.
- Horno de convección ajustado a la temperatura de digestión con anticipación.
- Balanza analítica calibrada y previamente encendido para su uso de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- Cámara de extracción de gases.
- Balones volumétricos de 50-mL y 100-mL.
- Viales de vidrio de 40-mL.
- Recuadros de papel aluminio (3 x 3 pulgadas).
- Aros de alambre de amarre (con un diámetro similar al de los viales de vidrio).
- Recipiente metálico de fondo plano para ubicar los viales en el proceso de digestión.
- Placa calefactora (Hot plate).
- pH metro previamente calibrado.
- Material y equipo para filtración (en caso de ser necesario).

E. Reactivos.

- Agua destilada (ISO 3696:1987, Grado 3).
- Ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4 .

- Agua de mar artificial. Pesar (sales anhidras y previamente secadas) 23.926 g de cloruro de sodio (NaCl), 4.008 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4), 0.677 g de cloruro de potasio (KCl), 0.196 g de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), 0.098 g de bromuro de potasio (KBr), 0.026 g de ácido bórico (H_3BO_3) y 0.003 g de fluoruro de sodio (NaF). Adicionalmente, se elaboran

soluciones (dichas soluciones deben estandarizarse previamente por titulación de Mohr) al 0.1 M de cloruro de estroncio (SrCl_2), 1.0 M de cloruro de magnesio (MgCl_2) y 1.0 M de cloruro de calcio (CaCl_2); posteriormente, se agregan dichas soluciones a la mezcla en un volumen equivalente a 0.05327 mol de MgCl_2 , 0.01033 mol de CaCl_2 y 0.00009 mol de SrCl_2 . Disolver la mezcla en agua destilada a 900 mL, ajustar el pH de la mezcla a 8.2 y aforar hasta 1 L. Esta solución puede preservarse con unas gotas de cloroformo y es estable por varios meses.

- Solución de persulfato alcalino ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.185 M + NaOH 0.375 M). Se pesan 2.0 g de persulfato de potasio y 0.6 g de hidróxido de sodio y se disuelven en 40 mL de agua destilada en un baño de agua caliente con una temperatura entre 70-80 °C. Esta solución no debe ser almacenada y debe ser preparada cada vez que se realiza el análisis. Para recristalizar el persulfato de potasio, se disuelven 16 g del reactivo en 100 mL de agua pura entre 70-80 °C. Se enfría la solución transparente a aproximadamente 0 °C y se filtra. Se seca la sal recristalizada en un desecador sobre cloruro de calcio (CaCl_2) anhidro. La recuperación es de aproximadamente 80%
- Solución de bisulfito de sodio (0.25 g/mL). Se pesan 10.0 g de bisulfito de sodio y se disuelven en 40 mL de agua destilada. Puede utilizarse un baño de agua caliente para acelerar su disolución. Esta solución no debe ser almacenada y debe ser preparada cada vez que se realiza el análisis.
- Solución de brucina (1%). Se pesa 0.4 g de sulfato de brucina heptahidratado (Sigma-Aldrich 237868) en 40 mL de agua destilada en un baño de agua a ebullición. En caso de preparar más solución y guardarla, este puede ser almacenada en recipientes de vidrio ámbar en refrigeración a 5 °C y es estable por varios meses (el color rosado que pueda desarrollarse no afecta el desempeño del reactivo en el análisis).
- Solución de reserva (1000 mg·N/L). Se pesa 0.7218 g de nitrato de potasio anhidro (KNO_3) y se diluye a 100 mL de agua destilada en un balón volumétrico. Se preserva con 2 mL de cloroformo por litro. Esta solución es estable por al menos seis meses.

- Solución de control de calidad (0.75 mg·N/L). Primero, se elabora una solución intermedia de 15 mg·N/L, diluyendo 0.75 mL de la solución de reserva hasta 50 mL (usando un balón volumétrico) en agua de mar artificial. . Posteriormente, se disuelve 5.0 mL de la solución intermedia y se disuelve hasta 100 mL (usando un balón volumétrico) en agua de mar artificial.
- Solución compuesta (mezcla de materiales de referencia certificados, concentración de 10 mg·N/L). Se disuelven, en agua de mar artificial, 0.5 mL del Material Certificado de Referencia de iones nitrato (Merck 1.19811.0500, 1000-mg·N/L) y 0.5 mL del Material Certificado de Referencia de Nitrógeno Kjeldahl (AccuStandard WC-TKN-10X-1, 1000-mg·N/L) hasta 100 mL (usando un balón volumétrico).

F. Colecta de muestra, preservación y manejo.

El análisis debe ser realizado tan pronto como sea posible. Si el análisis puede ser realizado en las próximas 24 h, la muestra debe ser preservada por refrigeración a 4°C. Cuando las muestras serán almacenadas por más de 24 h. estas deben ser preservadas con ácido sulfúrico (2 mL de ácido sulfúrico concentrado H₂SO₄ por litro de muestra) y refrigeradas.

G. Procedimiento.

- Elaboración de las soluciones de los estándares.
 - Se elaboran soluciones estándares intermedias de concentraciones de 50, 20 y 10 mg·N/L: Se miden 2.5, 1.0 y 0.50 mL, respectivamente, de la solución de reserva y disolviendo en agua de mar artificial hasta un volumen de 50 mL, usando un balón volumétrico.
 - Posteriormente, se elaboran soluciones de 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 y 1.50 mg·N/L utilizando las soluciones estándares intermediarias, de acuerdo con la distribución dada en la **Tabla A**, disolviendo en agua de mar artificial hasta un volumen de 100 mL (usando un balón volumétrico). Evitar utilizar dichos estándares si poseen un tiempo de almacenamiento mayor a un mes.

Tabla A. Distribución de volumen requerido y estándar intermediario necesario para la elaboración de las soluciones estándares en 100 mL de agua de mar artificial.

N.º	Concentración Estándar	Volumen Requerido	Estándar Intermediario
1	0.25 mg·N/L	2.50 mL	10 mg·N/L
2	0.50 mg·N/L	5.00 mL	10 mg·N/L
3	0.75 mg·N/L	3.75 mL	20 mg·N/L
4	1.00 mg·N/L	5.00 mL	20 mg·N/L
5	1.25 mg·N/L	2.50 mL	50 mg·N/L
6	1.50 mg·N/L	3.00 mL	50 mg·N/L

- Preparación de las muestras. Las muestras son filtradas -en caso de ser necesario- para eliminar material particulado suspendido o reducir su turbidez. En caso de trabajar con una muestra por primera vez, es sugerible medir su salinidad para ajustar la salinidad de los estándares de la curva de calibración a la salinidad de la muestra. En caso de ser necesaria la dilución de las muestras, esta se realiza con agua de mar artificial.
- Digestión oxidativa. En un vial de vidrio de 40 mL, se agrega 1 mL de solución de persulfato alcalino a 5 mL de muestra –o su respectiva disolución-; inmediatamente, se sellan los viales con recuadros de papel aluminio (3 x 3 pulgadas) y se distribuyen en el recipiente metálico (los viales son separados usando aros metálicos elaborados a partir de alambre de amarre, como se muestra en la *Imagen A*) a introducir en el horno de convección. Ubicar el soporte metálico (con las muestras, estándares, blancos reactivos y controles de calidad) dentro del horno de convección por 16 h a 90 ± 1 °C.
- Eliminación del exceso de oxidante. Retirar las muestras del horno de convección y dejar enfriarse por unos minutos. Evaluar y restaurar el volumen (debido a las pérdidas por evaporación) de los viales hasta 5 mL. Posteriormente, agregar 1 mL de la solución de bisulfito de sodio y dejar reposar a temperatura ambiente por 3 ± 0.5 h.

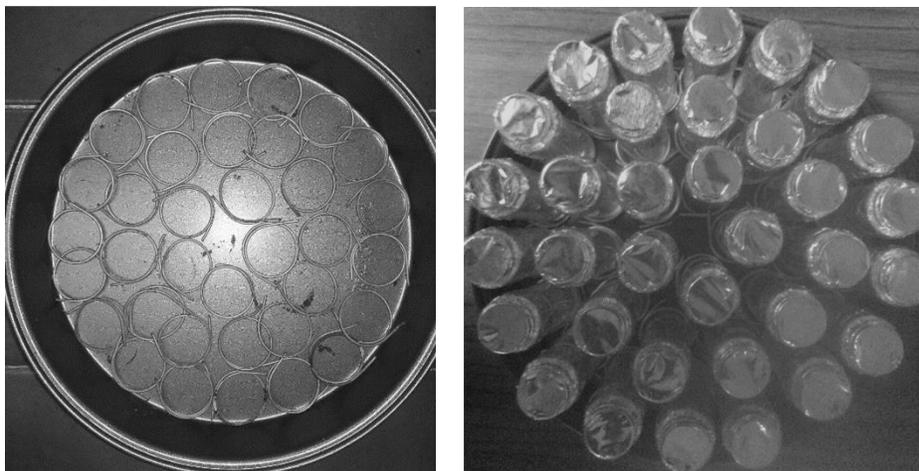


Imagen A. Izquierda. Distribución de los aros metálicos en el recipiente de fondo plano previo a la ubicación de los viales sellados con los recuadros de papel aluminio. **Derecha.** Vista de la distribución de los viales con muestras, soluciones estándares, blancos reactivos y controles de calidad para su ubicación dentro del horno de convección para la etapa de digestión oxidativa.

- Método de la brucina (Cuantificación). En una cámara de extracción de gases, se añade 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, al vial con la muestra previamente digerida y reducida, y se agitó para eliminar el exceso de iones sulfito como dióxido de azufre. Después, se añadió 1 mL del reactivo de brucina y, lentamente, 4 mL de ácido sulfúrico concentrado; se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente por 1 h 30 min (en la medida de lo posible, dicha temperatura no debe variar más de 1 °C durante ese tiempo). Posteriormente, se realiza la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 410 nm, usando una cubeta de cuarzo con un camino óptico de 1-cm. Entre la medida de cada una de las muestras, se realiza un lavado de la cubeta de cuarzo -cuatro veces- con agua destilada.

H. Cálculos.

- Se prepara una curva de calibración y se realiza el ajuste de mínimos cuadrados (preferentemente ponderados, durante el proceso de verificación) para obtener la ecuación de la línea recta que describe dicha curva.
- A partir de dicha ecuación, se obtiene el valor de la concentración de la muestra en la cubeta de cuarzo, c_0 , al sustituir la absorbancia promedio de las muestras.

- Se determina la concentración de nitrógeno total utilizando la siguiente ecuación:

$$c_{TPN} = c_o \times d \times (R)^{-1}$$

Donde d corresponde al factor de dilución y R a la recuperación relativa de adición.

I. Control de calidad (Criterios de aprobación o rechazo).

- Se elabora una curva de calibración cada vez que sea ejecutada esta metodología. Se considerará aceptable un coeficiente de determinación, $R^2 \geq 0.90$. La curva de calibración tiene que tener por lo menos seis estándares más la muestra de blanco reactivo (agua de mar artificial).
- Realizar la evaluación de las muestras por triplicado. Evaluar la presencia de datos anómalos con el Test de Grubbs; de haber datos anómalos, repetir el análisis de dicha muestra.
- Verificar la curva de calibración utilizando una solución de control (0.75 mg·N/L) que será analizada, por triplicado, junto con las muestras, estándares y blanco de reactivo. Se calculará la recuperación relativa de adición y se considerará un valor aceptable si la solución de control posee un valor entre 80 a 110%.
- Verificar la digestión oxidativa utilizando una solución compuesta, que será analizada, por triplicado, junto con las muestras, estándares y blanco de reactivo. Se calculará la recuperación relativa de adición y se considerará un valor aceptable si la solución compuesta posee un valor entre 80 a 110%.

J. Parámetros de desempeño del método (Resultados de validación interna).

- Límite de cuantificación, $LOQ = 0.20$ mg·N/L.
- Precisión. Coeficiente de variación (muestra compuesta), $CV = 14.4\%$.
- Exactitud. Recuperación relativa de adición (muestra compuesta), $R = 78.5\%$.

K. Incertidumbre.

En la validación interna del método se evaluó el efecto de las variables de temperatura y tiempo en las etapas de digestión oxidativa, eliminación del exceso de oxidante y desarrollo del color (método de la brucina) siendo los que generan mayor dispersión la variable de temperatura en la digestión oxidativa, el tiempo en la eliminación del exceso de oxidante y temperatura en el

desarrollo del color. Para los rangos aceptables establecidos para cada una de las variables (definidos en el procedimiento) y junto a las variables descritas en la ecuación, utilizada para el cálculo de la concentración, se estimó la incertidumbre de la metodología; siendo esta de 3.5 mg·N/L para un factor de cobertura $k = 2$.

L. Referencias bibliográficas.

- Hansen, H.P., & Koroleff, F. (1999). Determination of nutrients. En Grasshoff, K., Kremling, K., & Ehrhardt, M. *Methods of seawater analysis. Third, completely revised and extended edition* (pp. 159-205). Weinheim: Wiley-VCH.
- *ISO 3696:1987*. Water for analytical laboratory use -- Specification and test methods.
- Jenkins, D. & Medsker, L.L. (1964). Brucine method for determination of nitrate in ocean, estuarine, and fresh waters. *Analytical Chemistry*, 36(3), 610–612. <https://doi.org/10.1021/ac60209a016>.
- Kester, D.R., Duedall, I.W., Connors, D.N. & Pytkowicz, R.M. (1967) Preparation of artificial seawater. *Limnology and Oceanography*, 12(1), 176-179. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.1.0176>.
- Nydahl, F. (1978) On the peroxodisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate. *Water Research*, 12(12), 1123-1130. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90060-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90060-X).
- Ruiz-Rodriguez, GA. (2018) *Aplicación de la Digestión por Persulfato en la Determinación de Nitrógeno Total por el Método de Brucina para Muestras de Agua Marina*. Trabajo de graduación. San Salvador: Universidad de El Salvador.
- US-EPA (1971) *Method 352.1: Nitrogen, nitrate (colorimetric, brucine) by spectrophotometer*.

ANEXO B.

Resultados crudos (sin analizar) para la calibración de los instrumentos de medición.

Calibración de Balanza Analítica.

Balanza 0008-PEIS. Modelo: PA214C. Marca: OHAUS

Capacidad Máxima: 210-g. Resolución: 0.0001-g

Patrón de masa (g)	Medidas (g)				
0.1000	0.1000	0.1001	0.0999	0.1001	0.1001
	0.0999	0.0999	0.1000	0.0999	0.1000
0.5000	0.5000	0.5000	0.4999	0.5000	0.4999
	0.4999	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000
1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	1.0000	0.9999	0.9999	1.0000	1.0000
100.0000	100.0009	100.0009	100.0009	100.0009	100.0009
	100.0009	100.0008	100.0008	100.0009	100.0009

Calibración de Balón Volumétrico.

Balón Volumétrico PYREX. Serie No. 5642C. Valor Nominal 50-mL.

N.º	m_{lleno} (g)	$m_{vacío}$ (g)	T_{amb} (°C)	T_{agua} (°C)	H (%)	P_a (mbar)
1	155.4522	105.8418	26.4	28.2	69	933.5
2	155.7028	106.0028	26.3	28.1	69	933.5
3	155.6272	105.9575	26.2	27.9	70	933.6
4	155.5335	105.9177	26.2	27.9	70	933.6
5	155.5989	105.9222	26.2	27.8	70	933.6
6	155.6571	105.9736	26.2	27.7	70	933.7
7	155.6591	105.9841	26.2	27.7	70	933.7
8	155.6562	106.0137	26.1	27.6	71	933.7
9	155.5466	106.0075	26.1	27.5	71	933.8
10	155.6530	106.1341	26.1	27.5	71	933.8

Calibración de Balón Volumétrico.

Balón Volumétrico PYREX. Serie No. 5642C. Valor Nominal 100-mL.

N.º	m_{lleno} (g)	m_{vacio} (g)	T_{amb} (°C)	T_{agua} (°C)	H (%)	P_a (mbar)
1	121.9734	22.7790	27.8	28.8	45	932.2
2	121.7443	22.5694	27.1	28.6	47	933.3
3	121.6443	22.5477	27	28.5	47	933.3
4	123.1368	24.2101	26.9	28.5	47	933.5
5	121.5930	22.5163	26.9	28.5	47	933.5
6	121.6160	22.5298	26.9	28.5	47	933.6
7	121.7149	22.5261	26.9	28.5	47	933.7
8	121.7100	22.5184	26.9	28.5	47	933.8
9	121.7433	22.5145	26.9	28.5	47	934.1
10	121.6824	22.5252	26.8	28.4	47	934.2

Calibración de Micropipeta

Micropipeta Pipetman Gilson. Serie: N11264F. Marca: Gilson. Valor Nominal: 1000-µL.

N.º	Volumen Evaluado: 1000 µL					Volumen Evaluado: 750 µL				
	m (g)	T_{amb}	T_{agua}	H	P_a (mbar)	m (g)	T_{amb}	T_{agua}	H	P_a (mbar)
I	20.7409	29.1 °C	28.2 °C	42%	932.4	20.7407	28.4 °C	28.8 °C	44%	932.8
1	21.7461	29.1 °C	28.3 °C	42%	932.4	21.4768	28.4 °C	28.8 °C	45%	932.8
2	22.7506	29.0 °C	28.3 °C	42%	932.4	22.2197	28.3 °C	28.8 °C	45%	932.8
3	23.7560	28.9 °C	28.3 °C	43%	932.6	22.9632	28.3 °C	28.8 °C	45%	932.8
4	24.7624	28.9 °C	28.4 °C	43%	932.6	23.7100	28.2 °C	28.8 °C	45%	932.8
5	25.7689	28.9 °C	28.4 °C	43%	932.6	24.4567	28.2 °C	28.8 °C	45%	932.8
6	26.7685	28.9 °C	28.4 °C	43%	932.6	25.2049	28.2 °C	28.8 °C	45%	932.8
7	27.7718	28.8 °C	28.5 °C	43%	932.6	25.9547	28.2 °C	28.8 °C	45%	932.8
8	28.7764	28.8 °C	28.5 °C	43%	932.6	26.7051	28.2 °C	28.8 °C	45%	933.0
9	29.7826	28.8 °C	28.5 °C	43%	932.6	27.4545	28.1 °C	28.8 °C	45%	933.0
10	30.7887	28.8 °C	28.5 °C	43%	932.6	28.2034	28.1 °C	28.8 °C	45%	933.0
F	30.7793	28.5 °C	28.7 °C	44%	932.7	28.1929	27.8 °C	28.6 °C	45%	933.1

Calibración de Micropipeta

Micropipeta Pipetman Gilson. Serie: N11264F. Marca: Gilson. Valor Nominal: 1000- μ L.

N.º	Volumen Evaluado: 500 μ L					Volumen Evaluado: 300 μ L				
	<i>m</i> (g)	<i>T_{amb}</i>	<i>T_{agua}</i>	<i>H</i>	<i>P_a</i> (mbar)	<i>m</i> (g)	<i>T_{amb}</i>	<i>T_{agua}</i>	<i>H</i>	<i>P_a</i> (mbar)
I	20.7410	28.0 °C	28.9 °C	46%	932.8	20.7403	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
1	21.2406	28.1 °C	29.0 °C	46%	932.8	21.0395	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
2	21.7417	28.1 °C	29.0 °C	46%	932.8	21.3397	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
3	22.2421	28.1 °C	29.0 °C	46%	932.8	21.6395	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
4	22.7434	28.1 °C	29.1 °C	46%	932.8	21.9394	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
5	23.2444	28.1 °C	29.1 °C	46%	932.8	22.2400	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
6	23.7462	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.0	22.5409	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
7	24.2478	28.2 °C	29.1 °C	46%	933.0	22.8420	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
8	24.7502	28.2 °C	29.1 °C	46%	933.0	23.1431	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.2
9	25.2521	28.2 °C	29.1 °C	46%	933.0	23.4446	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.3
10	25.7537	28.2 °C	29.1 °C	46%	933.0	23.7458	28.0 °C	29.0 °C	46%	933.3
F	25.7464	28.1 °C	29.1 °C	46%	933.1	23.7375	27.8 °C	28.9 °C	46%	933.5

Calibración de Micropipeta

Micropipeta Pipetman Gilson. Serie: 029589A. Marca: Gilson. Valor Nominal: 5000- μ L.

N.º	Volumen Evaluado: 5000 μ L					Volumen Evaluado: 3750 μ L				
	<i>m</i> (g)	<i>T_{amb}</i>	<i>T_{agua}</i>	<i>H</i>	<i>P_a</i> (mbar)	<i>m</i> (g)	<i>T_{amb}</i>	<i>T_{agua}</i>	<i>H</i>	<i>P_a</i> (mbar)
I	50.1507	28.7 °C	26.6 °C	47%	933.7	51.2225	29.1 °C	27.0 °C	45%	933.0
1	55.0458	28.7 °C	26.6 °C	47%	933.7	54.8835	29.2 °C	27.0 °C	45%	933.0
2	59.8545	28.7 °C	26.6 °C	47%	933.7	58.5465	29.2 °C	27.0 °C	45%	933.0
3	64.6628	28.8 °C	26.6 °C	47%	933.7	62.3093	29.2 °C	27.0 °C	45%	933.0
4	69.4760	28.8 °C	26.6 °C	46%	933.7	65.9614	29.2 °C	27.0 °C	45%	933.0
5	74.2803	28.8 °C	26.7 °C	46%	933.7	69.6261	29.2 °C	27.1 °C	45%	933.0
6	79.0869	28.8 °C	26.7 °C	46%	933.7	73.2717	29.2 °C	27.1 °C	45%	933.0
7	83.9013	28.8 °C	26.7 °C	46%	933.7	76.9317	29.2 °C	27.1 °C	45%	932.9
8	88.7800	28.8 °C	26.7 °C	46%	933.5	80.5897	29.3 °C	27.1 °C	45%	932.9
9	93.5891	28.8 °C	26.7 °C	46%	933.5	84.2647	29.3 °C	27.1 °C	45%	932.9
10	98.4152	28.8 °C	26.7 °C	46%	933.5	87.9167	29.3 °C	27.2 °C	45%	932.9
F	103.2311	28.9 °C	26.8 °C	46%	933.4	87.8942	29.4 °C	27.3 °C	45%	932.8

Calibración de Micropipeta

Micropipeta Pipetman Gilson. Serie: 029589A. Marca: Gilson. Valor Nominal: 5000- μ L.

N.º	Volumen Evaluado: 2500 μ L					Volumen Evaluado: 1500 μ L				
	<i>m</i> (g)	<i>T_{amb}</i>	<i>T_{agua}</i>	<i>H</i>	<i>P_a</i> (mbar)	<i>m</i> (g)	<i>T_{amb}</i>	<i>T_{agua}</i>	<i>H</i>	<i>P_a</i> (mbar)
I	51.2227	29.5 °C	27.4 °C	44%	932.4	50.1510	29.2 °C	27.6 °C	45%	932.0
1	53.6650	29.5 °C	27.4 °C	44%	932.4	51.6071	29.2 °C	27.6 °C	45%	932.0
2	56.0976	29.5 °C	27.4 °C	44%	932.4	53.0575	29.2 °C	27.6 °C	45%	932.0
3	58.5323	29.5 °C	27.4 °C	44%	932.4	54.5170	29.1 °C	27.6 °C	45%	932.0
4	60.9715	29.5 °C	27.4 °C	44%	932.4	55.9800	29.1 °C	27.6 °C	45%	932.0
5	63.4114	29.5 °C	27.4 °C	44%	932.4	57.4359	29.1 °C	27.6 °C	45%	932.0
6	65.8554	29.5 °C	27.4 °C	44%	932.3	58.8918	29.1 °C	27.6 °C	45%	931.9
7	68.2929	29.5 °C	27.5 °C	44%	932.3	60.3447	29.1 °C	27.6 °C	44%	931.9
8	70.7363	29.5 °C	27.5 °C	44%	932.3	61.8011	29.1 °C	27.6 °C	44%	931.9
9	73.1778	29.5 °C	27.5 °C	44%	932.3	63.2591	29.1 °C	27.6 °C	44%	931.9
10	75.6110	29.5 °C	27.5 °C	44%	932.3	64.7184	29.0 °C	27.6 °C	44%	931.9
F	75.5860	29.3 °C	27.5 °C	44%	932.1	64.6945	28.8 °C	27.6 °C	43%	931.5

Calibración de Micropipeta

Micropipeta Pipetman Gilson. Serie: 029589A. Marca: Gilson. Valor Nominal: 5000- μ L.

Volumen Evaluado: 500 μ L

N.º	<i>m</i> (g)	<i>T_{amb}</i>	<i>T_{agua}</i>	<i>H</i>	<i>P_a</i> (mbar)
I	51.2229	28.8 °C	27.6 °C	44%	931.5
1	51.6913	28.8 °C	27.6 °C	44%	931.5
2	52.1659	28.8 °C	27.6 °C	44%	931.5
3	52.6418	28.8 °C	27.6 °C	44%	931.5
4	53.1196	28.8 °C	27.6 °C	44%	931.5
5	53.5994	28.8 °C	27.6 °C	44%	931.5
6	54.0766	28.7 °C	27.6 °C	44%	931.5
7	54.5544	28.7 °C	27.6 °C	43%	931.5
8	55.0294	28.7 °C	27.6 °C	43%	931.5
9	55.5073	28.7 °C	27.6 °C	43%	931.5
10	55.9837	28.7 °C	27.6 °C	43%	931.5
F	55.9578	28.6 °C	27.6 °C	44%	931.6

ANEXO C.

Resultados crudos (sin analizar) de las curvas de calibración para la validación de la metodología. (El procedimiento de preparación de las soluciones estándares, muestra control y muestra compuesta está detallado en el *Anexo A*)

N.º	c (mg·N/L)	Absorbancia						
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7
1	0.00	0.046	0.034	0.019	0.034	0.124	0.057	0.052
2	0.25	0.078	0.093	0.040	0.067	0.218	0.109	0.093
3	0.50	0.112	0.106	0.068	0.130	0.282	0.134	0.113
4	0.75	0.137	0.190	0.085	0.168	0.487	0.165	0.128
5	1.00	0.234	0.229	0.174	0.220	0.576	0.193	0.161
6	1.25	0.262	0.254	0.244	0.254	0.608	0.252	0.200
7	1.50	0.298	0.327	0.275	0.322	0.712	0.267	0.247

Condiciones de análisis.

- **Curva 1 y 7:** Digestión oxidativa 16 h a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 3 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 1 h 30 min a temperatura ambiente.
- **Curva 2:** Digestión oxidativa 15 h 30 min a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 3 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 1 h 30 min a temperatura ambiente.
- **Curva 3:** Digestión oxidativa 16 h a 85 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 3 h a 50 °C. Desarrollo del color, 1 h 30 min a temperatura ambiente.
- **Curva 4:** Digestión oxidativa 16 h a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 3 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 1 h 30 min a temperatura ambiente.
- **Curva 5:** Digestión oxidativa 16 h a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 3 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 1 h 30 min a 50 °C.
- **Curva 6:** Digestión oxidativa 16 h a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 3 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 2 h 30 min a temperatura ambiente.
- **Curva 7:** Digestión oxidativa 16 h a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 3 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 1 h 30 min a temperatura ambiente.

N.º	c (mg·N/L)	Absorbancia									
		Curva 9		Curva 10		Curva 11			Curva 12		
1	0.00	0.042	0.010	0.070	0.085	0.048	0.043	0.029	0.043	0.048	0.010
		0.023		0.078		0.058	0.072	0.060	0.020	0.043	
2	0.25	0.137		0.154		0.084	0.096	0.135			0.070
3	0.50	0.254		0.266		0.088	0.123	0.181			0.128
4	0.75	0.415		0.401		0.132	0.170	0.186			0.190
5	1.00	0.474		0.393		0.216	0.160	0.187			0.247
6	1.25	–		–		0.218	0.232	0.217			0.300
7	1.50	0.573		0.567		0.343	0.379	0.269			0.360

Condiciones de análisis.

- **Curva 9:** Digestión oxidativa 16 h a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 27 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 1 h 30 min a temperatura ambiente.
- **Curva 10:** Digestión oxidativa 16 h a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 27 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 1 h a temperatura ambiente.
- **Curva 11:** Digestión oxidativa 16 h a 90 °C. Eliminación del exceso de oxidante, 3 h a temperatura ambiente. Desarrollo del color, 1 h 30 min a temperatura ambiente.
- **Curva 12:** Sin etapas de digestión oxidativa y eliminación del exceso de oxidante. Desarrollo del color, 1 h 30 min a temperatura ambiente.

ANEXO D.

Procedimientos de preparación y absorbancias registradas para el estudio de la capacidad de digestión y el estudio de selectividad.

A. Estudio de la Capacidad de Digestión.

- Solución de clorhidrato de glucosamina. Muestra analizada junto con la curva 9. Preparación: Se pesaron 0.3805 g y se disolvieron en 50 mL de agua de mar artificial; después, se tomaron 2.5 mL de la solución previamente preparada y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 mL de agua de mar artificial. Absorbancias registradas: 0.551 // 0.576 // 0.468 // 0.550 // 0.502 // 0.499 // 0.522.
- Solución de clorhidrato de tiamina. Muestra analizada junto con la curva 9. Preparación: Se pesaron 0.1325 g y se disolvieron en 50 mL de agua de mar artificial; después, se tomaron 2.5 mL de la solución previamente preparada y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 mL de agua de mar artificial. Absorbancias registradas: 0.485 // 0.468 // 0.470 // 0.383 // 0.432 // 0.383 // 0.474.
- Solución de cloruro de amonio. Muestra analizada junto con la curva 10. Preparación: Se pesaron 0.0950 g y se disolvieron en 50 mL de agua de mar artificial; después, se tomaron 2.5 mL de la solución previamente preparada y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 mL de agua de mar artificial. Absorbancias registradas: 0.601 // 0.485 // 0.558 // 0.592 // 0.514 // 0.524 // 0.515.
- Solución de indol-3-acetato de potasio. Muestra analizada junto con la curva 10. Preparación: Se pesaron 0.3814 g y se disolvieron en 50 mL de agua de mar artificial; después, se tomaron 2.5 mL de la solución previamente preparada y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 mL de agua de mar artificial. Absorbancias registradas: 0.540 // 0.523 // 0.521 // 0.606 // 0.503 // 0.510 // 0.496.
- Solución de metilcobalamina. Muestra analizada junto con la curva 7. Preparación: Se pesaron 0.9735 g de metilcobalamina al 1% y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 mL de agua de mar artificial. Absorbancias registradas: 0.212 // 0.214 // 0.263 // 0.278 // 0.198 // 0.253 // 0.262.

- Solución de nitrito de sodio. Muestra analizada junto con la curva 10. Preparación: Se pesaron 0.1211 g y se disolvieron en 50 mL de agua de mar artificial; después, se tomaron 2.5 mL de la solución previamente preparada y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 mL de agua de mar artificial. Absorbancias registradas: 0.516 // 0.592 // 0.575 // 0.587 // 0.626 // 0.605 // 0.603.
- Solución de urea. Muestra analizada junto con la curva 9. Preparación: Se pesaron 0.0577 g y se disolvieron en 50 mL de agua de mar artificial; después, se tomaron 2.5 mL de la solución previamente preparada y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 mL de agua de mar artificial. Absorbancias registradas: 0.443 // 0.410 // 0.373 // 0.393 // 0.508 // 0.459 // 0.461.

B. Estudio de selectividad.

- Solución de iones clorato (0.700 y 0.350 mg-ClO₃⁻/L). Muestras analizadas junto con la curva 7. Preparación: Se pesaron 0.2313 g de clorato de potasio (KClO₃) en 15 mL de agua destilada; posteriormente, se toma 1 mL de la mezcla y se disuelve en 15 mL de agua de destilada; después, de dicha mezcla (la más diluida), se tomó 1 y 5 mL de solución intermedia de 15 mg·N/L (preparación descrita en el *Anexo A*) y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 y 0.25 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 y 4.75 mL de solución de control de calidad (0.75 mg·N/L). Absorbancias registradas: 0.171 y 0.173 respectivamente.
- Solución de iones hipoclorito (1.111 y 0.556 mg-Cl/L). Muestras analizadas junto con la curva 7. Preparación: Se diluyó 1 mL de lejía comercial en 15 mL de agua destilada; de dicha mezcla, se tomó 1 y 5 mL de solución intermedia de 15 mg·N/L (preparación descrita en el *Anexo A*) y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 y 0.25 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 y 4.75 mL de solución de control de calidad (0.75 mg·N/L). Absorbancias registradas: 0.156 y 0.142 respectivamente.
- Solución de iones fosfato (15.000 y 7.500 mg-P/L). Muestras analizadas junto con la curva 7. Preparación: Se pesaron 0.6548 g de dihidrogenofosfato de potasio (KH₂PO₄), en 10 mL de agua destilada; de dicha mezcla, se tomó 1 y 5 mL de solución intermedia de 15 mg·N/L (preparación descrita en el *Anexo A*) y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su

análisis, se tomaron 0.5 y 0.25 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 y 4.75 mL de solución de control de calidad (0.75 mg·N/L). Absorbancias registradas: 0.120 y 0.150 respectivamente.

- Soluciones de iones silicato (0.700 y 0.350 mg·Si/L). Muestras analizadas junto con la curva 7. Preparación: Se pesaron 0.1437 g de silicato de sodio (Na_2SiO_3) en 20 mL de agua destilada; de dicha mezcla, se tomó 1 y 5 mL de solución intermedia de 15 mg·N/L (preparación descrita en el *Anexo A*) y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 y 0.25 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 y 4.75 mL de solución de control de calidad (0.75 mg·N/L). Absorbancias registradas: 0.140 y 0.137 respectivamente.
- Solución de iones hierro trivalente (10.000 y 5.000 mg·Fe/L). Muestras analizadas junto con la curva 7. Preparación: Se pesaron 0.7164 g de sulfato férrico, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, en 20 mL de agua destilada; de dicha mezcla, se tomó 1 y 5 mL de solución intermedia de 15 mg·N/L (preparación descrita en el *Anexo A*) y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 y 0.25 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 y 4.75 mL de solución de control de calidad (0.75 mg·N/L). Absorbancias registradas: 0.385 y 0.563 respectivamente.
- Solución de iones cromo hexavalente (1.000 y 0.500 mg·Cr/L). Muestras analizadas junto con la curva 7. Preparación: Se pesaron 0.1269 g de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en 15 mL de agua destilada; posteriormente, se toma 5 mL de la mezcla y se disuelve en 15 mL de agua de destilada; después, de dicha mezcla (la más diluida), se tomó 1 y 5 mL de solución intermedia de 15 mg·N/L (preparación descrita en el *Anexo A*) y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 y 0.25 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 y 4.75 mL de solución de control de calidad (0.75 mg·N/L). Absorbancias registradas: 0.190 y 0.147 respectivamente.
- Solución de iones manganeso heptavalente (2.000 y 1.000 mg·Mn/L). Muestras analizadas junto con la curva 7. Preparación: Se pesaron 0.1363 g de permanganato de potasio (KMnO_4) en 20 mL de agua destilada; de dicha mezcla, se tomó 1 y 5 mL de solución intermedia de 15 mg·N/L (preparación descrita en el *Anexo A*) y se disolvieron en 100 mL de agua de mar artificial; finalmente, para su análisis, se tomaron 0.5 y 0.25 mL de muestra y se mezclaron con 4.5 y 4.75 mL de solución de control de calidad (0.75 mg·N/L). Absorbancias registradas: 0.153 y 0.151 respectivamente.