



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS;  
NUTRIMENTOS EN AGUA DE MAR.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**ROBERTO RODRÍGUEZ JACINTO**



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente      **GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ**

Vocal            **RICARDO RODRÍGUEZ SAENZ**

Secretario      **FELIPE VÁZQUEZ GUTIÉRREZ**

1er. Suplente   **JUAN MANUEL RODRÍGUEZ**

2do. Suplente   **KENNETH RUBIO CARRASCO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

---

**Dr. FELIPE VÁZQUEZ GUTIÉRREZ**  
ASESOR

---

**ROBERTO RODRÍGUEZ JACINTO**  
SUSTENTANTE



## Í N D I C E G E N E R A L

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVO PARTICULAR.....</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo 2 VALIDACIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Significado y uso.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Procedimiento de validación.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Límites de detección.....</b>	<b>6</b>
<b>2.4 Desarrollo y evaluación de métodos.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5 Indicadores de calidad.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5.1 Sesgo.....</b>	<b>8</b>
<b>2.5.2 Precisión.....</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo 3 DESARROLLO DEL ANÁLISIS DE FLUJO DE INYECCIÓN</b>	
<b>(FIA).....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Aplicaciones para el FIA.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Componentes del sistema FIA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 El sistema de transporte.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4 Inyección de la muestras.....</b>	<b>15</b>
<b>3.5 Chemifold.....</b>	<b>16</b>
<b>3.6 Resultados.....</b>	<b>16</b>
<b>3.7 Comparación de algunas características del FIA con respecto</b>	
<b>a HPLC y SFA.....</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo 4 IMPORTANCIA DE LOS ELEMENTOS MICRONUTRIENTES.</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Nitrógeno.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.1 Nitritos.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.2 Nitratos.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.2.1 El ciclo del nitrógeno en el mar.....</b>	<b>22</b>



<b>4.2 Fósforo.....</b>	<b>23</b>
4.2.1 Fósforo disuelto.....	24
4.2.2 Química analítica.....	24
4.2.3 El ciclo del fósforo en el mar.....	25
<b>4.3 Silicio.....</b>	<b>26</b>
4.3.1 Química analítica.....	27
4.3.2 Distribución marina de la sílice disuelta.....	27
<b>Capítulo 5 METODOLOGÍA.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Linealidad del sistema.....</b>	<b>29</b>
5.1.1 Metodología.....	29
5.1.2 Criterio de aceptación.....	29
<b>5.2 Precisión del sistema.....</b>	<b>29</b>
5.2.1 Metodología.....	29
5.2.2 Criterio de aceptación.....	29
<b>5.3 Límite de detección con base en la curva de calibración y la         desviación estandar de regresión.....</b>	<b>30</b>
5.3.1 Metodología.....	30
<b>5.4 Límite de cuantificación con base en la curva de calibración y         la desviación estandar de regresión.....</b>	<b>30</b>
5.4.1 Metodología.....	30
<b>5.5 Especificidad.....</b>	<b>30</b>
5.5.1 Metodología.....	30
5.5.2 Criterio de aceptación.....	30
<b>Capítulo 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>6.1 Nitritos.....</b>	<b>31</b>
6.1.1 Linealidad del sistema.....	31
6.1.2 Precisión del sistema.....	34
6.1.3 Límite de detección.....	35
6.1.4 Límite de cuantificación.....	35
<b>6.2 Nitratos.....</b>	<b>36</b>



---

6.2.1 Linealidad del sistema.....	36
6.2.2 Precisión del sistema.....	38
6.2.3 Límite de detección.....	40
6.2.4 Límite de cuantificación.....	40
6.3 Fósforo.....	41
6.3.1 Linealidad del sistema.....	41
6.3.2 Precisión del sistema.....	43
6.3.3 Límite de detección.....	45
6.3.4 Límite de cuantificación.....	45
6.4 Silicio.....	46
6.4.1 Linealidad del sistema.....	46
6.4.2 Precisión del sistema.....	49
6.4.3 Límite de detección.....	50
6.4.4 Límite de cuantificación.....	50
Discusión.....	51
Capítulo 7 CONCLUSIONES.....	53
Capítulo 8 BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXOS.....	57



## RESUMEN

Debido al gran avance de las técnicas analíticas en el análisis ambiental, la búsqueda de nuevos y mejores métodos de análisis se ha hecho un tópico de suma importancia en nuestros días, para que se cumplan las expectativas de obtener resultados confiables.

Las técnicas automatizadas que se tienen actualmente no son lo suficientemente exactas ni reproducibles, además, acarrear un gran número de errores. El análisis de flujo de inyección (FIA) permite llevar a cabo un sistema de análisis automático total, que comparado con las técnicas manuales, reduce considerablemente el tiempo de análisis obteniendo resultados reproduciblemente satisfactorios.

La perspectiva del siguiente trabajo es realizar la validación de técnicas analíticas para un sistema FIA acoplado a un espectrofotómetro UV / VIS, ya que como se mencionó con anterioridad no se cuenta con un sistema automático estandarizado con las siguientes características: económico, fácil, confiable y rápido para lo cual es necesario contar con evidencia documentada de que el proceso se comporta consistentemente.

Para tal fin se cuantificarán los siguientes parámetros fisicoquímicos: nitritos, nitratos, metasilicatos y ortofosfatos, determinados en agua de mar.



## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

El alto número de muestras ambientales que se analizan en los laboratorios ambientales, hace necesario contar con métodos automatizados de análisis para agua de mar que sean económicos, fáciles, confiables y rápidos, así como, contar con evidencia documentada de que el proceso se comporta consistentemente, demostrando que la capacidad del sistema, satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Por tal motivo el FIA constituye una reciente e importante innovación metodológica en Química Analítica.

Se caracteriza por un fundamento simple, un utillaje barato, un manejo sencillo y cómodo y una gran capacidad para lograr resultados sorprendentes debido a sus características: rapidez, exactitud y precisión. Su extremada versatilidad lo distingue de la mayor parte de las técnicas analíticas. Puede adaptarse con sencillez a todo tipo de necesidades, sin cambios técnicamente complejos y por otra parte hay que resaltar lo fácil que es para un investigador analítico intervenir directamente en su funcionamiento.





### **OBJETIVO GENERAL**

Realizar la validación de técnicas analíticas en agua de mar para un sistema de análisis de flujo de inyección (FIAS) acoplado a un espectrofotómetro UV / VIS.

### **OBJETIVO PARTICULAR**

Describir el procedimiento para validar el sistema FIAS; determinando los siguientes micronutrientes: NITRITOS, NITRATOS, FÓSFORO Y SILICIO, en agua de mar artificial.



## CAPÍTULO 2

### VALIDACIÓN

Debido al gran avance de las técnicas analíticas en el análisis ambiental, la búsqueda de nuevos y mejores métodos de análisis, se ha hecho un tópico de suma importancia en nuestros días que cumplan con una serie de normas para tal fin.

Las técnicas automatizadas con las que se cuenta actualmente no son lo suficientemente exactas ni reproducibles, además de que acarrear un gran número de errores. El FIAS es un sistema modular, que se puede configurar para encontrar una amplia variedad de analitos. Así mismo, permite llevar a cabo un análisis automatizado total, que comparado con las técnicas manuales, reduce considerablemente tiempos de análisis, obteniendo resultados reproduciblemente satisfactorios.

#### 2.1 Significado y uso

La validación es una actividad importante y obligatoria para los laboratorios que están o no, bajo la revisión de agencias regulatorias. Estos laboratorios, producen datos de los cuales el gobierno depende para promulgar leyes y tomar decisiones de interés público. Los ejemplos incluyen datos para apoyar la aprobación de nuevos medicamentos, probar que los medicamentos en el mercado cumplen las especificaciones, asegurarse que se cumplen las leyes ambientales y desarrollar evidencia forense para un juicio. Esto también se extiende a los Sistemas de Gestión de la Información de Laboratorio (LIMS) usados en los laboratorios ambientales. En algunos casos estos sistemas necesitan, ser inter-operables con los Sistemas de Gestión de la Información de Laboratorio Clínico (CLIMS) y con los registros de pacientes, para reportar exposiciones ambientales y pruebas de laboratorio clínicas para medición biológica de exposición al agente estresor. El enorme impacto financiero, legal y social de estas decisiones requiere que el gobierno y el público confíen en los datos de laboratorio. Para asegurar esta confianza, las agencias



del gobierno revisan regularmente a los laboratorios que operan bajo sus reglas para confirmar que estén produciendo datos válidos. La validación del sistema de cómputo usado es parte de esta revisión. La guía E 2066 - 00 descrita en el Sociedad Americana para prueba de materiales (ASTM), está diseñada para ayudar a los usuarios a validar las LIMS y a incorporar el proceso de validación dentro del ciclo de vida de las mismas.

La validación debe de proveer evidencia de pruebas, entrenamiento, auditorias y revisión, responsabilidad administrativa, control de diseño y control de documentación, durante ambos: el desarrollo del sistema y su tiempo de operación<sup>1</sup>.

## **2.2 Procedimiento de validación**

El objetivo de los procedimientos de validación es cuantificar el desempeño de un sistema de análisis o su subsistema en términos de precisión y desviación del método de análisis primario. El usuario debe especificar criterios aceptables de desempeño en precisión y desviación antes de iniciar la validación y estos serán dependientes del uso propuesto para el equipo.

Para los sistemas analizadores usados en certificación de productos, los criterios de precisión del mismo estarán basados directamente en la precisión del Método de Prueba Primario (PTM) y los criterios de desviación en los requerimientos regulatorios y contractuales.

Los criterios de precisión y desviación deben ser desarrollados y propuestos, con base a la experiencia del analista.

El procedimiento de muestra y de producción, es exactamente el mismo por lo tanto llena directamente el objetivo de la validación, ya que los resultados son obtenidos a partir de estas. Para tal caso se deben de tomar en cuenta las siguientes consideraciones: El



material de referencia debe cumplir una composición específica y el principio de medición del sistema es el mismo en todos los casos.

### **2.3 Límite de detección**

Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas<sup>29</sup>.

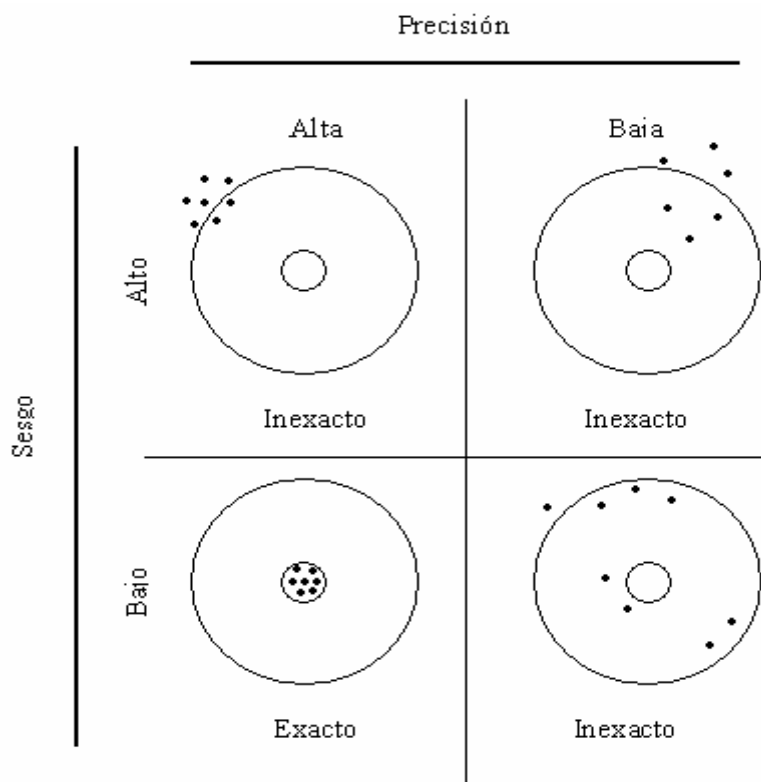
### **2.4 Desarrollo y evaluación de métodos**

Cuando se modifica un método existente con el fin de reunir requisitos especiales, se precisa de un proceso de validación en tres etapas: determinación del sesgo y la precisión para un operador único, análisis de muestras desconocidas preparadas de forma independiente y determinación de la rigurosidad del método.

Para describir el método con una enunciación formal, debería proporcionarse la precisión a partir de una línea recta según la fórmula  $y = mx + b$ ; donde “y” es la respuesta obtenida, “m” la pendiente de la línea, “x” la concentración y “b” la desviación estándar relativa para una concentración = 0.

### **2.5 Indicadores de calidad**

Los principales indicadores de calidad de datos son su sesgo y su precisión, que combinados, expresan su exactitud. De los cuatro resultados posibles, únicamente es exacta la condición de bajo sesgo y alta precisión<sup>14</sup>. La relación entre estos dos términos se muestra en la siguiente figura:

Figura 2.1. Definición de exactitud<sup>8</sup>

Los indicadores auxiliares de calidad de datos son: el límite de detección del método y la representatividad. Esta última se puede relacionar tanto con la propia muestra como con la población muestreada. Un método determinado puede tener un alto grado de exactitud, pero si los resultados no son representativos de la muestra o la muestra no representa a la población, los datos no son de utilidad. La representatividad de la muestra, alcanza su mejor evaluación mediante el análisis de diversas muestras en el mismo lugar o a partir, de una gran cantidad de muestras de diversa procedencia. La representatividad del método se determina de manera óptima mediante la combinación de estudios que utilizan métodos diferentes.



### **2.5.1 Sesgo**

El sesgo, es una medida del error sistemático, contiene dos componentes: uno se deriva del método y el otro, del uso del método en el laboratorio. El sesgo de un método, se mide adecuadamente mediante la realización de estudios comparativos de laboratorio en los que dicho sesgo se define como la diferencia entre el promedio general y el valor conocido (o verdadero). El sesgo de laboratorio, es la diferencia existente entre la media de los resultados del laboratorio y los valores verdaderos, siendo por consiguiente, una combinación de dos sesgos. Se evalúa el sesgo de laboratorios, mediante la valoración de los resultados de adiciones conocidas o por medio del análisis de muestras duplicadas, registrando el signo de las diferencias al calcular la diferencia promedio. De este valor, se sustrae el sesgo del método de un estudio comparativo, para determinar el sesgo debido a las prácticas de laboratorio<sup>8</sup>.

### **2.5.2 Precisión**

La precisión, es una medida del grado de concordancia entre los análisis múltiples de una muestra dada. Se evalúa mediante análisis de réplicas, análisis repetidos de un estándar estable o análisis de adiciones conocidas sobre la muestra. La precisión se especifica por la desviación estándar de los resultados<sup>15</sup>. Si se desea obtener la precisión global de un estudio, hay que analizar muestras duplicadas. En esta valoración se incluyen los errores aleatorios implicados en la toma de muestras, así como los errores en la preparación y análisis de muestra.



### CAPÍTULO 3

#### DESARROLLO DEL ANÁLISIS DE FLUJO DE INYECCIÓN (FIA)

El principio y las ventajas del FIA con aplicación al análisis de muestras de agua de mar, puede demostrarse mejor a través de su desarrollo, así como, en comparación con otras técnicas.

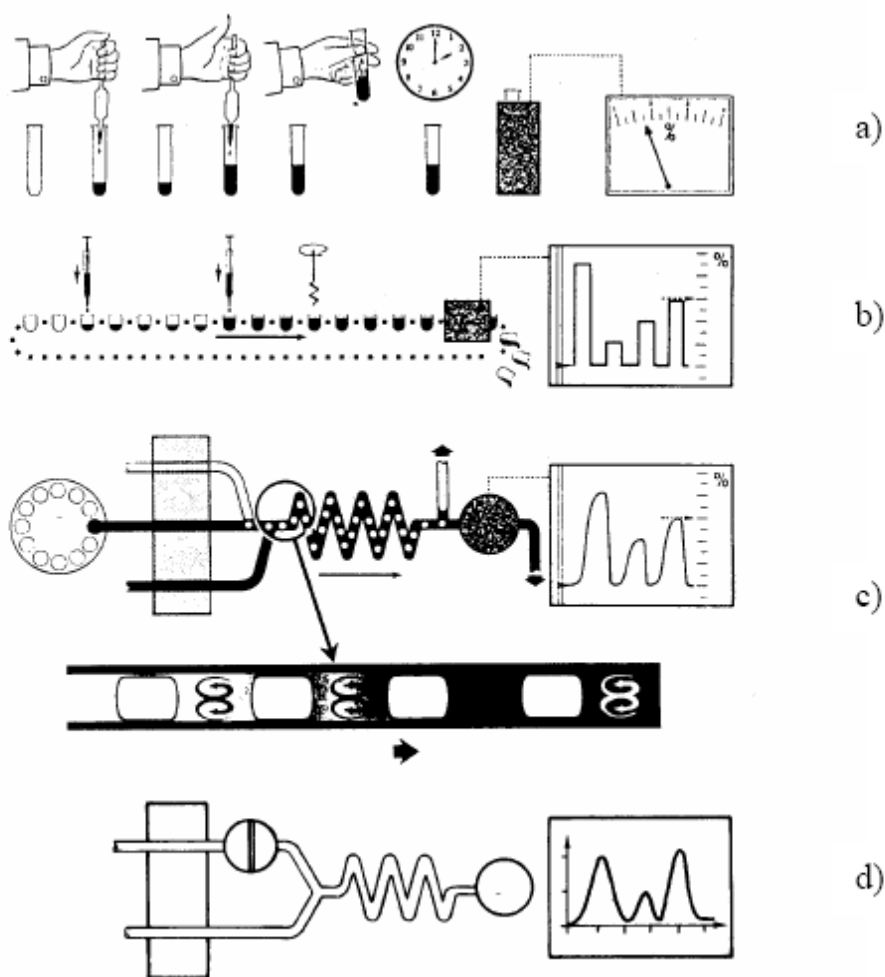


Figura 3.1. Comparación de técnicas FIA con técnicas manuales y otras técnicas automatizadas. a) Operación manual b) Automatización robotizada c) Análisis de flujo segmentado d) Inyección de flujo<sup>6</sup>



En los análisis manuales convencionales, una muestra y reactivo se mezclan y cuando la reacción se completa el producto se mide. Básicamente, las mediciones son hechas después de que la reacción se completa y el equilibrio químico se alcanza. Lo anterior tiene una duración aproximada a 30 minutos. El producto es colorido y las mediciones se realizan empleando un espectrofotómetro en la región visible (380-780 nm)<sup>19</sup>.

Para competir con el incremento del número de análisis, los procedimientos químicos se automatizan. Para este fin los analizadores automáticos o los sistemas robotizados se construyen para analizar el doble de muestras comparado con las técnicas manuales, incluyendo la espera para alcanzar el equilibrio de la reacción y entonces llevar a cabo las mediciones en los productos.

Usando el análisis de flujo segmentado (SFA) o de flujo continuo (CFA), los análisis se llevan a cabo en sistemas de flujo, aquí, se pueden tener las mismas condiciones de reacción y estequiometría de la reacción que se usan en los procedimientos manuales. En SFA las burbujas separan las muestras individualmente en segmentos y causan una mezcla intensiva de la muestra y el reactivo<sup>12</sup>.

Las técnicas del análisis de flujo de inyección, se desarrollaron en 1974 en la Technical University de Denmark Lungby, por J. Ruzicka y E.H. Hansen quienes le dieron el término de FIA<sup>13</sup> que es una forma especial del análisis de flujo<sup>11</sup> y es utilizado para la automatización de cualquier número de reacciones químicas húmedas cuyos productos de reacción pueden ser detectados por métodos analíticos estandarizados. La finalidad de esta técnica es analizar el número máximo de muestras, en el menor tiempo y mínimas cantidades de muestra y volumen de reactivo.

El FIA, es un método continuo de análisis, cuyos rasgos esenciales se pueden resumir de la siguiente manera:

- 1) El flujo no está segmentado por burbujas de aire.





- 2) La muestra líquida se inyecta o inserta directamente en el flujo en lugar de ser aspirada.
- 3) Se realiza un transporte de la muestra inyectada a través del sistema. También puede tener lugar un proceso físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, difusión, etc.).
- 4) La dispersión o dilución parcial de la especie química a analizar en este transporte, puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Se produce una mezcla incompleta pero reproducible que da lugar a un gradiente de concentración variable con el tiempo a lo largo del sistema.
- 5) Un sistema de detección continuo proporciona una señal transitoria que se registra.
- 6) En el momento de la detección no se ha alcanzado el equilibrio físico ni químico.
- 7) El tiempo de operación debe ser muy reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad.

Con el FIA, un volumen conocido de muestra constante se inyecta en un flujo continuo de líquido acarreador. En un punto determinado una cantidad conocida de soluciones reactiva pueden ser continuamente adicionadas. El mezclado y la reacción toman lugar mientras que la muestra se transporta en la celda de flujo. Una diferencia fundamental con los procedimientos manuales es que ni en el mezclado, ni en la reacción de la muestra con el reactivo en el líquido acarreador se alcanza el equilibrio, por tanto, para obtener una señal reproducible, el tiempo de espera de la señal de la muestra (dilución o separación) se debe controlar minuciosamente.



Al mantener todos los parámetros exactamente constantes (ej.: rango de flujo, volúmenes, longitud y diámetros internos de las mangueras) se obtiene una buena reproducibilidad. Debido a que el FIA es un proceso dinámico, se necesita mantener los parámetros de reacción constantes. El FIA se diferencia de la gama de procesos estacionarios en que ni los procesos físicos ni químicos llegan al equilibrio. En el FIA la mezcla de las soluciones y reactivos se lleva generalmente al 50 % de la reacción.

### 3.1 Aplicaciones para el FIA

Las técnicas de análisis de flujo de inyección se han posicionado rápidamente en el área de la química en años recientes.

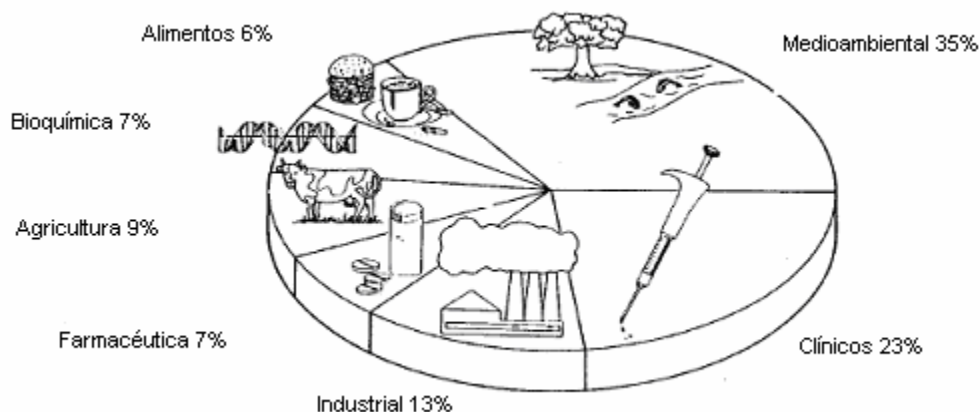


Figura 3.2. Porcentaje de uso de las técnicas FIA<sup>6</sup>

El FIA, realiza análisis excepcionalmente rápidos para ser medidos desde que la muestra y el reactivo no tienen que estar mezclados homogéneamente y no se necesita esperar a que la reacción química sea completa para hacer las mediciones. Por lo tanto, el FIA puede ser utilizado para cualquier número de muestras que se necesiten analizar. En el laboratorio analítico la efectividad y eficiencia, se puede incrementar al usar el FIA. Lo anterior, no es solamente debido a que el análisis es automatizado, sino también, a que las



cantidades que se utilizan de reactivos son considerablemente menores comparadas con las otras técnicas.

Los métodos espectrofotométricos simples, son problemáticos en los análisis de agua y ambientales. Por eso, no es sorprendente encontrar que el FIA es ampliamente utilizado en el área de estos análisis. Hay un método FIA para prácticamente todos los aniones y cationes. En esta parte, los detectores ópticos (UV/VIS espectrofotómetros y espectrofotómetro de absorción atómica) tienen un papel importante.



### 3.2 Componentes del sistema FIA

Los principales componentes necesarios para el sistema FIA se muestran a continuación<sup>10,11</sup>.

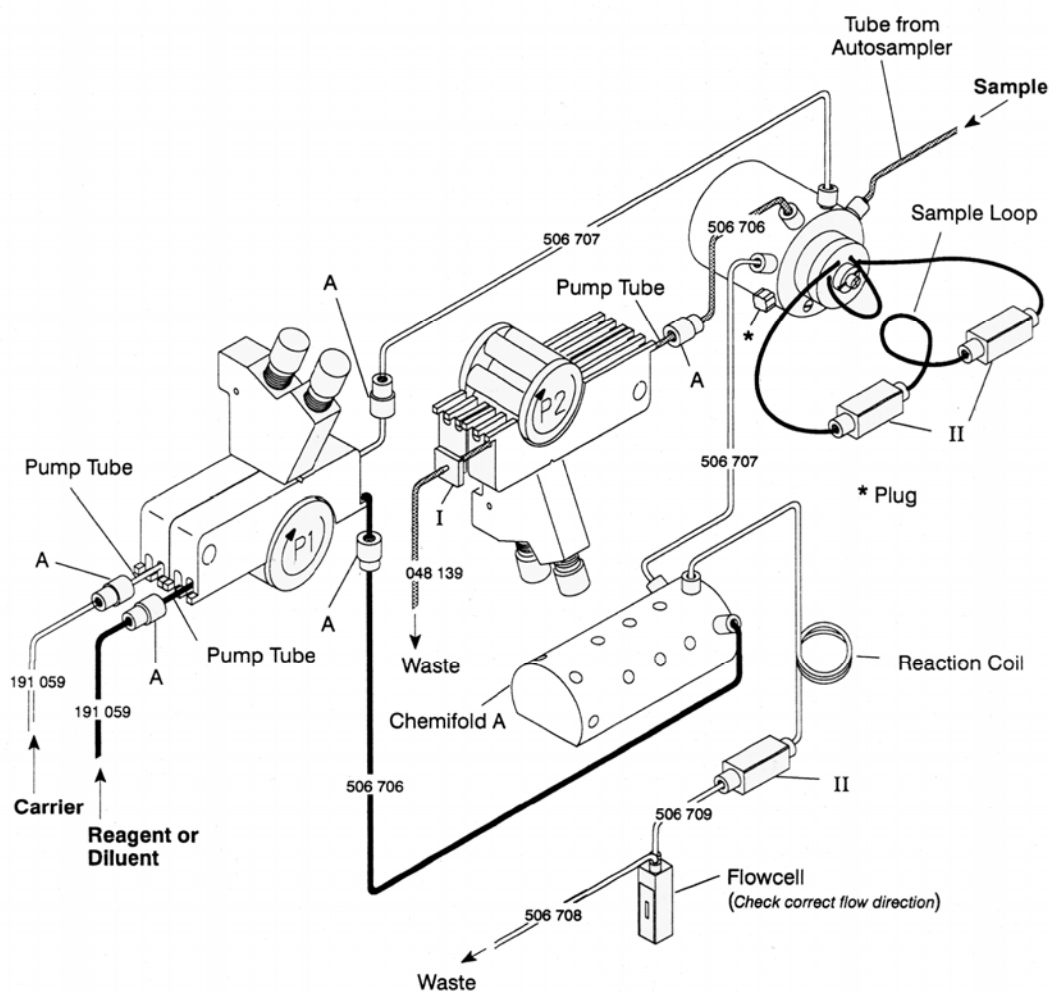


Figura 3.3. Componentes sistemáticos del sistema FIA<sup>6</sup>

El espectrofotómetro Lambda 25 de Perkin-Elmer es un sistema completo, el cual se puede usar en combinación con los componentes mencionados en la figura 3.3. Una PC se debe emplear para controlar todo el sistema, coleccionar y evaluar los datos.



### 3.3 El sistema de transporte

La solución acarreadora se bombea al detector por un sistema de transporte. En el camino la muestra se inyecta dentro del flujo y se transporta al chemifold. En donde la muestra se mezcla con uno o más reactivos. En el tubo de reacción: reactivo y muestra reaccionan para formar un producto el cual se mide en el detector. Para completar el análisis, se lleva a cabo una evaluación de la señal detectada. Los procesos de transporte, mezclado y reacción se llevan a cabo en mangueras PTFE de diámetro interno con intervalo de 0,3 – 1,0 mm.

### 3.4 Inyección de la muestra

El sistema de inyección permite inyectar un volumen definido de muestra dentro del acarreador o flujo de reactivos. La válvula es automática y controla las posiciones de llenado e inyección. En la posición de llenado (Fig. 3.4 a) el volumen de inyección, el cual tiene un volumen definido, se llena con la solución de la muestra. El volumen de muestra contenido en el loop puede ser modificado usando tubos de diferentes longitudes y diámetros internos. Cuando la válvula gira a la posición de inyección (Fig. 3.4 b) la muestra se expulsa fuera de este loop por la solución acarreadora.

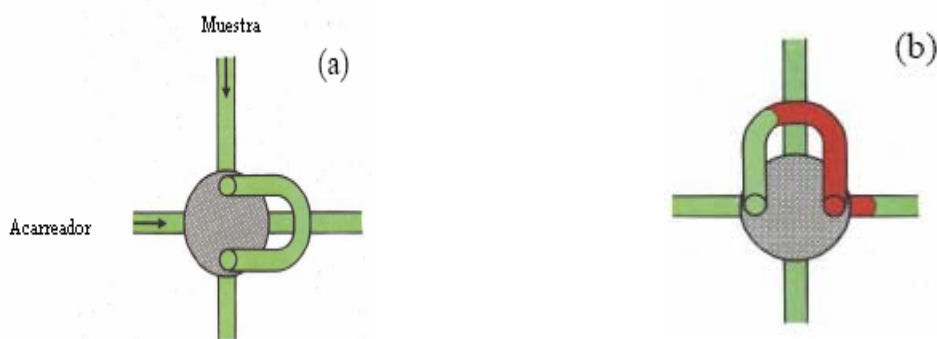


Figura 3.4. Válvula de control automático (a) posición de llenado (b) posición de inyección<sup>6</sup>



El flujo del acarreador no se interrumpe por la inyección. La muestra inmersa en el acarreador se transporta por medio de las mangueras PTFE. Los volúmenes de inyección que se emplean en el FIA están en un rango de 30-200  $\mu\text{L}$ .

### 3.5 Chemifold

Es la parte por la cual los reactivos se van adicionando junto con la muestra inyectada y se lleva a cabo la homogenización. Como su nombre lo indica es un auténtico reactor y consta del cuerpo de reacción y una selección de bucles de muestreo y de reacción, tubos y conectores, de tal manera que cada uno de los componentes del reactor se puede configurar para cada reacción específica. La reacción entre la muestra y el reactivo se lleva a cabo, debido a la difusión axial y radial provocando que se mezclen la muestra y reactivos.

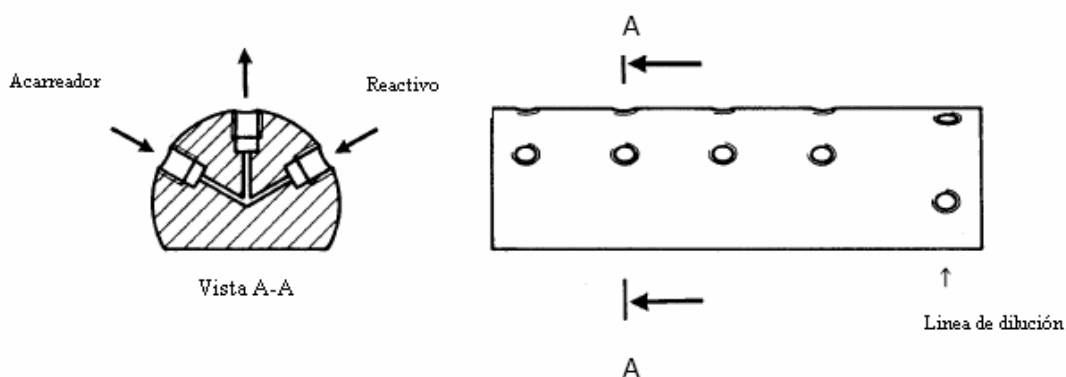


Figura 3.5. *Vistas frontales y longitudinales del chemifold*<sup>6</sup>

### 3.6 Resultados

Una señal típica del FIAS se registra en un tiempo de 20 segundos, por lo tanto, se analizan tres muestras en un minuto.



### 3.7 Comparación de algunas características del FIA con respecto a HPLC y SFA

Parámetro	FIA	HPLC	SFA
Introducción de muestra	Inyección	Inyección	Aspiración
Volumen de muestra	Pequeño	Pequeño	Grande
Análisis de flujo	No segmentado	No segmentado	Segmentado
Tubería del reactor	< 1mm i.d.	< 1 mm i.d.	2 mm i.d.
Demora de fase	Insignificante	Insignificante	Significante
Velocidad de bombeo	Variable	Variable	Fija
Presión de bombeo	Baja	Alta	Baja
Columna	Posible	Necesaria	Posible
Evaluación de datos	Área de pico, o altura de pico	Área de pico, o altura de pico	Altura de pico
Consumo de reactivos	Bajo	Bajo	Alto
Posibilidad de analizar la cinética	Sí	No	No
Principio de detección	Conversión química del analito en el acarreador	Separación y análisis de mezclas complejas	Conversión química del analito en el flujo acarreador

FIA = Análisis de flujo de inyección

HPLC = Cromatografía de líquidos de alta resolución

SFA = Análisis de flujo segmentado



## CAPÍTULO 4

### IMPORTANCIA DE LOS ELEMENTOS MICRONUTRIENTES

Como las plantas terrestres, el fitoplancton marino requiere de ciertos elementos traza para su crecimiento óptimo. Los micronutrientes más importantes dentro de este ciclo son: el nitrógeno y el fósforo, los cuales pueden ser tomados del agua y regulan su crecimiento. Los tipos de organismos que tienen frústulas de silicio (ejemplo las diatomeas) también requieren un suministro de silicio y un florecimiento de esta especie puede reducir apreciablemente el contenido de silicio del agua<sup>17</sup>.

#### 4.1. Nitrógeno

Las formas de nitrógeno de mayor interés en las aguas naturales y residuales son, por orden decreciente de su estado de oxidación, nitrato, nitrito, amoníaco y nitrógeno orgánico. Todas esas formas de nitrógeno, lo mismo que el nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ), son interconvertibles bioquímicamente y forman parte del ciclo del nitrógeno y su interés se debe a varias razones.

El nitrógeno orgánico se define funcionalmente como nitrógeno ligado orgánicamente en el estado de oxidación trinegativo. No incluye a todos los compuestos orgánicos del nitrógeno. Analíticamente, el nitrógeno orgánico y el amoníaco se pueden determinar juntos y se han denominado “nitrógeno kjeldahl”, un término que refleja la técnica utilizada en su determinación. El nitrógeno orgánico incluye productos naturales, como las proteínas y péptidos, ácidos nucleicos y urea, y numerosos materiales orgánicos sintéticos. La concentración típica del nitrógeno orgánico varía desde unos cientos de microgramos por litro en algunos lagos hasta más de 20 mg/L en las aguas residuales brutas.





El nitrógeno oxidado total es la suma del nitrógeno de nitrito y de nitrato. El nitrato se presenta generalmente como trazas en el agua de superficie, pero puede alcanzar niveles elevados en las subterráneas. En cantidades excesivas, contribuye a una enfermedad infantil denominada metahemoglobinemia.

El nitrato es un nutriente esencial para muchos autótrofos fotosintéticos y en algunos casos se identifica como determinante del crecimiento.

El nitrito es el agente causal real de la metahemoglobinemia. El ácido nitroso, formado a partir del nitrito en soluciones ácidas, puede reaccionar con aminas secundarias ( $RR'NH$ ) dando lugar a nitrosaminas ( $RR'N-NO$ ), muchas de las cuales son agentes carcinógenos reconocidos<sup>8</sup>.

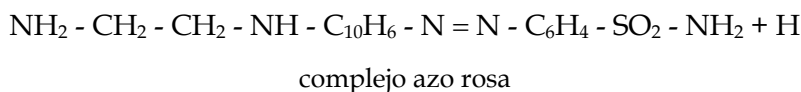
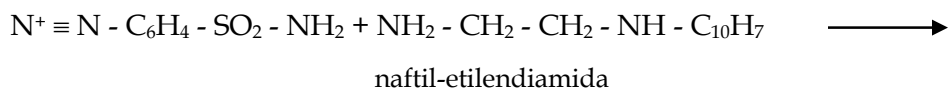
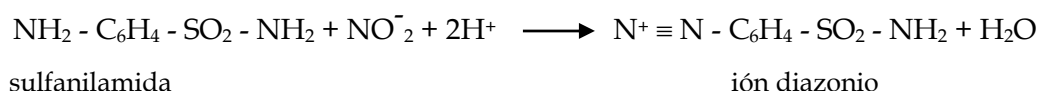
Además del nitrógeno molecular disuelto, el mar contiene concentraciones bajas pero extremadamente importantes, de compuestos de nitrógeno inorgánicos y orgánicos. El peso total de los cuales (alrededor de  $2,2 \times 10^9$  ton), es cerca de diez veces el del gas disuelto. Las principales formas inorgánicas del nitrógeno son: el ión nitrato, el ion nitrito y el amoníaco. Se ha comprobado que se encuentran presentes pequeñas concentraciones de otros compuestos inorgánicos del nitrógeno por ejemplo, el óxido nitroso<sup>18</sup>, y algunas especies de vida corta como la hidroxilamina y también puede presentarse el ión hiponitrito. El mar también contiene concentraciones bajas de compuestos orgánicos de nitrógeno asociados con organismos marinos y los productos de su metabolismo y degradación.

En la práctica, sólo el nitrato y el nitrito y tal vez el amoníaco, se determinan sobre una base rutinaria.



#### 4.1.1. Nitritos

La determinación está basada en la reacción de Griess en la cual se produce un colorante azo rosa, a un pH entre 2,0 – 2,5 por acoplamiento de sulfanilamida diazoazada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina, con absorción máxima a 543nm. La absorbancia obtenida es proporcional a la concentración de nitritos en la muestra. La reacción es la siguiente<sup>17</sup>:



El nitrito se determina en el rango de aplicación del método, para medidas espectrofotométricas de 10 a 1000 µg. El sistema de color obedece a la ley de Lambert y Beer con una concentración de 25 µg N/L empleando una celda de 1 cm a 543 nm.



Como guía, se deben utilizar los siguientes recorridos de luz para las concentraciones de  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  indicadas<sup>8</sup>:

Paso de luz cm	$\text{NO}_2^- - \text{N}$ $\mu\text{g} / \text{L}$
<b>1</b>	<b>2-25</b>
<b>5</b>	<b>2-6</b>
<b>10</b>	<b>&lt; 2</b>

#### 4.1.2. Nitratos

La determinación de nitrato<sup>17,7</sup> es generalmente por la reducción a nitrito el cual se determina como se describió anteriormente. Los nitratos presentes en el agua marina son reducidos casi cuantitativamente cuando una muestra se pasa a través de una columna conteniendo limaduras de cadmio ligeramente cubiertas con cobre metálico. El nitrito así producido se determina por diazoación con sulfanilamida y copulado con N-(1-naftil) etilendiamina para formar un compuesto colorido al cual se le mide su absorbancia.

Este método está basado en la técnica de Morris y Riley con algunas modificaciones, según Grasshoff usando cloruro de amonio.

La columna de cadmio - mercurio se reemplazo por una de cadmio - cobre basada en el trabajo de Wood Armstrong y Richads. Se ha tenido problemas con el uso del EDTA y se emplea cloruro de amonio como activador.

La reducción de nitrato a nitrito es casi completa y el método descrito es tan sensible como el que se logra mediante un procedimiento espectrofotométrico normal.



El nitrato siempre se reduce casi cuantitativamente a nitrito en columna de limaduras de cadmio amalgamadas o recubiertas con cobre metálico.

La reacción que se lleva a cabo es:



La muestra está embebida en una disolución de cloruro de amonio con objeto de producir un efecto “buffer” en la disolución y formar un complejo con el cadmio que ha sido oxidado durante la reducción de nitrato.

El rango de aplicación de este método es de 0,01 a 1 mg de  $\text{NO}_3^-$  – N/L. El método está especialmente recomendado para niveles de  $\text{NO}_3^-$  inferiores a 0,1 mg de N/L donde otros métodos carecen de sensibilidad adecuada<sup>8</sup>.

#### 4.1.2.1 El ciclo del nitrógeno en el mar

Las concentraciones de diferentes especies de nitrógeno orgánicas e inorgánicas en el mar, son controladas fundamentalmente por factores biológicos. No obstante, los efectos físicos, como el hundimiento de los organismos muertos y el ascenso de agua, tienden a influir en la redistribución de dichas especies en la columna de agua. En cualquier cuerpo de agua, el balance instantáneo de los compuestos del nitrógeno representan un equilibrio dinámico entre éstas diferentes especies.

Las bacterias, las plantas y los animales, juegan partes complementarias en las diversas transformaciones, probablemente las bacterias, dominan los procesos de regeneración, en los cuales los compuestos orgánicos del nitrógeno son convertidos a especies inorgánicas de nitrógeno y eventualmente a nitratos. El fitoplancton normalmente sintetiza sus proteínas del nitrito, nitrato y amoníaco, pero las bacterias por lo regular sólo utilizan estas formas de nitrógeno cuando el nitrógeno orgánico no se encuentra disponible. Sin embargo, la única contribución de los animales vivos al ciclo del nitrógeno es la



excreción de amoníaco en el agua y en menor cantidad sus compuestos primarios tales como urea, aminoácidos, óxido de trimetilamina y péptidos<sup>17</sup>.

#### **4.2. Fósforo**

El fósforo se encuentra en las aguas naturales y residuales casi exclusivamente en forma de fosfatos, clasificados en ortofosfatos, fosfatos condensados piro, meta y otros polifosfatos y los ligados orgánicamente. Se presentan en solución, partículas o detritus, o en los cuerpos de organismos acuáticos.

Estas formas del fosfato surgen de una diversidad de fuentes. Cantidades pequeñas de algunos ortofosfatos se añaden debido a que son aplicados como fertilizantes a la tierra agrícola cultivada y son arrastrados con las lluvias y, en menor proporción, con la nieve derretida.

El fósforo es esencial para el crecimiento de los organismos y puede ser el nutriente limitante de la productividad primaria de un cuerpo en el agua.

En los casos en que constituye el nutriente limitante del crecimiento en el agua de descarga, agrícola o ciertos residuos industriales, en ésta se puede estimular el crecimiento de micro y macroorganismos acuáticos fotosintéticos en cantidades grandes (eutroficación).

Los fosfatos pueden aparecer también en los sedimentos de fondos y en cienos biológicos, tanto en formas inorgánicas precipitadas como incorporados a compuestos orgánicos<sup>8</sup>.

El fósforo se presenta en el agua de mar en una variedad de formas disueltas y particuladas.



### 4.2.1 Fósforo disuelto

El fósforo inorgánico existe en el mar prácticamente en forma de iones ortofosfato, Kester y Pytkowicz (1967) demostraron que en el agua de mar con salinidad promedio (pH 8,0 a 20°C), 87% del fosfato se presenta como  $\text{HPO}_4^{2-}$ , 12% como  $\text{PO}_4^{3-}$  y 1% como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y de esa cantidad el 99,6% del  $\text{PO}_4^{3-}$  y el 44% del  $\text{HPO}_4^{2-}$  están en forma de pares iónicos, probablemente con el calcio y el magnesio<sup>17</sup>.

Los compuestos orgánicos, constituyen una porción significativa del fósforo disuelto presente en las capas superficiales de los océanos, estos no se han identificado hasta ahora, pero es probable que sean producto de la descomposición y excreción de los organismos marinos. Si lo anterior fuera así, se debería esperar encontrar azúcares fosfatos<sup>20</sup> pero estos no se han podido detectar en aguas costeras, así como fosfolípidos y fosfonucleótidos junto con sus productos de descomposición. Además de estos ésteres fosfatados conteniendo uniones O-P, ácidos aminofosfónicos los cuales contienen enlaces mucho más estables C-P, se pueden incluir como una proporción significativa de fósforo orgánico disuelto presente en el mar<sup>21</sup>. Estos compuestos se han detectado en variedades de invertebrados marinos tales como los celenterados y moluscos<sup>22,23</sup> y especies de fitoplancton<sup>21</sup>.

### 4.2.2. Química analítica

En el método usado<sup>24</sup>, la determinación de fósforo disuelto se logra induciendo la formación de un compuesto colorido cuya intensidad de color es fácilmente detectable en un espectrofotómetro.

Los iones fosfato, contenidos en la muestra reaccionan con molibdato de amonio produciendo fosfomolibdato de amonio. Al tratar este complejo con ácido ascórbico, se reduce a azul de molibdeno. La absorbancia se lee a 690 nm. La reacción es la siguiente:





### 4.3. Silicio

El silicio, es después del oxígeno, el elemento más abundante de la corteza terrestre. Aparece como óxido (sílice) en el cuarzo y la arena y se combina con los metales en forma de diferentes silicatos minerales complejos, especialmente en las rocas ígneas. La degradación de las rocas que contienen sílice explica su presencia en aguas naturales como partículas en suspensión, en estado coloidal o polimérico y como ácidos silícicos o iones silicato. Con frecuencia las aguas volcánicas y geotérmicas contienen sílice en abundancia.

El silicio está presente en el agua de mar, tanto en solución, como en forma particulada. La forma soluble del elemento es quizá el ácido ortosilícico para el cual la primera y segunda constante de disociación son  $3,9 \times 10^{-10}$  y  $2,0 \times 10^{-13}$  respectivamente a  $25^{\circ}\text{C}$  en una solución de cloruro de sodio, teniendo una fuerza iónica similar a la del agua de mar. Lo anterior sugiere que alrededor del 5%, está ionizada a un pH de  $8,2^{25}$ .

El agua de mar, contiene en suspensión un amplio espectro de material silicio finamente dividido, mucho de éste se ha producido por el desgaste de las rocas sobre la corteza y ha sido transportado por los ríos o por el viento, entre ellos se incluye cuarzo, feldspatos y minerales arcillosos. Como se hunde al fondo oceánico y contribuye a los sedimentos, algunos de estos minerales reaccionan con el agua de mar formando minerales secundarios. En algunas partes de los océanos las aguas superficiales están rodeadas de organismos como diatomeas y radiolarios, los cuales tienen esqueletos compuestos de una forma no cristalina de ópalo de sílice hidratado, cuando estos organismos mueren sus esqueletos de sílice lentamente se hunden y se disuelven. Solo el resto de las especies grandes y más resistentes alcanzan el lecho oceánico. En regiones donde estos organismos silicios proliferan, con frecuencia sus restos constituyen la mayor parte del sedimento ejemplo las diatomeas de las regiones del Antártico.



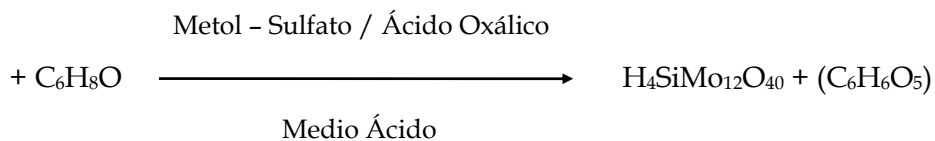
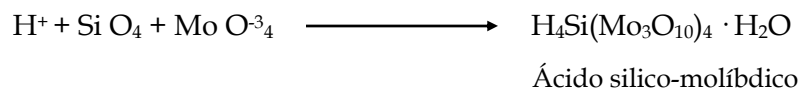


### 4.3.1 Química analítica

El método colorimétrico, se aplica a la forma iónica ortosilicato siendo conveniente para contenidos de miligramos por litro.

Para contenidos intermedios, es necesario practicar diluciones<sup>26</sup>. El método se basa en la formación de un heteropoliácido por tratamiento de la muestra con molibdato de amonio en solución ácida. El complejo resultante (ácido β silico-molibdico) se reduce a un compuesto azul de molibdeno. La intensidad de color se mide a una longitud de onda de 690 nm.

Reacciones:



### 4.3.2 Distribución marina de la sílice disuelta

El contenido de silicio disuelto en aguas costeras es por lo regular alto, debido al efecto del escurrimiento terrestre. En regiones donde ocurre el desarrollo de fitoplancton, particularmente de diatomeas y animales (radiolarios, pterópodos y esponjas) teniendo estructuras silíceas y algunos de ellos son suficientemente abundantes para dar un matiz especializado al légamo profundo.



El incremento en primavera del crecimiento del fitoplancton, causa un decrecimiento rápido en la concentración de silicio. Sin embargo, cantidades considerables permanecerán en el agua. La regeneración de silicio, comienza durante el verano cuando el crecimiento del fitoplancton se detiene y continúa hasta que un valor máximo se alcanza a comienzos del invierno. En algunas áreas, un desarrollo de fitoplancton en el otoño, puede causar una ruptura temporal en la regeneración.

La concentración del silicio disuelto, en las aguas superficiales de los océanos, es casi siempre bajo, excepto en regiones de surgencia. En capas profundas existe un incremento rápido en la concentración. El modelo de distribución general difiere de un océano a otro y se determina por el modelo de circulación de agua y por el abastecimiento del silicio disuelto proveniente del Antártico, y por disolución de las diatomeas tan pronto estas descienden de la superficie<sup>27</sup>.

Grill (1970)<sup>27</sup> ha desarrollado un exitoso modelo matemático para la distribución vertical de silicio disuelto en los océanos. Este conduce a la conclusión de que la distribución observada está controlada por los procesos que involucran la relación: utilización de silicio-organismos más que por las reacciones de aluminosilicatos.



## CAPÍTULO 5

### METODOLOGÍA<sup>9</sup>

#### 5.1 Linealidad del sistema

**5.1.1. Metodología.-** Se preparan por triplicado 5 niveles de concentración de la solución de referencia por dilución, se mide la respuesta analítica bajo las mismas condiciones, reportando la relación, concentración vs. respuesta analítica (ABS). Calculando por mínimos cuadrados el valor de la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente(IC(m)).

#### 5.1.2 Criterio de aceptación:

$$r^2 \geq 0,98$$

IC (m), no debe incluir el cero

#### 5.2 Precisión del sistema

**5.2.1 Metodología.-** Se preparan seis soluciones del analito que representa el punto medio de la curva por diluciones independientes. Medir la respuesta analítica (ABS) bajo las mismas condiciones. Calcular desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) de la respuesta analítica.

#### 5.2.2 Criterio de aceptación:

$$CV \leq 1,5 \%$$



### **5.3 Límite de detección con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión**

**5.3.1 Metodología.-** Una vez medida la respuesta analítica y de hacer la regresión por mínimos cuadrados se determina el límite de detección con el intervalo de confianza para la pendiente como lo indica la fórmula descrita en el anexo C.

### **5.4 Límite de cuantificación con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión**

**5.4.1 Metodología.-** Una vez medida la respuesta analítica y de hacer la regresión por mínimos cuadrados se determina el límite de cuantificación con el intervalo de confianza para la pendiente como lo indica la fórmula descrita en el anexo C.

### **5.5 Especificidad**

**5.5.1 Metodología.-** Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias interferentes y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta. Para tal motivo como la naturaleza de la matriz es agua de mar, se prepara una matriz sintética.

#### **5.5.2 Criterio de aceptación:**

La respuesta únicamente debe ser al analito.

#### **NOTA:**

**Se aplica esta metodología para cada uno de los nutrientes (ver anexo D).**



## CAPÍTULO 6

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.1 Nitritos

Los nitritos son nutrientes importantes en el agua de mar para los organismos marinos, su inestabilidad, los hacen de gran interés en el ciclo del nitrógeno disuelto en medio marino (Millero, 2006). Para los nitritos en el agua de mar sintética, se siguió el procedimiento de validación, indicado a continuación:

##### 6.1.1 Linealidad del sistema

Los datos obtenidos para nitritos se muestran a continuación:

Tabla No. 1. Datos para linealidad del sistema nitritos.			
CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g} / \text{L}$ )	CURVA 1 ABS	CURVA 2 ABS	CURVA 3 ABS
2	0,010	0,010	0,010
4	0,019	0,019	0,019
6	0,028	0,029	0,029
8	0,038	0,038	0,039
10	0,046	0,048	0,049

1.- Con los datos anteriores se determinan las siguientes variables estadísticas:

$$\Sigma x = 2 + 2 + 2 + 4 + 4 + 4 + 6 + 6 + 6 + 8 + 8 + 8 + 10 + 10 + 10 = 90$$

$$\Sigma y = 0,010 + 0,010 + 0,010 + 0,019 + 0,019 + 0,019 + 0,028 + 0,029 + 0,029 + 0,038 + 0,038 + 0,039 + 0,046 + 0,048 + 0,049 = 0,431$$

$$\Sigma x^2 = 2^2 + 2^2 + 2^2 + 4^2 + 4^2 + 4^2 + 6^2 + 6^2 + 6^2 + 8^2 + 8^2 + 8^2 + 10^2 + 10^2 + 10^2 = 660$$



$$\Sigma y^2 = 0,010^2 + 0,010^2 + 0,010^2 + 0,019^2 + 0,019^2 + 0,019^2 + 0,028^2 + 0,029^2 + 0,029^2 + 0,038^2 + 0,038^2 + 0,039^2 + 0,046^2 + 0,048^2 + 0,049^2 = 0,015079$$

$$\Sigma xy = (2*0,010) + (2*0,010) + (2*0,010) + (4*0,019) + (4*0,019) + (4*0,019) + (6*0,028) + (6*0,029) + (6*0,029) + (8*0,038) + (8*0,038) + (8*0,039) + (10*0,046) + (10*0,048) + (10*0,049) = 3,154$$

$$n = 15$$

2.- Con los datos anteriores se calcula m, b y r<sup>2</sup>

Las fórmulas se describen en el anexo A

### **Pendiente**

$$m = \frac{(15 * 3,154) - (90 * 0,431)}{(15 * 660) - (90^2)} \equiv 0,0047333$$

### **Ordenada al origen**

$$b = \frac{0,431 - (0,0047333 * 90)}{15} \equiv 0,000333$$

### **Coefficiente de determinación**

$$r^2 = \frac{[(15 * 3,154) - (90 * 0,431)]^2}{[(15 * 660) - 90^2] * [(15 * 0,15079) - 0,431^2]} \equiv 0,997625$$



### Intervalo de confianza para la pendiente

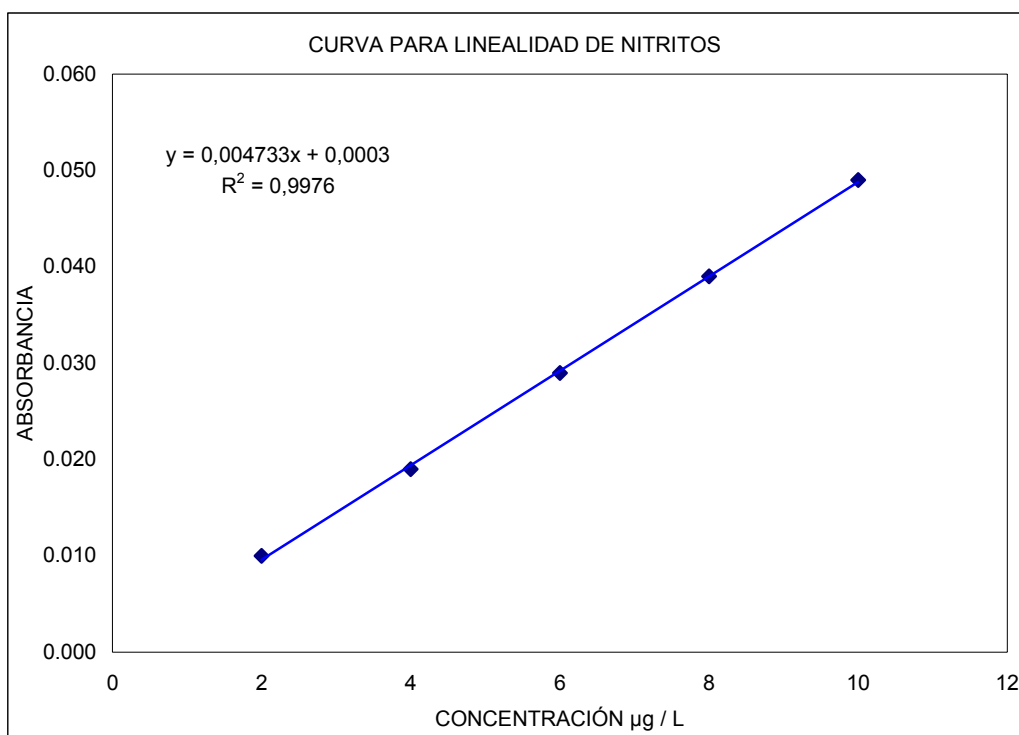
$$I C (m) = 0,004733 - (2,16 * 0,000064) \equiv 0,004595$$

$$I C (m) = 0,004733 + (2,16 * 0,000064) \equiv 0,004872$$

$$(0,004595 - 0,004872)$$

El intervalo de confianza para la pendiente de la curva no incluye el cero

2,16 = Valor de la  $t$  de Student.





## 6.1.2 Precisión del sistema

Absorbancia

$$\lambda = 543 \text{ nm, [6 } \mu\text{g / L]}$$

0,029
0,029
0,029
0,028
0,029
0,029

Con los datos anteriores se calcula  $\Sigma y$  &  $\Sigma y^2$  :

$$\Sigma y = 0,029 + 0,029 + 0,029 + 0,028 + 0,029 + 0,029 = 0,173$$

$$\Sigma y^2 = 0,029^2 + 0,029^2 + 0,029^2 + 0,028^2 + 0,029^2 + 0,029^2 = 0,004989$$

$$n = 6$$

De los resultados anteriores se calcula S &  $\bar{y}$  :

Las fórmulas se describen en el anexo B

$$\bar{y} = \frac{0,173}{6} = 0,02883$$

$$S = \sqrt{\frac{(6 * 0,004989) - 0,173^2}{6 * (6 - 1)}} = 0,0004082$$

Calcular C.V.

$$\text{C.V.} = \left( \frac{0,0004082}{0,02883} \right) * 100 = 1,4 \%$$





### 6.1.3. Límite de detección

Las fórmulas se describen en el anexo C

$$S_{y/x} \equiv \sqrt{\frac{(0,015079) - (0,004733 * 3,154) - (0,000333 * 0,431)}{15 - 2}} \equiv 0,000702$$

$$S_m \equiv 0,000702 \sqrt{\frac{1}{660 - \frac{(90)^2}{15}}} \equiv 0,000064$$

$$LD \equiv \frac{3,3 * 0,000702}{0,004733} \equiv 0,4891 \mu g / L$$

### 6.1.4. Límite de cuantificación

$$LC \equiv \frac{10 * 0,000702}{0,004733} \equiv 1,4823 \mu g / L$$



## 6.2 Nitratos

Los nitratos en el agua de mar, son más importantes que los nitritos, debido a que están relacionados con el proceso de la fotosíntesis en el medio marino (Millero, 2006). El procedimiento de validación de los nitratos en agua de mar fue el siguiente:

### 6.2.1 Linealidad del sistema

CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g} / \text{L}$ )	CURVA 1 ABS	CURVA 2 ABS	CURVA 3 ABS
10	0,028	0,030	0,032
20	0,061	0,061	0,063
30	0,091	0,093	0,092
50	0,153	0,155	0,152
100	0,300	0,305	0,303

Con los datos anteriores se determinarán las siguientes variables estadísticas:

$$\begin{aligned}\Sigma x &= 10 + 10 + 10 + 20 + 20 + 20 + 30 + 30 + 30 + 50 + 50 + 50 + 100 + 100 + 100 \\ &= 630\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\Sigma y &= 0,028 + 0,030 + 0,032 + 0,061 + 0,061 + 0,063 + 0,091 + 0,093 + 0,092 + 0,153 + \\ &0,155 + 0,152 + 0,300 + 0,305 + 0,303 = 1,919\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\Sigma x^2 &= 10^2 + 10^2 + 10^2 + 20^2 + 20^2 + 20^2 + 30^2 + 30^2 + 30^2 + 50^2 + 50^2 + 50^2 + 100^2 + \\ &100^2 + 100^2 = 41700\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\Sigma y^2 &= 0,028^2 + 0,030^2 + 0,032^2 + 0,061^2 + 0,061^2 + 0,063^2 + 0,091^2 + 0,093^2 + 0,092^2 + \\ &0,153^2 + 0,155^2 + 0,152^2 + 0,300^2 + 0,305^2 + 0,303^2 = 0,384885\end{aligned}$$



$$\begin{aligned}\Sigma xy = & (10*0,028) + (10*0,030) + (10*0,032) + (20*0,061) + (20*0,061) + (20*0,063) + \\ & (30*0,091) + (30*0,093) + (30*0,092) + (50*0,153) + (50*0,155) + (50*0,152) + \\ & (100*0,300) + (100*0,305) + (100*0,303) = 126,68\end{aligned}$$

$$n = 15$$

Con los datos anteriores se calcula m, b y  $r^2$

### Pendiente

$$m = \frac{(15 * 126,68) - (630 * 1,919)}{(15 * 41700) - (630^2)} \equiv 0,003024$$

### Ordenada al origen

$$b = \frac{1,919 - (0,003024 * 630)}{15} \equiv 0,000936$$

### Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{[(15 * 126,68) - (630 * 1,919)]^2}{[(15 * 41700) - 630^2] * [(15 * 0,384885) - 1,919^2]} \equiv 0,999711$$

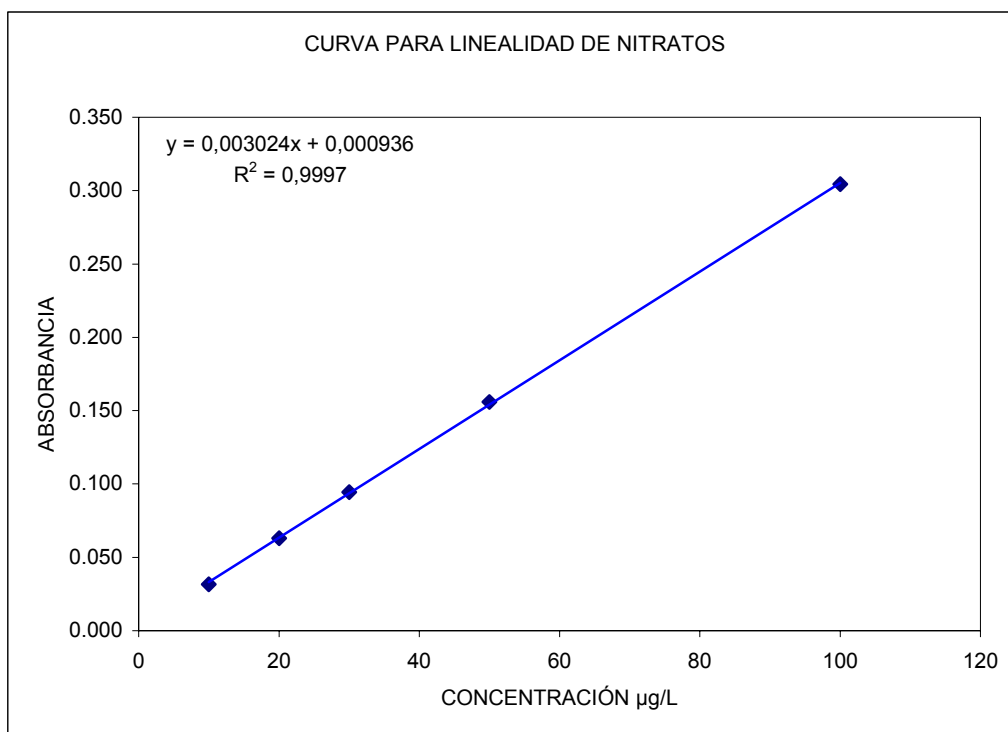
### Intervalo de confianza para la pendiente

$$I C (m) = 0,003024 - (2,16 * 0,000014) \equiv 0,002993$$

$$I C (m) = 0,003024 + (2,16 * 0,000014) \equiv 0,003055$$

$$(0,002993 - 0,003055)$$

El intervalo de confianza para la pendiente de la curva no incluye el cero



### 6.2.2. Precisión del sistema

Absorbancia

$\lambda = 543 \text{ nm}$ , [30 µg / L]

0,092
0,090
0,091
0,091
0,092
0,090



Con los datos anteriores se calcula:

$$\Sigma y = 0,092 + 0,090 + 0,091 + 0,091 + 0,092 + 0,090 = 0,5460$$

$$\Sigma y^2 = 0,092^2 + 0,090^2 + 0,091^2 + 0,091^2 + 0,092^2 + 0,090^2 = 0,04969$$

$$n = 6$$

De los resultados anteriores se calcula S &  $\bar{y}$  :

Las fórmulas se describen en el anexo B

$$\bar{y} = \frac{0,5460}{6} \equiv 0,091$$

$$S = \sqrt{\frac{(6 * 0,004969) - 0,546^2}{6 * (6 - 1)}} \equiv 0,0008944$$

Calcular C.V.

$$C.V. = \left( \frac{0,0008944}{0,091} \right) * 100 \equiv 1,0 \%$$



### 6.2.3 Límite de detección

Las fórmulas se describen en el anexo C

$$S_{y/x} \equiv \sqrt{\frac{(0,384885) - (0,003024 * 126,68) - (0,000936 * 1,919)}{15 - 2}} \equiv 0,001761$$

$$S_m \equiv 0,001761 \sqrt{\frac{1}{41700 - \frac{(630)^2}{15}}} \equiv 0,000014$$

$$LD \equiv \frac{3,3 * 0,001761}{0,003024} \equiv 1,9223 \mu\text{g} / \text{L}$$

### 6.2.4 Límite de cuantificación

$$LC \equiv \frac{10 * 0,001761}{0,003024} \equiv 5,8253 \mu\text{g} / \text{L}$$



### 6.3 Fósforo

El fósforo disuelto en agua de mar en forma conjunta con los nitratos (+ nitritos) son fundamentales como compuestos limitantes de la producción primaria en agua de mar; estos compuestos tienen una relación natural de 15:1 (N:P) en las plantas marinas o fitoplancton, base de la cadena alimenticia en el mar (Millero, 2006). El procedimiento de validación de este nutriente en agua de mar sintética, se presenta a continuación:

#### 6.3.1 Linealidad del sistema

Tabla No. 3 Datos para linealidad de fósforo.			
CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g} / \text{L}$ )	CURVA 1 ABS	CURVA 2 ABS	CURVA 3 ABS
10	0,014	0,014	0,014
20	0,029	0,029	0,029
30	0,038	0,039	0,038
40	0,053	0,052	0,053
50	0,066	0,065	0,065

Con los datos anteriores determinar:

$$\Sigma x = 10 + 10 + 10 + 20 + 20 + 20 + 30 + 30 + 30 + 40 + 40 + 40 + 50 + 50 + 50 = 450$$

$$\Sigma y = 0,014 + 0,014 + 0,014 + 0,029 + 0,029 + 0,029 + 0,038 + 0,039 + 0,038 + 0,053 + 0,052 + 0,053 + 0,066 + 0,065 + 0,065 = 0,598$$

$$\Sigma x^2 = 10^2 + 10^2 + 10^2 + 20^2 + 20^2 + 20^2 + 30^2 + 30^2 + 30^2 + 40^2 + 40^2 + 40^2 + 50^2 + 50^2 + 50^2 = 16500$$

$$\Sigma y^2 = 0,014^2 + 0,014^2 + 0,014^2 + 0,029^2 + 0,029^2 + 0,029^2 + 0,038^2 + 0,039^2 + 0,038^2 + 0,053^2 + 0,052^2 + 0,053^2 + 0,066^2 + 0,065^2 + 0,065^2 = 0,028648$$



$$\begin{aligned}\Sigma xy &= (10*0,014) + (10*0,014) + (10*0,014) + (20*0,029) + (20*0,029) + (20*0,029) + \\ & (30*0,038) + (30*0,039) + (30*0,038) + (40*0,053) + (40*0,052) + (40*0,053) + \\ & (50*0,066) + (50*0,065) + (50*0,065) = 21,73\end{aligned}$$

$$n = 15$$

Con los datos anteriores se calcula m, b y r<sup>2</sup>

### Pendiente

$$m = \frac{(15 * 21,73) - (450 * 0,598)}{(15 * 16500) - (450^2)} \equiv 0,001263$$

### Ordenada al origen

$$b = \frac{0,598 - (0,1263 * 450)}{15} \equiv 0,001967$$

### Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{[(15 * 21,73) - (450 * 0,598)]^2}{[(15 * 16500) - 450^2] * [(15 * 0,028648) - 0,598^2]} \equiv 0,9959$$

### Intervalo de confianza para la pendiente

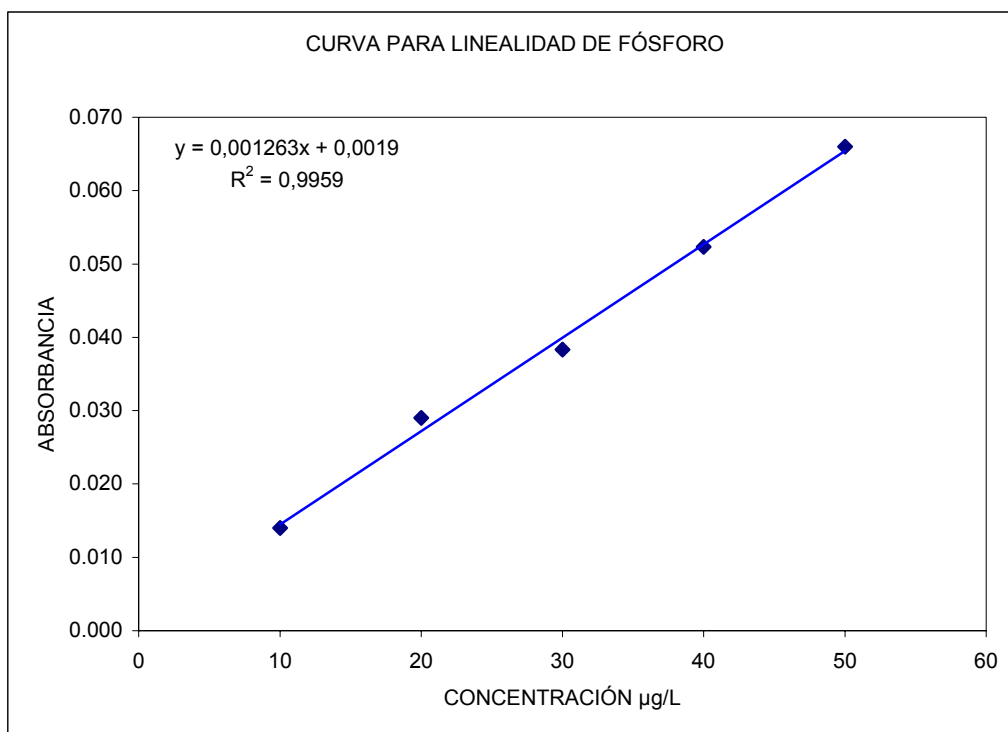
$$I C (m) = 0,001263 - (2,16 * 0,000022) \equiv 0,001215$$

$$I C (m) = 0,001263 + (2,16 * 0,000022) \equiv 0,001312$$

$$(0,001215 - 0,001312)$$

El intervalo de confianza para la pendiente de la curva no incluye el cero





### 6.3.2 Precisión del sistema

Absorbancia

$\lambda = 690 \text{ nm}$ , [30 µg / L]

0,038
0,039
0,038
0,038
0,039
0,038



Con los datos anteriores calcular:

$$\Sigma y = 0,038 + 0,039 + 0,038 + 0,038 + 0,039 + 0,038 = 0,23$$

$$\Sigma y^2 = 0,038^2 + 0,039^2 + 0,038^2 + 0,038^2 + 0,039^2 + 0,038^2 = 0,008818$$

$$n = 6$$

De los resultados anteriores calcular S &  $\bar{y}$ :

Las fórmulas se describen en el anexo B

$$\bar{y} = \frac{0,23}{6} = 0,03833$$

$$S = \sqrt{\frac{(6 * 0,008818) - 0,23^2}{6 * (6 - 1)}} = 0,0005164$$

Calcular C.V.

$$C.V. = \left( \frac{0,0005164}{0,03833} \right) * 100 = 1,3 \%$$



### 6.3.3 Límite de detección

Las fórmulas se describen en el anexo C

$$S_{y/x} \equiv \sqrt{\frac{(0,028648) - (0,001263 * 21,73) - (0,001967 * 0,598)}{15 - 2}} \equiv 0,001231$$

$$S_m \equiv 0,001231 \sqrt{\frac{1}{16500 - \frac{(450)^2}{15}}} \equiv 0,000022$$

$$LD \equiv \frac{3,3 * 0,001231}{0,001263} \equiv 3,2155 \mu\text{g} / \text{L}$$

### 6.3.4 Límite de cuantificación

$$LC \equiv \frac{10 * 0,001231}{0,001263} \equiv 9,7441 \mu\text{g} / \text{L}$$



## 6.4 Silicio

El silicio se encuentra en el agua de mar en forma de ortosilicatos, la mayor parte se encuentra en baja solución y abunda como particulado, debido a su baja solubilidad; este elemento forma parte de la estructura silicea de diversos organismos del fitoplancton; es el nutriente más abundante en el agua de mar, debido a su aporte por ríos, lixiviación de rocas, partículas en aerosol (Millero, 2006). A continuación, se describe su validación analítica en agua mar sintética:

### 6.4.1 Linealidad del sistema

Tabla No. 4 Datos para linealidad de silicio.			
CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g} / \text{L}$ )	CURVA 1 ABS	CURVA 2 ABS	CURVA 3 ABS
300	0,071	0,073	0,070
500	0,115	0,113	0,120
1000	0,236	0,238	0,235
2000	0,485	0,468	0,490
3000	0,735	0,739	0,750

Con los datos anteriores determinar:

$$\Sigma x = 300 + 300 + 300 + 500 + 500 + 500 + 1000 + 1000 + 1000 + 2000 + 2000 + 2000 + 3000 + 3000 + 3000 = 20400$$

$$\Sigma y = 0,071 + 0,073 + 0,070 + 0,115 + 0,113 + 0,120 + 0,236 + 0,238 + 0,235 + 0,485 + 0,468 + 0,490 + 0,735 + 0,739 + 0,750 = 4,938$$

$$\Sigma x^2 = 300^2 + 300^2 + 300^2 + 500^2 + 500^2 + 500^2 + 1000^2 + 1000^2 + 1000^2 + 2000^2 + 2000^2 + 2000^2 + 3000^2 + 3000^2 + 3000^2 = 43020000$$



$$\Sigma y^2 = 0,071^2 + 0,073^2 + 0,070^2 + 0,115^2 + 0,113^2 + 0,120^2 + 0,236^2 + 0,238^2 + 0,235^2 + 0,485^2 + 0,468^2 + 0,490^2 + 0,735^2 + 0,739^2 + 0,750^2 = 2,566424$$

$$\Sigma xy = (300*0,071) + (300*0,073) + (300*0,070) + (500*0,115) + (500*0,113) + (500*0,120) + (1000*0,236) + (1000*0,238) + (1000*0,235) + (2000*0,485) + (2000*0,468) + (2000*0,490) + (3000*0,735) + (3000*0,739) + (3000*0,750) = 10505,2$$

$$n = 15$$

Con los datos anteriores se calculara m, b y r<sup>2</sup>

### Pendiente

$$m = \frac{(15 * 10505,2) - (20400 * 4,938)}{(15 * 43020000) - (20400^2)} \equiv 0,000248$$

### Ordenada al origen

$$b = \frac{4,938 - (0,000248 * 20400)}{15} \equiv -0,008175$$

### Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{[(15 * 10505,2) - (20400 * 4,938)]^2}{[(15 * 43020000) - 20400^2] * [(15 * 2,566424) - 4,938^2]} \equiv 0,9991$$



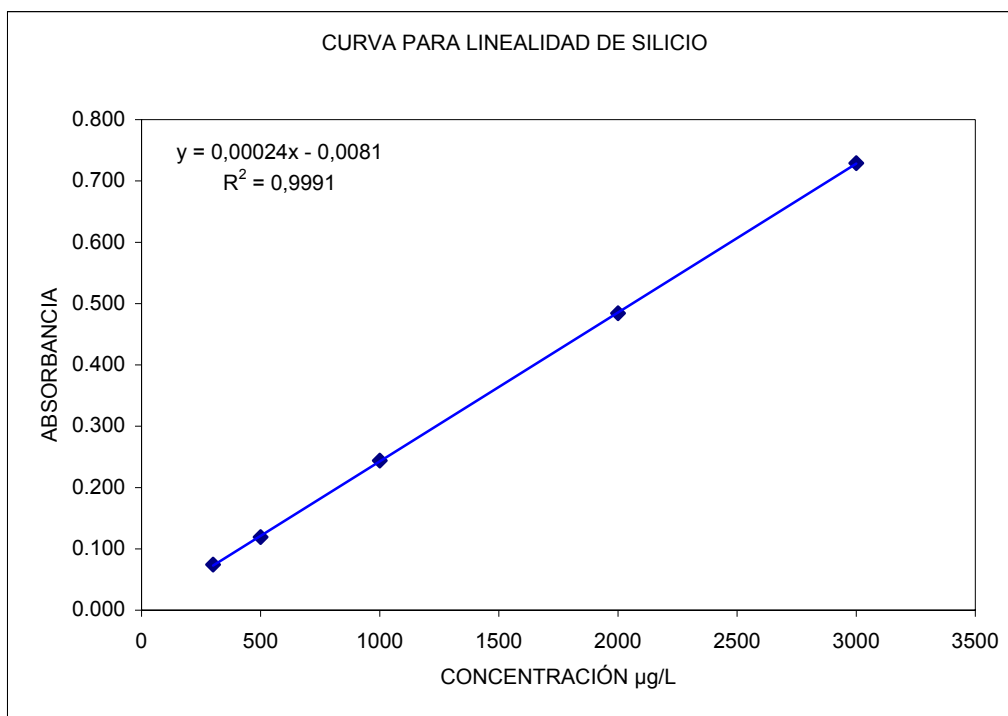
### Intervalo de confianza para la pendiente

$$I C (m) = 0,000248 - (2,16 * 0,000002) \equiv 0,000244$$

$$I C (m) = 0,000248 + (2,16 * 0,000002) \equiv 0,000252$$

$$(0,000244 - 0,000252)$$

El intervalo de confianza para la pendiente de la curva no incluye el cero





## 6.4.2 Precisión del sistema

Absorbancia

$$\lambda = 690 \text{ nm, [1000 } \mu\text{g / L]}$$

0,235
0,238
0,235
0,236
0,235
0,238

Con los datos anteriores calcular:

$$\Sigma y = 0,235 + 0,238 + 0,235 + 0,236 + 0,235 + 0,238 = 1,417$$

$$\Sigma y^2 = 0,235^2 + 0,238^2 + 0,235^2 + 0,236^2 + 0,235^2 + 0,238^2 = 0,334659$$

$$n = 6$$

De los resultados anteriores calcular:

Las fórmulas se describen en el anexo B

$$\bar{y} = \frac{1,417}{6} = 0,23616$$

$$S = \sqrt{\frac{(6 * 0,334659) - 1,417^2}{6 * (6 - 1)}} = 0,001471$$

Calcular C.V.

$$\text{C.V.} = \left( \frac{0,001471}{0,23616} \right) * 100 = 0,6 \%$$



### 6.4.3 Límite de detección

Las formulas se describen en el anexo C

$$S_{y/x} \equiv \sqrt{\frac{(2,566424) - (0,000248 * 10505,2) - (-0,008175 * 4,938)}{15 - 2}} \equiv 0,007684$$

$$S_m \equiv 0,007684 \sqrt{\frac{1}{43020000 - \frac{(20400)^2}{15}}} \equiv 0,00002$$

$$LD \equiv \frac{3,3 * 0,007684}{0,000248} \equiv 102,2137 \mu\text{g} / \text{L}$$

### 6.4.4 Límite de cuantificación

$$LC \equiv \frac{10 * 0,007684}{0,000248} \equiv 309,7386 \mu\text{g} / \text{L}$$



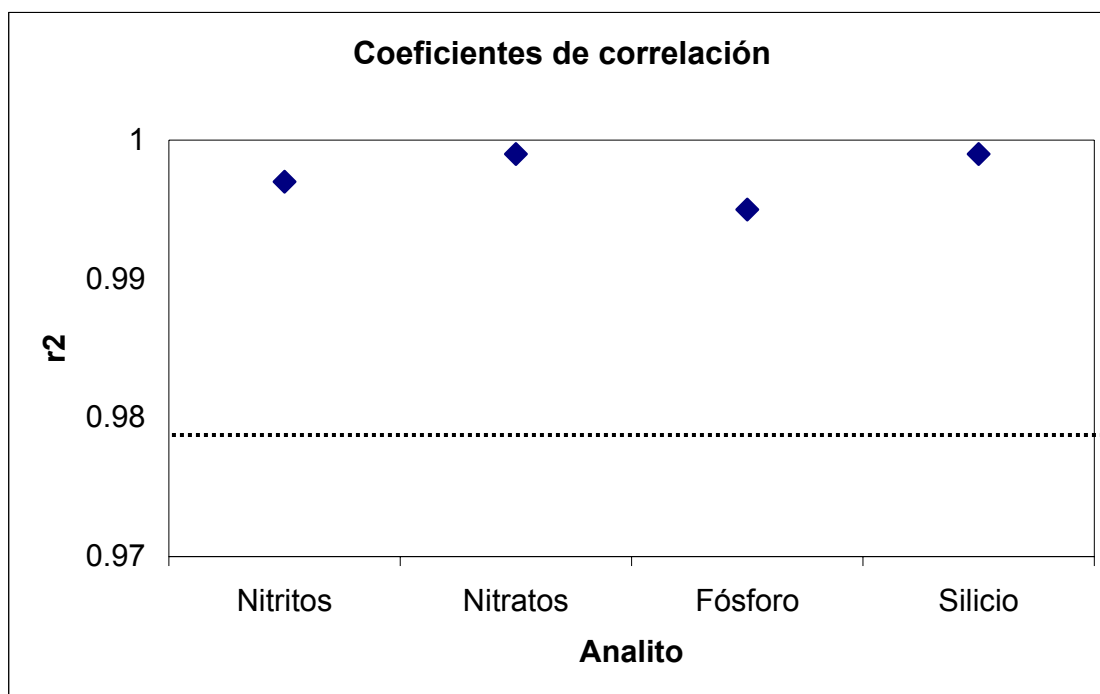


## DISCUSIÓN

A continuación se muestran los valores obtenidos en la validación para cada uno de los micronutrientes determinados.

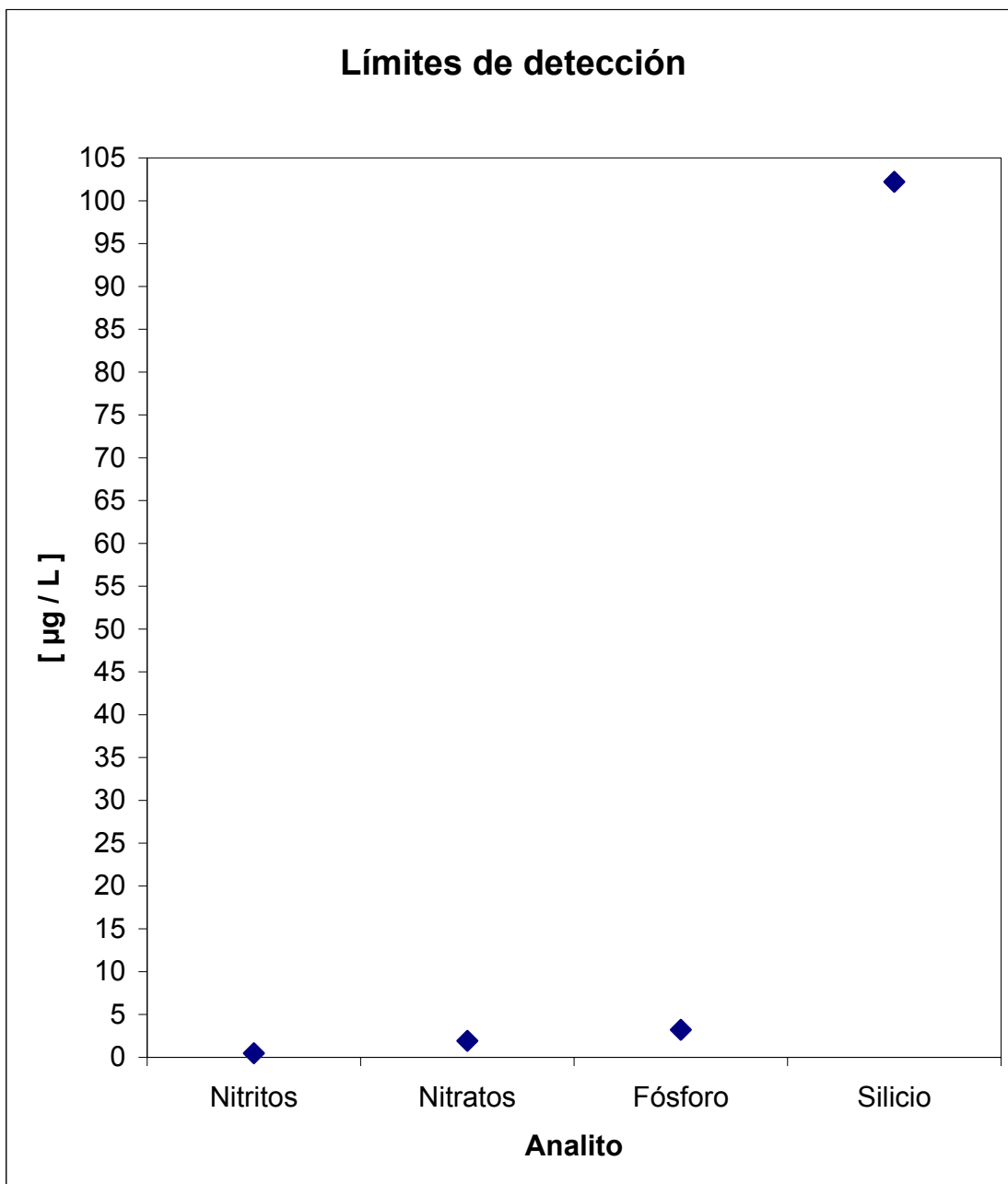
PARÁMETRO	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>	SiO <sub>2</sub>
m	0,004733	0,003024	0,001263	0,000248
b	0,000333	0,000936	0,001967	-0,008175
r <sup>2</sup>	0,9976	0,9997	0,9959	0,9991
Exactitud (C.V.)	1,4	1,0	1,3	0,6
D.E. m	0,000064	0,000014	0,000022	0,000002
Límite de detección µg/L	0,489	1,922	3,215	102,213
Límite de cuantificación µg/L	1,482	5,825	9,744	309,738

En la siguiente gráfica, podemos observar que las linealidades de los analitos validados cumplen con los criterios de aceptación detallados en el capítulo 5.





En la siguiente gráfica, se presentan los límites de detección, estos coinciden con la relación reportada por Riley y Chester (1989) para cada uno de los analitos validados.





## CAPÍTULO 7

### CONCLUSIONES

Al emplear los valores obtenidos de las diferentes concentraciones, la estadística descriptiva muestra que los criterios se cumplen satisfactoriamente para cada uno de los analitos validados.

La metodología empleada para las determinaciones es la mejor, debido a que la cinética se reduce considerablemente; caso concreto la determinación de silicio, según el método descrito hay que mezclar los reactivos y esperar tres horas para alcanzar el equilibrio de la reacción (Fanning, *et. al.*, 1973).

En el caso de los límites de detección se cumplen satisfactoriamente los criterios de aceptación para cada uno de los nutrientes validados.

Los límites de cuantificación para: NO<sub>2</sub> es 1,482 µg/L, NO<sub>3</sub> es 5,825 µg/L, PO<sub>4</sub> es 9,744 µg/L y SiO<sub>2</sub> es 309, 738 µg/L.

En el futuro el estudio se puede extender haciendo gráficos de control, para detectar errores sistemáticos o aleatorios. Así mismo, hacer validaciones retrospectivas o concurrentes, para detectar si el sistema sigue cumpliendo con los criterios de aceptación.



## CAPÍTULO 8

### BIBLIOGRAFÍA

1. American Society for Testing Materials. 2003. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 03 – 06, 200 – 214 p.p.
2. American Society for Testing Materials. 2003. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 05 – 02, 290 – 296 p.p.
3. U.S. Environmental Protection Agency. 1985. National Primary Drinking Water Standards: Synthetic Organics, Inorganics and Bacteriologicals, 40 CFR Part 141; Federal Register 50 : 219.
4. American Society for Testing and Materials. 1983. Standar Practice for Intralaboratoty Quality Control Procedures and a Discussion on Reporting Low-Level Data, Designation D4210-83, American Soc. Testing & Materials, Filadelfia, Pennsylvania.
5. Glaser, J. A. Foerst, D. L. Mc Kee, J. D. Quave, S. A. & Budde, W. L. 1981. Trace analyses for wastewaters, Environ. Sci. Technol. 15: 1426.
6. Müller, H. Frey, B. & Schweizer, B. 1992. Techniques for Flow Injection Analysis in UV / Vis Spectroscopy, Perkin Elmer, Alemania.
7. Morris, A. W. and Riley, J. P. 1963. Determination of nitrate in sea water, Anal. Chem. Acta. 29:272-279.
8. APHA, AWWA & WPCF. 1992. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid España Part. 4000.



9. García, A. Soberón, E. Cortés, M. Rodríguez, R. Herrera, J. Alcántara, A. Chárvel, A. Mota, R. y Garzón, A. 2002. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Editado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C., 123 p.
10. Möller, J. 1982. FIA- eine neue Analysenmethode. Labor Praxis, 278 p.
11. Möller, J. 1988. Flow Injection Analysis. Sonderdruck aus Bd. 7, 199 p.
12. Paltton, C. J. & Crouch, S. J. 1986. Experimental Comparison of Flow Injection Analysis and Air-Segmented Continuous Flow Analysis, *Anal. Chem. Acta* 179:189-201 p.p.
13. Ruzicka, J. & Hansen, E. 1981. Flow Injection Analysis. Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.
14. U.S. Environmental protection agency. 1980. Health Physics Society Committee Report HPSR-1: Upgrading Environmental Radiation Data, EPA-520/1-80-012, Environmental protection agency, Washington, D.C.
15. American Society for Testing and Materials. 1977. Standard Practice for Determination of Precision and Bias of Methods. Committee D-19 on Water, Designation D2777-77, American Soc. Testing & Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
16. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos.
17. Riley, J.P. y Chester, R. 1989. Introducción a la Química marina. AGT EDITOR S. A., 153-180 p.p.
18. Craig, H. y Gordon, L.I. 1963. *Geochim. cosmochim. Acta.* 27, 949.



19. McMurry, J. 2001. Química Orgánica. Internacional Thomson Editores, México, 450 - 452 p.p.
20. Strickland, J.D.H. y Solórzano, L. 1966. In some contemporary studies in marine science. Ed. H. Barnes., Allen and Unwin., London.
21. Kittredge, J.S. Horiguchi, M. y Williams, P.M. 1969. *Comp. Biochem. Physiol.* 29,859.
22. Quin, L.D. 1965. *Biochemistry*. 4, 324.
23. Kittredge, J.S. Isbell, A.F. y Hughes, R.R. 1967. *Biochemistry*. 1, 624.
24. Murphy, S. y Riley, J.L. 1962. *Anal. Chem. Acta*. 2, 31.
25. Burton, J.D. Leathland, T.M. y Liss, P.S. 1970. *Limnol. Oceanog.* 15, 473.
26. Fanning, K. A. & Pilson, M.E.Q. 1973. On the spectrophotometric determination of dissolve silica in natural waters, *Anal. Chem.* 45:136.
27. Grill, E.V. 1970. *Deep Sea Res.*, 17, 245.
28. Millero, F. J. 2006. Chemical Oceanography. 3th Edition, CRC – Taylo & Francis. FL, USA. 496 p.
29. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas



## ANEXOS

### ANEXO A

#### Fórmulas para linealidad del sistema

##### Pendiente

$$m \equiv \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

##### Ordenada al origen

$$b \equiv \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

##### Coefficiente de determinación

$$r^2 \equiv \frac{[n (\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n (\sum x^2) - (\sum x)^2] [n (\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$



## ANEXO B.

### Fórmulas para precisión del sistema

#### Media aritmética:

$$\bar{y} \equiv \frac{\sum y}{n}$$

#### Desviación estándar:

$$s \equiv \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

#### Coefficiente de variación:

$$CV \equiv \frac{s}{\bar{y}} * 100$$





## ANEXO C

### Fórmulas para límite de detección

#### Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC(m) \equiv b \pm t_{0.975, n-2} S_m$$

$t_{0.975, n-2}$  = Determinar el valor de la  $t$  de Student

$$S_m \equiv S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} \equiv \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n-2}}$$

#### Fórmula para límite de detección

$$LD \equiv \frac{3.3 \times S_{y/x}}{m}$$

#### Fórmula para límite de cuantificación

$$LC \equiv \frac{10 \times S_{y/x}}{m}$$



## ANEXO D

### NITRITOS

#### Linealidad del sistema

Se prepara una solución de 1000 mg/L de nitrito de sodio al pesar 0,4928 g de ( $\text{NaNO}_2$ ) previamente secado a 110°C durante 24 horas y aforar a 100 mL.

Preparar una solución de 10 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 0,1 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 10 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 2  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 0,1 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 4  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 2 mL de la solución de 0,1 mg/L con una pipeta volumétrica de 2 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 6  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 3 mL de la solución de 0,1 mg/L con una pipeta volumétrica de 3 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con agua grado reactivo.



Preparar una solución de 8  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 4 mL de la solución de 0,1 mg/L con una pipeta volumétrica de 4 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 10  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 5 mL de la solución de 0,1 mg/L con una pipeta volumétrica de 5 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con agua grado reactivo.

### **Precisión**

Se prepara una solución de 1000 mg/L de nitrito de sodio al pesar 0,4928 g de ( $\text{NaNO}_2$ ) previamente secado a 110°C durante 24 horas y aforar a 100 mL.

Preparar una solución de 10 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 0,1 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 10 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar seis soluciones de 6  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 3 mL de la solución de 0,1 mg/L con una pipeta volumétrica de 3 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con agua grado reactivo.



## NITRATOS

### Linealidad del sistema

Se prepara una solución de 1000 mg/L de nitrato de sodio al pesar 0,6071 g de ( $\text{NaNO}_3$ ) previamente secado a  $105^\circ\text{C}$  durante 24 horas y aforar a 100 mL.

Preparar una solución de 10 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 1 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 10 mL de la solución de 10 mg/L con una pipeta volumétrica de 10 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 10  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 20  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 2 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 2 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 30  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 3 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 3 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 50  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 5 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 5 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.



Preparar una solución de 100  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 10 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 10 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

### **Precisión**

Se prepara una solución de 1000 mg/L de nitrato de sodio al pesar 0,6071 g de ( $\text{NaNO}_3$ ) previamente secado a 105°C durante 24 horas y aforar a 100 mL.

Preparar una solución de 10 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 1 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 10 mL de la solución de 10 mg/L con una pipeta volumétrica de 10 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar seis soluciones de 30  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 3 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 3 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.



## Fósforo

### Linealidad del sistema

Se prepara una solución de 1000 mg/L de ortofosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) al pesar 0,4393 g de fosfato monobásico de potasio anhidro previamente secado a 110°C durante 24 horas y aforar a 100 mL.

Preparar una solución de 10 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 1 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 10 mL de la solución de 10 mg/L con una pipeta volumétrica de 10 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 10 µg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 20 µg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 2 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 2 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 30 µg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 3 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 3 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.



Preparar una solución de 40  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 4 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 4 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 50  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 5 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 5 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

### **Precisión**

Se prepara una solución de 1000 mg/L de ortofosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) al pesar 0,4393 g de fosfato monobásico de potasio anhidro previamente secado a 110°C durante 24 horas y aforar a 100 mL.

Preparar una solución de 10 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 1 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 10 mL de la solución de 10 mg/L con una pipeta volumétrica de 10 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar seis soluciones de 30  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 3 mL de la solución de 1 mg/L con una pipeta volumétrica de 3 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.



## Silicio

### Linealidad del sistema

Se prepara una solución de 1000 mg/L de metasilicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) al pesar 1,0130 g de metasilicato de sodio nonahidratado aforar a 100 mL.

Preparar una solución de 100 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 10 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 10 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 10 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 300  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 3 mL de la solución de 10 mg/L con una pipeta volumétrica de 3 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 500  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 5 mL de la solución de 10 mg/L con una pipeta volumétrica de 5 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 1000  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 100 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar una solución de 2000  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 2 mL de la solución de 100 mg/L con una pipeta volumétrica de 2 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.





Preparar una solución de 3000  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 3 mL de la solución de 100 mg/L con una pipeta volumétrica de 3 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

### **Precisión**

Se prepara una solución de 1000 mg/L de metasilicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) al pesar 1,0130 g de metasilicato de sodio noahidratado aforar a 100 mL.

Preparar una solución de 100 mg/L, esto se consigue tomando una alícuota de 10 mL de la solución de 1000 mg/L con una pipeta volumétrica de 10 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.

Preparar seis soluciones de 1000  $\mu\text{g/L}$ , esto se consigue tomando una alícuota de 1 mL de la solución de 100 mg/L con una pipeta volumétrica de 1 mL y se deposita en un matraz volumétrico de 100 mL, aforar con agua grado reactivo.