



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN  
FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE NUTRIMENTOS FÓSFORO TOTAL,  
NITRATO, NITRITO Y AMONIO EN AGUAS DULCES Y SALOBRES**

PROYECTO DE GRADUACIÓN

Carlos Mario Calderón Ramírez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
San José Costa Rica  
2020.

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.**

*A todo el personal del CIMAR-UCR por su apoyo, cooperación y paciencia, durante esta etapa de gran aprendizaje. Un sincero agradecimiento a Juan Guillermo Sagot por su colaboración en el laboratorio.*

## HOJA DE APROBACIÓN.

“Este proyecto de graduación fue aceptado por la Escuela de Química y la Facultad de Ciencias de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química”.

### Aprobado por el comité examinador:

Dr. Federico Muñoz Rojas.

Vicedecano Facultad de Ciencias, Presidente del Tribunal.

Federico Muñoz R.

Dr. Eddy Gómez Ramírez.

Director del proyecto.

Eddy H. Gómez R.

M.Sc. Paola Fuentes Schweizer.

Lector.

Paola Fuentes S.

M. Sc. Gerardo Umaña Villalobos.

Lector.

Gerardo Umaña V.

Dr. Juan José Araya Barrantes.

Miembro del Tribunal.

Juan José Araya B.

Carlos Mario Calderón Ramírez.

Postulante.

Carlos Calderón R.

## ÍNDICE GENERAL.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS. ....	ii
HOJA DE APROBACIÓN. ....	iii
ÍNDICE GENERAL. ....	iv
RESUMEN.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS NUTRIMENTOS EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS.....	4
Fósforo y especiación.....	4
Nitrógeno y especiación.....	5
Criterios para determinar el grado de eutrofización de un cuerpo de agua.....	6
Desarrollo de modelos biogeoquímicos.....	7
2.2 PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS EQUIPOS DE ANÁLISIS EN FLUJO (FIA). ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO QUICKCHEM FIA LACHAT 8500.....	8
2.3 DETERMINCIÓN DE LAS FORMAS DE NITRÓGENO EN EL AGUA CON EQUIPO DE ANÁLISIS EN FLUJO.....	9
2.4 DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO TOTAL EN EL AGUA CON EQUIPO DE ANÁLISIS EN FLUJO.....	13
2.5 POSIBLES INTERFERENCIAS EN LA MATRIZ.....	15
4. METODOLOGÍA.....	18
Propósito y alcance:.....	18
Materiales y reactivos.....	20
Evaluación de parámetros.....	23
Linealidad. Curva de calibración en agua desionizada.....	24
Efecto matriz. Efecto de la variación de la salinidad.....	24
Efecto matriz. Adiciones estándar.....	24
Análisis de muestras. Control de calidad del método.....	25
Robustez.....	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD Y RANGO DE TRABAJO DEL MÉTODO.....	28
Especies nitrogenadas.....	28

Fósforo total.....	30
5.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ. ADICIONES ESTÁNDAR.....	31
Especies nitrogenadas.....	31
Fósforo total.....	33
5.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ. EFECTO DE LA SALINIDAD.....	35
Especies nitrogenadas.....	35
Evaluación del Intercepto (b) para las especies nitrogenadas.....	37
5.4 EVALUACIÓN DE LA VERACIDAD. ....	39
Especies nitrogenadas.....	39
Fósforo total.....	41
5.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS AMBIENTALES. CONTROL DE CALIDAD DEL MÉTODO. ....	43
Nitrato. Control de calidad. ....	43
Nitrito. Control de calidad. ....	45
Amonio. Control de calidad. ....	47
Fósforo total. Estabilidad del método con respecto al tiempo. ....	50
Límite de Cuantificación y Detección. ....	51
Coeficiente de variación para el análisis de muestras. Evaluación de la precisión. ....	53
5.6 ALTERNATIVA AL PROCESO DE DIGESTIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL.....	57
Mezcla ácida.....	57
5.6 OBSERVACIONES SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE ESPECIES NITROGENADAS CUANTIFICADAS EN LOS MUESTREOS.....	59
5.7 OBSERVACIONES SOBRE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL.....	63
5.8 RECOMENDACIONES PARA LAS METODOLOGÍAS DE DETERMINACIÓN DE AMONIO, NITRATO Y NITRITO.....	65
5.9 RESUMEN DE LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LAS METODOLOGÍAS EVALUADAS.....	66
6 CONCLUSIONES.....	69
Bibliografía.....	71
ANEXO I. INFORME DE LA INCERTIDUMBRE.....	81
Identificación de las fuentes de incertidumbre. ....	83
Cuantificación de la incertidumbre.....	83
ANEXO II. MODIFICACIONES SUGERIDAS AL PROTOCOLO DE OPERACIÓN NORMALIZADO (PON NUTRIS FIA 2014, CIMAR LOQ) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ANALITOS NITRATO, NITRITO Y AMONIO EN AGUAS DULCES Y SALOBRES..	85

ANEXO III. RESUMEN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE CONTROL DE CALIDAD DEL MÉTODO.....	87
ANEXO IV. EJEMPLO DE CÁLCULO PARA LA EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD CON RECTAS DE CALIBRADO EXTERNO.....	91

## RESUMEN.

Se realizó la verificación de las metodologías para la determinación de los nutrimentos: nitrato, nitrito, amonio y fósforo total en el equipo por inyección de flujo (FIA por sus siglas en inglés) FIA LACHAT QuickChem8500 en dos matrices distintas, una de agua dulce tomada de la Laguna de Río Cuarto y otra de agua salada tomada del estero de Puntarenas. El muestreo en la Laguna de Río Cuarto se realizó el 17 de octubre del 2017 y el muestreo en el estero de Puntarenas se realizó el 20 de noviembre del 2017. Se recolectaron 12 muestras del estero de Puntarenas y 6 de la Laguna de Río Cuarto.

Las metodologías se encuentran descritas en el Protocolo de Operación Normalizado del CIMAR UCR número NUT-08 versión del 05/05/2014 y se siguieron las condiciones operativas del equipo descritas en este documento. Los parámetros de desempeño evaluados fueron: selectividad, linealidad, precisión, efecto matriz, efecto de la salinidad y veracidad. Los criterios de aceptación fueron establecidos según los lineamientos de la guía EURACHEM 2014 y de otras fuentes.

Las metodologías para la cuantificación de nitrato y nitrito cumplieron los criterios de aceptación, en el caso del amonio se cumplieron de forma parcial, ya que durante los experimentos de control de calidad se encontraron problemas para obtener una línea base estable en 3 días distintos, mientras que los demás criterios establecidos sí los cumplió. Para el analito fósforo total no se cumplieron los criterios de aceptación establecidos, además, solo fue posible realizar la evaluación con un único patrón de ATP y se sugiere para el futuro que se evalúe alguna otra alternativa.

Como insumo de este trabajo se estableció un procedimiento para llevar el control de calidad del método, y otro para cuantificar el efecto del Carry Over que se pueda dar durante la cuantificación de las muestras de amonio.

## ÍNDICE DE CUADROS.

<b>Cuadro I:</b> Clasificación de los cuerpos de agua según el contenido de nitrógeno en sus tres formas según Vollenweider 1968. ....	6
<b>Cuadro II:</b> Clasificación de los cuerpos de agua según el contenido de fósforo total según Vollenweider 1968. ....	7
<b>Cuadro III:</b> Coordenadas de los puntos de muestreo en el Estero de Puntarenas. ....	19
<b>Cuadro IV:</b> Patrones primarios utilizados para las fortificaciones de veracidad y adiciones estándar. ....	22
<b>Cuadro V:</b> Patrones primarios utilizados en la preparación de las disoluciones. ....	22
<b>Cuadro VI:</b> Parámetros de evaluación y criterio de aceptación. ....	23
<b>Cuadro VII:</b> Interceptos obtenidos para cada una de las rectas de salinidad variable ....	38
<b>Cuadro VIII:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del estero de Puntarenas. Analito nitrato. ....	39
<b>Cuadro IX:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del estero de Puntarenas. Analito nitrito. ....	39
<b>Cuadro X:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Estero de Puntarenas. Analito amonio. ....	40
<b>Cuadro XI:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Laguna Río Cuarto. Analito nitrato. ....	40
<b>Cuadro XII:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Laguna Río Cuarto. Analito nitrito. ....	41
<b>Cuadro XIII:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Laguna Río Cuarto. Analito amonio. ....	41
<b>Cuadro XIV:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra de la Laguna de Río Cuarto. Analito fósforo total. ....	42
<b>Cuadro XV:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del estero de Puntarenas. Analito fósforo total. ....	42
<b>Cuadro XVI:</b> Rendimiento de reducción de la columna de cadmio para distintos días de análisis de muestras ambientales ....	43
<b>Cuadro XVII:</b> LC y LD para las especies nitrogenadas en los distintos días de análisis de las especies de las muestras ambientales. ....	52
<b>Cuadro XVIII:</b> LC y LD para distintos días de análisis de fósforo total en las muestras ambientales. ....	52
<b>Cuadro XIX:</b> Coeficiente de variación para la cuantificación de la especie amonio. ....	53
<b>Cuadro XX:</b> Coeficiente de variación para la cuantificación de la especie nitrato. ....	54
<b>Cuadro XXI:</b> Coeficiente de variación para la cuantificación de la especie nitrito. ....	55
<b>Cuadro XXII:</b> Coeficiente de variación para la cuantificación de la especie fósforo total. ....	56
<b>Cuadro XXIII:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Estero de Puntarenas. Analito fósforo total, oxidante ácido. ....	57
<b>Cuadro XXIV:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Lago Río Cuarto. Analito fósforo total, oxidante ácido. ....	58
<b>Cuadro XXV:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Estero de Puntarenas. Analito fósforo total, proceso de oxidación según Valderrama. ....	58
<b>Cuadro XXVI:</b> Porcentajes de recuperación para cada nivel de la Laguna de Río Cuarto. Analito nitrógeno total, proceso de oxidación según Valderrama. ....	59

<b>Cuadro XXVII:</b> Concentraciones de las especies nitrogenadas de cada estación de muestreo del estero de Puntarenas. ....	59
<b>Cuadro XXVIII:</b> Concentraciones de las especies nitrogenadas en cada punto de muestreo de la Laguna de Río Cuarto. ....	62
<b>Cuadro XXIX:</b> Resumen de los parámetros de evaluación con su respectivo criterio de aceptación obtenidos. Especie nitrato.....	66
<b>Cuadro XXX:</b> Resumen de los parámetros de evaluación con su respectivo criterio de aceptación obtenidos. Especie nitrito.....	67
<b>Cuadro XXXI:</b> Resumen de los parámetros de evaluación con su respectivo criterio de aceptación obtenidos. Especie amonio. ....	68
<b>Cuadro XXXII:</b> Variables y valores obtenidos para la pipeta aforada. ....	84
<b>Cuadro XXXIII:</b> Variables y valores obtenidos para la curva y la repetibilidad. ....	84
<b>Cuadro XXXIV:</b> Resumen de muestras analizadas durante los experimentos de control de calidad. Analito: Especies nitrogenadas.....	87
<b>Cuadro XXXV:</b> Resumen de muestras analizadas durante los experimentos de control de calidad. Analito: Fósforo total.....	89
<b>Cuadro XXXVI:</b> Datos de la curva para la evaluación de la linealidad mostrada en la Figura 9. ....	91
<b>Cuadro XXXVII:</b> Resultados de los parámetros calculados a partir del criterio de Meir y Zund. ....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1:</b> Diagrama de distribución relativa de la concentración de las distintas especies nitrogenadas en la columna de agua. Modificado de Camargo 2006. ....	5
<b>Figura 2:</b> Mecanismo de la reacción de Griess para la determinación simultánea de nitrito y nitrato (Miranda, 2001). ....	10
<b>Figura 3:</b> Diagrama de flujo de la muestra en el equipo FIA para la reacción de Griess (QuickChem training manual, 2008). ....	11
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de la reacción de Berthelot para la determinación de amonio (Weatherburn, 1967). ....	12
<b>Figura 5:</b> Diagrama de flujo de la muestra en el equipo FIA para la reacción de Berthelot (Lachat training manual, 2015). ....	13
<b>Figura 6:</b> Diagrama de flujo de la muestra en el equipo FIA para la reacción de determinación de fosfato (Lachat training manual, 2015). ....	14
<b>Figura 7:</b> Sitio de muestreo de la Laguna de Río Cuarto. Ubicación según Google Earth. ....	18
<b>Figura 8:</b> Puntos de muestreo del Estero de Puntarenas. Ubicación según Google Earth. ....	19
<b>Figura 9:</b> Recta de calibración con sus respectivas barras de error para cada patrón. Analito nitrato por la reacción de Griess a 540 nm. ....	29
<b>Figura 10:</b> Recta de calibración con sus respectivas barras de error para cada patrón. Analito nitrito por la reacción de Griess a 540 nm. ....	29
<b>Figura 11:</b> Recta de calibración con sus respectivas barras de error para cada patrón. Analito Amonio por la reacción de Berthelot 630 nm. ....	30
<b>Figura 12:</b> Recta de calibración con sus respectivas barras de error para cada patrón. Analito Fósforo total por la reacción de azul de molibdeno a 880 nm. ....	31
<b>Figura 13:</b> Experimento de AE para la muestra de agua salobre. Fósforo total. A+, B+ y C+ corresponden a las réplicas de la muestra sin diluir. A+d, B+d y C+d corresponde a las réplicas diluidas. ....	33
<b>Figura 14:</b> Experimento de AE para la muestra de la laguna Río Cuarto. Fósforo total. A+, B+ y C+ corresponden a las réplicas de la muestra sin diluir. A+d, B+d y C+d corresponde a las réplicas diluidas. ....	34
<b>Figura 15:</b> Evaluación del efecto de la salinidad para la especie nitrato. ....	35
<b>Figura 16:</b> Evaluación del efecto de la salinidad para la especie nitrito. ....	36
<b>Figura 17:</b> Evaluación del efecto de la salinidad para la especie amonio. ....	36
<b>Figura 18:</b> Carta de control del promedio X para los BFL de nitrato. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI). ....	44
<b>Figura 19:</b> Carta de control de la desviación estándar S para los BFL de nitrato. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI) que en este caso es igual que el LAI. ....	45
<b>Figura 20:</b> Carta de control del promedio X para los BFL de nitrito. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI). ....	46
<b>Figura 21:</b> Carta de control de la desviación estándar S para los BFL de nitrito. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio	

central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI) que en este caso es igual que el LAI.....	46
<b>Figura 22:</b> Carta de control del promedio X para los BFL de amonio. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI).....	47
<b>Figura 23:</b> Carta de control de la desviación estándar S para los BFL de amonio. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI) que en este caso es igual que el LAI.....	48
<b>Figura 24:</b> Diagrama para la corrida de control de calidad del día 4 de mayo. Analito amonio. Se señala el grupo de muestras D (Muestra de 50 m de profundidad de la Laguna de Río Cuarto) las cuales debieron de ser diluidas en un análisis posterior.....	49
<b>Figura 25 :</b> Carta de control del promedio X para los BFL de fósforo total. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI). .....	50
<b>Figura 26:</b> Carta de control de la desviación estándar S para los BFL de fósforo total. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI)..	51
<b>Figura 27:</b> Tendencia de la concentración del analito amonio en los distintos puntos de muestreo del estero de Puntarenas. ....	61
<b>Figura 28:</b> Tendencia de la concentración del analito amonio en los distintos puntos de muestreo de la Laguna de Río Cuarto. ....	62
<b>Figura 29:</b> Diagrama del procedimiento para la determinación de nutrimentos, nitrato, nitrito, amonio y fósforo total.....	81
<b>Figura 30:</b> Diagrama de causa efecto para la cuantificación de la incertidumbre. ....	83

## ABREVIATURAS.

**FIA:** Autoanalizador por Inyección en Flujo. (Flow Injection Analysis).

**LCS:** Límite de Control Superior.

**LAS:** Límite de Advertencia Superior.

**LCI:** Límite de Control Inferior.

**LAI:** Límite de Advertencia Inferior.

**Prom:** Promedio.

**CV:** Coeficiente de Variación.

**ATP:** Adenín Trifosfato.

**NED:** N-(1-Naftil)-etilendiamina.

**LD:** Límite de Detección.

**LC:** Límite de Cuantificación.

**AE:** Adición Estándar.

**A+:** Patrón fortificado sin diluir. Sucesivamente existe B+ y C+.

**A+d:** Patrón fortificado diluido. Sucesivamente existe B+d y C+d.

**BFL:** Blanco fortificado de Laboratorio.

**St:** Estación de muestreo del Estero de Puntarenas. Numeradas sucesivamente.

**RC:** Punto de muestreo de la Laguna de Río Cuarto. Se indica la profundidad de la muestra como 0 m, 10 m hasta 50 m.

**DER<sub>R</sub>:** Desviación estándar relativa.

**NT:** Nitrógeno total.

**PT:** Fósforo total.

**ND:** No detectable.

**QC:** Control de Calidad.

**QA:** Aseguramiento de la calidad.

**NA:** No aplica.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La cuantificación por inyección de flujo (FIA por sus siglas en inglés) es una técnica que se ha utilizado por más de 30 años y fue descrita inicialmente por los daneses Jaromír Ruzicka y Elo Harald Hansen (Ruzicka y Hansen, 1975). Esta se basa en la inyección de la muestra en una fase móvil unidireccional continua, donde los reactivos son añadidos en distintos puntos de mezcla antes de llegar al detector que genera una señal transitoria proporcional a la concentración de analito en la muestra (Ruzicka y Hansen, 2000). Actualmente, se han integrado distintos detectores a estos equipos como Masas/Masas en tándem, potenciométricos y amperométricos, extendiendo así la capacidad de cuantificar diversos analitos (Saeid *et al.*, 2017) tales como especies inorgánicas (Ruzicka y Harald, 2000), principios activos en los fármacos y su eventual presencia en lípidos (Martín y Domínguez, 1999), y hasta tiene aplicaciones en metabolómica de alta eficiencia (Allen J *et al.*, 2003).

Las metodologías basadas en FIA presentan diversas ventajas debido a su relativo bajo costo de aplicación, el bajo consumo de reactivos y accesorios, su capacidad de ajuste a modelos lineales, los bajos límites de detección y cuantificación y la generación de una baja cantidad de residuos peligrosos (Hernández *et al.*, 2015).

Otra de las ventajas de utilizar un sistema FIA es que se puede realizar un análisis simultáneo de varios analitos, lo que supone un ahorro de tiempo, ya que se ha determinado que no existe una diferencia estadística significativa entre la evaluación simultánea y otros métodos estándares individuales, además de que estos equipos pueden llegar a ser totalmente automatizados facilitando así el trabajo del analista (Hosomi y Sudo, 1986).

A grandes rasgos se puede considerar la técnica FIA como un híbrido entre un sistema de flujo segmentado y un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia, las diferencias primordiales son que en el FIA existe una columna de reacción y las presiones con las que se empuja la fase móvil son menores (Kulkarni

y Vaidya, 2015).

El caso que compete a este trabajo es el de la cuantificación de nutrimentos nitrogenados y fosforados en cuerpos de agua por medio de un sistema FIA LACHAT QuickChem8500. Este equipo cuenta con varios canales específicos para cada nutrimento, los cuales llevan la muestra por medio de una fase móvil hasta un detector fotométrico de doble haz (340-880 nm) (Trojanowicz, 2015). Este equipo permite la determinación cuantitativa de diversos nutrimentos en muestras acuosas. Las condiciones operativas específicas del equipo se describen más adelante en este documento.

Un parámetro importante para evaluar la calidad de los cuerpos de agua es el grado de eutrofización, que es el aumento en la concentración de nutrimentos de las aguas superficiales (Ongley, 1997). Aquellos cuerpos de agua que acumulen grandes cantidades de nutrimentos se les llama eutróficos. Entre las consecuencias de este fenómeno se encuentran: el aumento de la producción y biomasa del fitoplancton, algas y macrofitas, modificación del hábitat de las especies acuáticas, producción de toxinas por parte de ciertas algas, desoxigenación del agua y limita el uso del agua para otros fines (Turner y Chislock, 2010). La acumulación de nutrimentos se da naturalmente, pero es usual que se asocie con factores antropogénicos como los vertidos de las aguas de lavado de sistemas agrícolas y las descargas de alcantarillados domésticos e industriales (Khan y Ansari, 2005).

Los nutrimentos están presentes en diferentes formas en los cuerpos de aguas y solamente las formas inorgánicas disueltas se encuentran disponibles para los productores primarios (microalgas) (Margalef, 1982). El fósforo en el agua existe en forma disuelta soluble y particulada insoluble siendo el orto fosfato la forma disuelta más importante y que está más disponible para las algas y las plantas (Jonge y Elliot, 2002). Una parte del fósforo particulado se encuentra contenido en la materia orgánica, es por eso que para encontrar un valor de fósforo total (especies disueltas y particuladas) se debe realizar un proceso de digestión a las muestras para liberar el ortofosfato y cuantificarlas en un único proceso analítico. Esta digestión se realizaba años atrás con ácido perclórico (Strickland y Parsons, 1972) pero otros autores han encontrado que se puede realizar de forma más segura con

persulfato de potasio y ácido sulfúrico en autoclave (Gross y Boyd, 1998). Este último procedimiento de digestión fue el que se aplicó ya que el equipo utilizado tiene un sistema de digestión en línea pero que en el momento de realización de este trabajo no se encontraba conectado por falta de soporte técnico de la casa comercial proveedora.

Los niveles de nitratos y nitritos se encuentran relacionados con el ciclo del nitrógeno del suelo y plantas superiores, los niveles de nitrato están relacionados también con la adición de fertilizantes. Los nitritos se forman durante la biodegradación del amonio u otros compuestos orgánicos nitrogenados por la acción de distintos microorganismos y se utiliza como indicador de contaminación fecal en aguas naturales (Molina et al., 2003).

Al realizar la cuantificación del nitrógeno y fósforo en los cuerpos de agua los investigadores pueden generar un modelo biogeoquímico para así entender la dinámica de los flujos de materiales debido a los aportes de distintas fuentes. Básicamente se realiza un balance de la materia orgánica e inorgánica que ingresa y sale del sistema, y así se establece una tasa de intercambio y de transformación de las sustancias involucradas, todo esto con el fin de conocer si las diferencias se pueden adjudicar a comportamientos antropogénicos o estacionales, y relacionarlo con cambios que se observen en el ecosistema (Tabash, 2006). Los modelos biogeoquímicos pueden integrar otras variables, como la salinidad, concentración de clorofilas, turbidez, concentración de silicato y fosfatos entre otras, esto según el criterio del investigador para cada caso específico (Epifanio *et al.*, 1983).

En Costa Rica el decreto ejecutivo N° 33601-MINAE-S, Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales, exige la determinación de nitrógeno y fosfato como parámetro de análisis complementario para aquellas que realicen actividades de ganadería, producción de animales, pesca en aguas interiores, cría de peces y aves.

Se debe reconocer la tendencia actual de los laboratorios analíticos de integrar criterios de aseguramiento de la calidad (QA) a sus procesos, que son toda la gama de medidas que se llevan a cabo para garantizar que se dan resultados fiables y que así sean útiles para generar criterios y tomar decisiones. Verificar un

método es investigar si el propósito analítico de este se cumple. Además del uso de metodologías verificadas se pueden aplicar otras medidas de QA como lo son el uso de estándares de referencia, cartas de control, participación en rondas interlaboratoriales, acreditación entre otras (Taverniers *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo es el de evaluar las metodologías de análisis de los nutrimentos: amonio, nitrato, nitrito y fósforo total que se aplican rutinariamente y así establecer si estas son aptas para el propósito indicado, esto como primer paso para implementar un sistema de gestión de calidad en el Laboratorio de Oceanografía Química del CIMAR.

## **2. MARCO TEÓRICO.**

### **2.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS NUTRIMENTOS EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS.**

#### **Fósforo y especiación.**

El fósforo existe naturalmente en los cuerpos de agua de diferentes formas, como ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), metafosfato, polifosfato y fosfato orgánicamente ligado a otros compuestos. Los minerales, principalmente la apatita [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$ ] y sus variaciones como hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5[\text{OH}][\text{PO}_4]_3$ ) y fluoroapatita ( $\text{Ca}_5[\text{PO}_4]_3\text{F}$ ), aportan este nutrimento mediante el proceso de escorrentía natural. (Jonge y Elliot, 2002). El ser humano también agrega distintas formas de fosfato mediante los fertilizantes y algunos detergentes de uso doméstico y agrícola. Además, cantidades pequeñas de fosfatos condensados se adicionan por tratamientos anticorrosivos de aguas de calderas. (Yihua y Laodong, 2009).

En los ecosistemas acuáticos, la forma más relevante del fósforo es el ortofosfato, ya que es la más soluble y asimilable para los productores primarios; por ello se le nombra como fósforo soluble reactivo (Roldán y Ramírez, 2008).

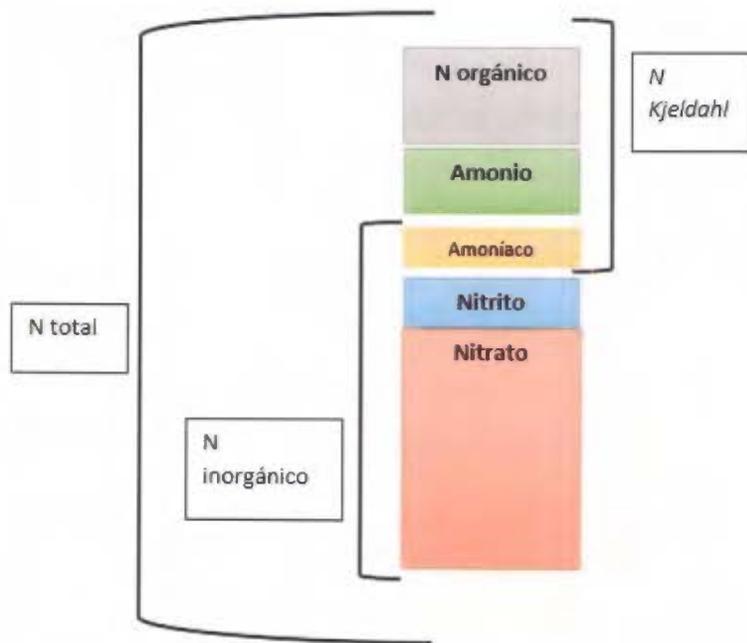
Quienes se interesan por los ecosistemas marinos suelen realizar estudios para cuantificar el fósforo inorgánico con el fin de modelar el crecimiento del

fitoplancton y para seguir flujos geoquímicos de los nutrientes hacia las aguas superficiales (Guildford *et al*, 2000).

### Nitrógeno y especiación.

El nitrógeno es uno de los componentes principales de las proteínas como base estructural de los seres vivos. Este puede presentarse en los ambientes acuáticos como nitratos, nitritos, amonio, óxidos de nitrógeno, nitrógeno molecular y ciertas especies orgánicas como péptidos, purinas, aminas y aminoácidos. De estos, el nitrato y el ion amonio son los nutrientes que limitan el crecimiento para las plantas y algas que se encuentran en el medio (Roldán y Ramírez, 2008).

En la figura 1 se muestra la distribución de las distintas formas de nitrógeno que se pueden encontrar en la columna de agua. (Camargo, 2006).



**Figura 1:** Diagrama de distribución relativa de la concentración de las distintas especies nitrogenadas en la columna de agua. Modificado de Camargo 2006.

El nitrógeno que se cuantifica por medio del método Kjeldahl incluye el nitrógeno orgánico y amoniacal, dejando por fuera a las formas inorgánicas de nitrato y nitrito. El nitrógeno total es la suma de todas las formas de nitrógeno. La distribución de estos analitos se modifica según la influencia de diversos factores como: la proximidad de fuentes de contaminación; influencia de corrientes de surgencia; diferencias de temperatura y disponibilidad de oxígeno según la profundidad entre otros factores (Camargo, 2006).

**Criterios para determinar el grado de eutrofización de un cuerpo de agua.**

Existen distintos criterios para caracterizar un cuerpo de agua según su estado de eutrofización. Vollenweider (1968) propone un criterio de clasificación según la concentración de fósforo total y las distintas especies nitrogenadas solubles. En el Cuadro I y II se muestran los ámbitos de concentración que conforma este criterio.

**Cuadro I:** Clasificación de los cuerpos de agua según el contenido de nitrógeno en sus tres formas según Vollenweider 1968.

<b>Estado trófico.</b>	<b>Amonio (mg/L).</b>	<b>Amonio (µmol/L)</b>	<b>Nitratos (mg/L).</b>	<b>Nitratos (µmol/L)</b>	<b>Nitritos (mg/L).</b>	<b>Nitritos (µmol/L)</b>
<b>Oligotrófico.</b>	0,0-0,3	0,0-16,6	0,0-1,0	0,0-16,1	0,0-0,5	0,0-10,9
<b>Mesotrófico.</b>	0,3-2,0	16,6-110,9	1,0-5,0	16,1-80,5	0,5-5,0	10,9-108,7
<b>Eutrófico.</b>	2,0-15,0	110,9-832,0	5,0-50,0	80,5-806,0	5,0-15,0	108,7-326,1

**Cuadro II:** Clasificación de los cuerpos de agua según el contenido de fósforo total según Vollenweider 1968.

<b>Estado Trófico.</b>	<b>Fósforo total (µg/L).</b>
<b>Ultraoligotrófico.</b>	<5
<b>Oligomesotrófico.</b>	5-10
<b>Mesoeutrófico.</b>	10-30
<b>Eupolitrófico.</b>	30-100
<b>Politrófico.</b>	>100

Estas clasificaciones se pueden complementar con la determinación de otros parámetros in situ, como el oxígeno disuelto, el pH, y parámetros ex situ como la concentración de clorofila a y la concentración de sedimentos suspendidos (Grasshoff, 1995).

### **Desarrollo de modelos biogeoquímicos.**

Para establecer la dinámica de un cuerpo de agua se construye un modelo biogeoquímico que va a estar definido por distintos parámetros como, la salinidad, la precipitación, incidencia de radiación solar y la cuantificación de la materia orgánica e inorgánica y posterior realización de un balance de masa. Este modelo permite estimar la variabilidad de los procesos verticales que se encuentran en el sistema como lo es la suspensión de sedimento, surgencias, procesos de mezcla vertical, aportes de ríos y el aporte atmosférico en un período de tiempo definido (Tabash, 2006).

Un ejemplo de modelo biogeoquímico es el propuesto por Broecker y Penn (1982) que relaciona los flujos de agua y el ingreso de NaCl en los cuerpos de agua salada con dos elementos biolimitantes que son el nitrógeno y el fósforo inorgánico

disuelto. Este modelo básico eventualmente permite arrojar conclusiones de los procesos biológicos que se desarrollan en el cuerpo de agua, como lo son los niveles de producción primaria (variación en la concentración de clorofila a) y épocas de madurez y reproducción de especies de ciclo de vida corto y largo (Krees *et al.*, 1997).

## 2.2 PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO DE LOS EQUIPOS DE ANÁLISIS EN FLUJO (FIA). ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO QUICKCHEM FIA LACHAT 8500.

El Análisis por Inyección en Flujo o FIA, es un método muy eficiente que se utiliza para automatizar el análisis de muchas muestras, que se realizan rutinariamente en un espectrofotómetro UV Vis. La muestra líquida se inyecta a un flujo continuo de agua desionizada, la cual es transportada hacia el módulo de reacción, en el cual se da una mezcla y calentamiento en un reactor para después ser llevada al detector fotométrico, que continuamente genera una señal de potencial. Los métodos de FIA estudiados en este trabajo se basan en ensayos colorimétricos continuos (Kulkarni y Vaidya, 2015).

La ley de Beer es la que rige el comportamiento del detector, que compara la intensidad de la luz cuando no hay material presente en la celda y la intensidad de luz al pasar el “carrier” con la muestra. Así se define la ecuación siguiente:

$$\log \left[ \frac{I_0}{I} \right] = abc \quad (1)$$

Donde  $a$  es la constante de absortividad,  $b$  es el ancho de la celda,  $c$  indica la concentración,  $I_0$  la intensidad inicial del haz y  $I$  la intensidad del haz que recibe el detector después de que atraviesa la muestra.

Dos términos usualmente utilizados en el análisis espectrofotométrico son la transmitancia  $T$  y la absorbancia  $A$ , y se definen por las ecuaciones siguientes.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

$$A = \log \left[ \frac{1}{T} \right] = \log \left[ \frac{I_0}{I} \right] = abc \quad (3)$$

La señal de absorbancia es multiplicada por un factor de 5 en el amplificador logarítmico del detector. El voltaje también se traduce en una señal digital para que se muestre una señal-pico en el software.

$$\text{Voltaje} = 5A \quad (4)$$

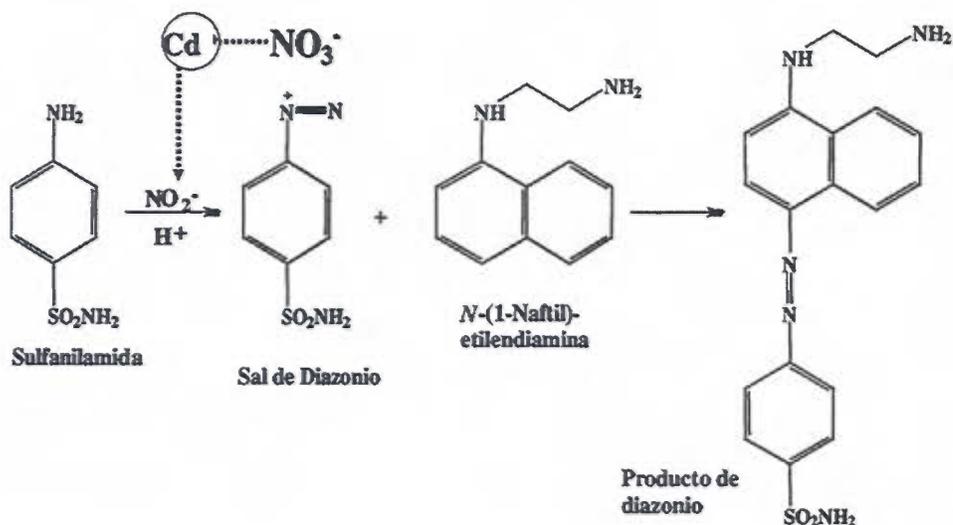
Donde  $A$  es la absorbancia (QuickChem training manual, 2008).

Para cada uno de los métodos existen variaciones en la razón de flujo de la muestra/carrier, longitud del tubo y la cantidad de muestra inyectada. Estos parámetros han sido definidos por el fabricante y se integran al funcionamiento del equipo según las necesidades del método. Los diagramas del equipo específicos para cada analito se muestran en las figuras 3, 5 y 6 (Lachat components, 2008).

### 2.3 DETERMINACIÓN DE LAS FORMAS DE NITRÓGENO EN EL AGUA CON EQUIPO DE ANÁLISIS EN FLUJO.

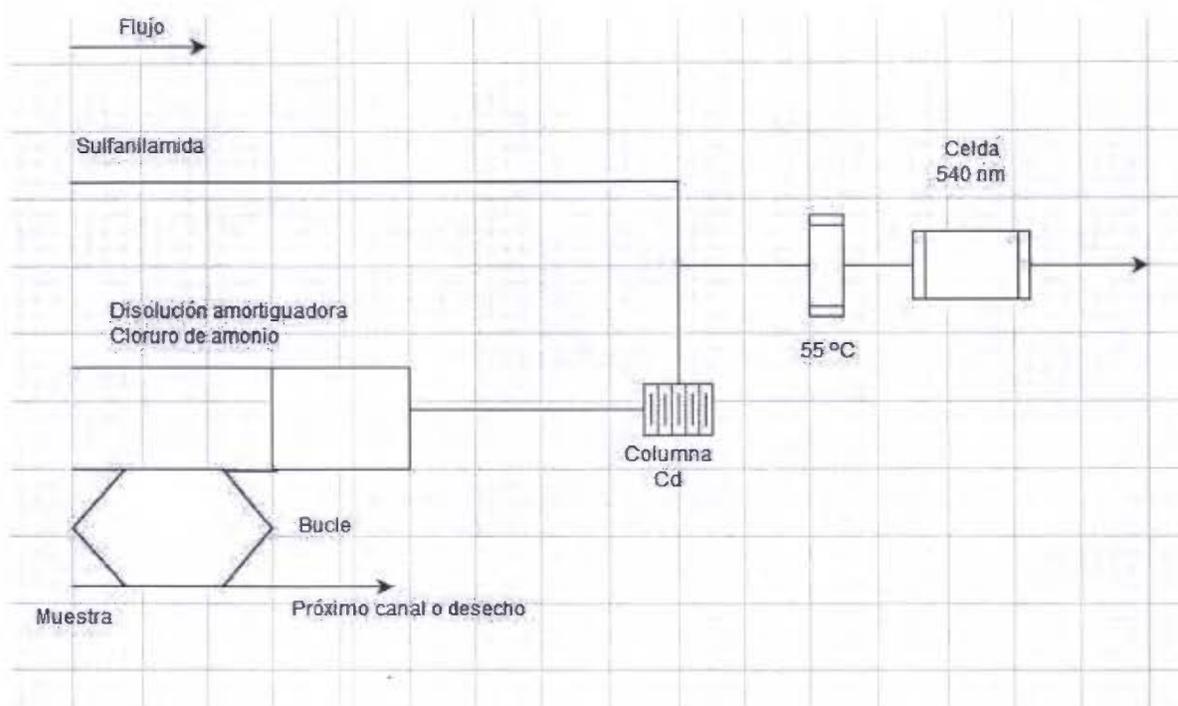
#### A. Reacción de Griess para análisis simultáneo de nitrato y nitrito.

El método más utilizado para la determinación simultánea de nitrato y nitrito en aguas u otras matrices como en plasma, suero sanguíneo u orina (Gragner *et al*, 1996) es por medio de los reactivos de Griess y su detección colorimétrica. Esta reacción se conoce desde 1879 (García *et al.*, 2014) y ha sido adaptada en el diseño del equipo de análisis en flujo. En la figura 2 se describe el mecanismo de esta reacción.



**Figura 2:** Mecanismo de la reacción de Griess para la determinación simultánea de nitrito y nitrato (Miranda, 2001).

La sulfanilamida en medio fuertemente ácido y en presencia de la especie nitrito forma una sal de diazonio para después dar la formación del cromóforo con la N-(1-Naftil)-etilendiamina (NED). El producto de diazonio es detectado a una longitud de onda de 540 nm y así se cuantifica únicamente al nitrito. Para la cuantificación de la especie nitrato se debe dar la reducción de éste a nitrito por medio de una columna de cadmio puesta en línea previa formación de la sal de diazonio. Entonces el software del equipo da como resultado una señal, que incluye ambas especies, y haciendo la resta del valor de las señales se obtiene únicamente la de la especie nitrato (Miranda, 2001). En la figura 3 se muestra el diagrama de flujo respectivo para el analito nitrato. Para el nitrito la única diferencia es que no existe la columna de cadmio.



**Figura 3:** Diagrama de flujo de la muestra en el equipo FIA para la reacción de Griess (QuickChem training manual, 2008).

Las condiciones operativas de este canal son las siguientes:

**Carrier:** Agua desionizada.

**Tubos del manifold:** 0,8 mm de diámetro interno. Flujo de 5,2  $\mu\text{L}/\text{cm}$ .

**Bucle de muestra:** 150 cm x 11 mm de diámetro interno.

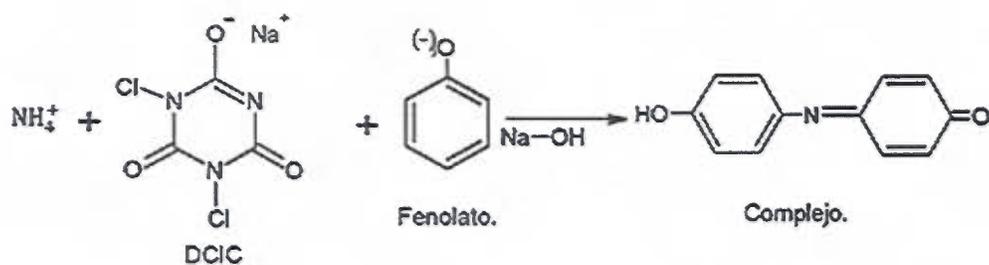
**Bucle QC8000:** 150 cm x 11 mm de diámetro interno.

**Filtro de interferencia:** 540 nm

#### B. Reacción de Berthelot para determinación de amonio.

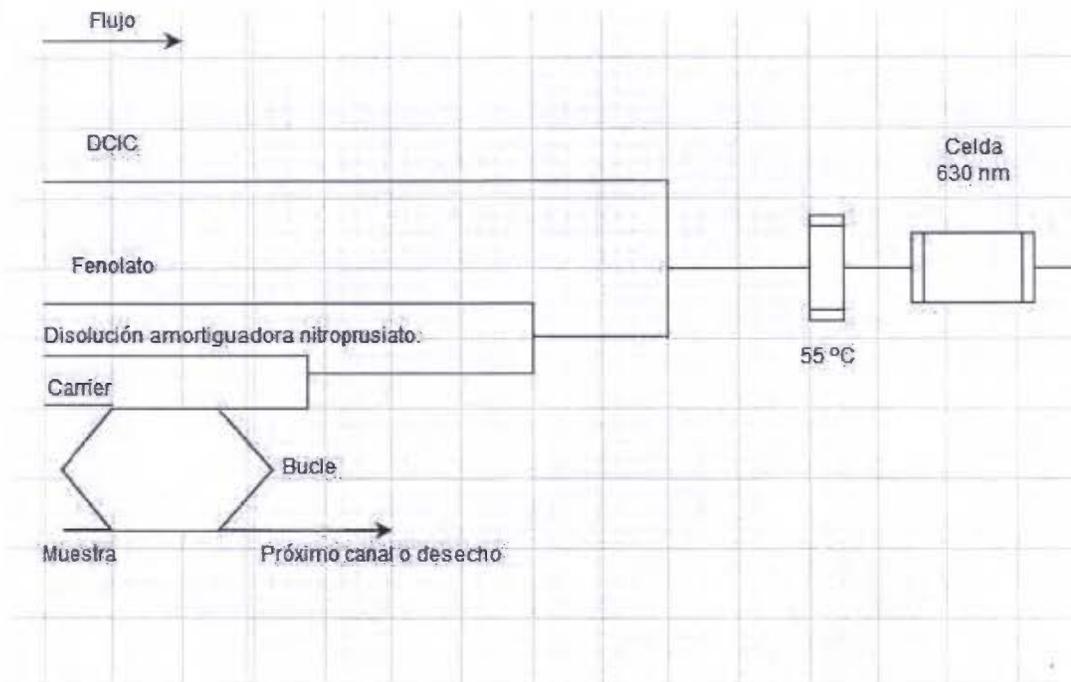
El desarrollo de color bajo esta técnica involucra a los reactivos, nitroprusiato de sodio con fenol y una fuente de cloro (dicloroisocianuro, DCIC) en medio básico tal y como se muestra en la figura 4. En el equipo de análisis en flujo, esta reacción ha sido optimizada para para que se de en un colector (módulo de reacción) a 55 °C

(Weatherburn, 1967), una vez producida la mezcla de las muestras con las disoluciones reactivas, esta llega a una celda en la cual la disolución absorbe una longitud de onda de 630 nm, generada por una lámpara de tungsteno. Esta longitud de onda se obtiene por un filtro de interferencia que aísla la longitud del espectro UV/Vis (Quick Chem training manual, 2008).



**Figura 4:** Mecanismo de la reacción de Berthelot para la determinación de amonio (Weatherburn, 1967).

En la figura 5 se muestra el diagrama de flujo del canal para la cuantificación de la especie amonio.



**Figura 5:** Diagrama de flujo de la muestra en el equipo FIA para la reacción de Berthelot (Lachat training manual, 2015).

Las condiciones operativas de este canal son las siguientes:

**Carrier:** Agua desionizada.

**Tubos del manifold:** 0,8 mm de diámetro interno. Flujo de 5,2  $\mu\text{L}/\text{cm}$ .

**Bucle QC8500:** 300 cm x 11 mm de diámetro interno.

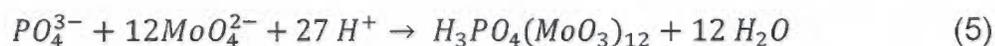
**Filtro de interferencia:** 630 nm

## 2.4 DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO TOTAL EN EL AGUA CON EQUIPO DE ANÁLISIS EN FLUJO.

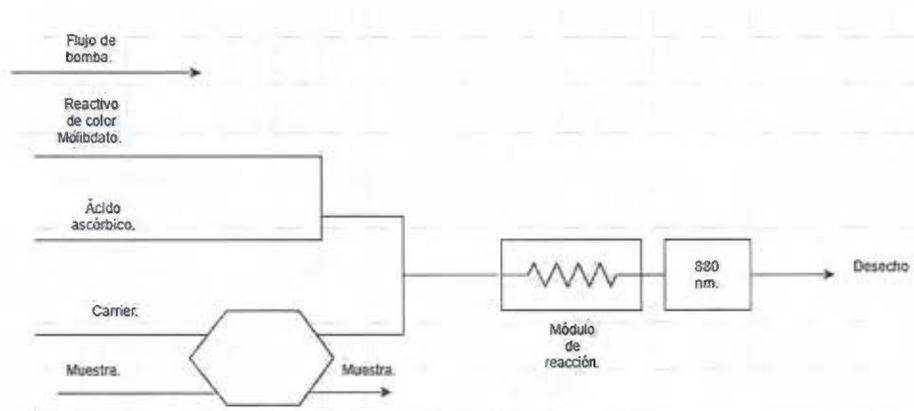
- A. Reacción de azul de molibdeno junto con oxidación alcalina con persulfato de potasio.

Para la determinación del ion fosfato se aplica la reacción del azul de molibdeno. Esta ocurre en dos etapas sucesivas, la primera es la formación del ion Keggin (óxido de molibdato (VI)) alrededor del analito en medio muy ácido (pH entre 0 y 1), para después dar la reducción del heteropoliácido con ácido ascórbico para formar

un compuesto azul profundo, (Nagul, 2015). Este compuesto azul es llevado por el sistema de flujo hasta una celda portadora, en la que la disolución absorbe a una longitud de onda de 880 nm generada por una lámpara de tungsteno. Esta longitud de onda se obtiene por un filtro de interferencia que aísla la longitud del espectro UV/Vis (Johnson y Petty, 1982). La especie formada es conocida como 12-ácido molibdofosfórico (12-MPA). Las reacciones respectivas se indican en (5) y (6).



En la figura 6 se muestra el diagrama de flujo del canal para la cuantificación de la especie fosfato.



**Figura 6:** Diagrama de flujo de la muestra en el equipo FIA para la reacción de determinación de fosfato (Lachat training manual, 2015).

Las condiciones operativas del equipo son las siguientes:

**Carrier:** Agua desionizada.

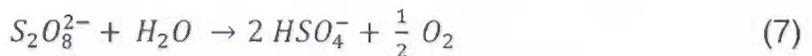
**Tubos del manifold:** 0,5 mm de diámetro interno. Flujo de 2,5 µL/cm.

**Bucle QC8500:** 300 cm x 0,8 mm de diámetro interno.

**Filtro de interferencia:** 880 nm

La aplicación de este método ha sido extendida para determinar todas las formas de fósforo en muestras sin filtrar, realizando previamente un tratamiento de oxidación térmica a alta presión en medio alcalino, dicho procedimiento se puede

realizar fuera de línea en una autoclave (Koroleff, 1977). El procedimiento de oxidación alcalina con persulfato de potasio pretende oxidar todas las formas de fósforo orgánico e inorgánico, para que se genere la especie ortofosfato y así, obtener una recuperación satisfactoria de ortofosfato a un del pH final ideal menor a 2,2 (pH < 2,2). Bajo estas condiciones ácidas, el fósforo disuelto y suspendido hidrolizan a ortofosfato. Mientras se desarrolla la digestión, los iones bisulfato generados en la descomposición del persulfato primero neutralizan y después acidifican la mezcla y se da la reacción (7) (Patton y Kryskalla, 2003).



## 2.5 POSIBLES INTERFERENCIAS EN LA MATRIZ.

En todos los métodos aplicados en el FIA se utiliza agua desionizada, tanto para el carrier, la preparación de los patrones y las disoluciones de los reactivos. Cuando se analizan muestras de agua de mar de salinidad variable, existe la posibilidad de que se dé un efecto de incompatibilidad entre muestra/carrier, que resulta en la aparición de ruido en la línea base por la diferencia en el índice de refracción. Este fenómeno también se puede dar con muestras que se sometieron a un proceso de digestión previo al análisis. La inyección de una cantidad de muestra relativamente grande permite omitir estas señales de ruido generados por medio de la integración selectiva del software Omnion®. También la rápida respuesta del equipo minimiza el efecto de la diferencia en el índice de refracción. Aun así, este efecto varía según la longitud de onda del análisis y la concentración del analito. El efecto puede ser más significativo a longitudes de onda bajas como 520 o 540 nm (nitrato-nitrato) que para longitudes altas 880 nm (fosfato). (Brakish integration Lachat, 2014).

La intensidad del color de los complejos es muy sensible al pH, es por eso que las muestras tienen que estar en un ámbito de pH de 5-7, a excepción de las muestras de fósforo total, que pueden llegar a tener un pH de 2. Si hay muestras turbias o con algún precipitado remanente estas deben de ser filtradas antes de ser

analizadas, ya que se sigue la misma lógica que cualquier método espectrofotométrico en el cual la muestra debe ser lo más homogénea posible para evitar desviaciones en el camino del haz de luz (Ammonia USEPA FIA, 2010).

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

- Evaluar las metodologías de determinación de fósforo total, nitrato, nitrito, y amonio en aguas dulces y salobres según los lineamientos establecidos en la guía EURACHEM 2014.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Formular un diseño experimental adecuado para cada uno de los parámetros de mérito necesarios para probar la idoneidad de las metodologías, en ambas matrices.
- Establecer criterios para el control de calidad de los resultados dados por las metodologías implementadas.
- Realizar un muestreo en un cuerpo de agua dulce y otro salobre, para realizar la verificación de los métodos utilizando muestras ambientales representativas.

#### 4. METODOLOGÍA.

##### Propósito y alcance:

Cada una de las metodologías normalizadas aplicadas en el Laboratorio de Oceanografía Química CIMAR-UCR están descritas en el manual de Procedimientos Operativos Normalizados PON-CIMAR LOQ 2014, allí se encuentran los procedimientos para la determinación de los nutrimentos, nitrato, nitrito, amonio y fósforo total, en las matrices de agua dulce, de mar y estuarinas.

Se realizaron dos muestreos con la finalidad de obtener muestras ambientales de un cuerpo de agua dulce y otro salobre, específicamente en la Laguna de Río Cuarto el 17 de noviembre de 2017 y en el estero de Puntarenas el 13 de octubre del 2017, respectivamente. La Laguna de Río Cuarto es un cráter volcánico que se encuentra en la provincia de Alajuela a 8 km al noreste de San Miguel de Sarapiquí, tiene una superficie de 33,3 ha y una profundidad de 66 m (Alvarado G, 2008). El muestreo se realizó en un punto central de la laguna con un perfil vertical, cada 10 m desde la superficie, para un total de 5 profundidades. En la figura 7 se muestra la ubicación geográfica de este sitio de muestreo con coordenadas 10°20'32"N 84°12'55"O.



**Figura 7:** Sitio de muestreo de la Laguna de Río Cuarto. Ubicación según Google Earth.

En el Estero de Puntarenas se realizó un transecto horizontal en función del gradiente de salinidad, se colectaron muestras en 6 sitios, a dos profundidades en cada sitio, una en la superficie y otra cerca del fondo. En la figura 8 se muestra la ubicación de este sitio de muestreo.



**Figura 8:** Puntos de muestreo del estero de Puntarenas. Ubicación según Google Earth.

Las coordenadas de los distintos puntos de muestreo del estero de Puntarenas se muestran en el cuadro III.

**Cuadro III:** Coordenadas de los puntos de muestreo en el estero de Puntarenas.

Punto de muestreo.	Coordenadas.
St1	9° 58' 49.18" w 84° 50' 22.8"
St2	9° 58' 51.93" w 84° 50' 46.85"
St3	9° 58' 56.77" w 84° 50' 00.26"
St4	9° 58' 59.01" w 84° 49' 13.53"
St5	9° 59' 02.33" w 84° 48' 19.80"
St6	9° 58' 51.72" w 84° 47' 14.17"

La determinación de fósforo total en agua se realizó por medio de una oxidación con persulfato de potasio en autoclave seguido por la determinación colorimétrica del complejo de fosfomolibdato y su subsecuente reducción a un compuesto de color azul (Ebina *et al.*, 1982). La determinación de amonio se realizó por medio de la formación de azul de indofenol catalizado por el nitroprusiato de sodio (Worlfsfold *et al.*, 1995). Y para la determinación de nitrato y nitrito se utilizan los reactivos de Griess que son sulfanilamida + N-(1-naftil)-etilendiamina, con la reducción de nitrato a nitrito por medio de una columna de cadmio (Pasquali *et al.*, 2007).

Estos métodos se sometieron a un procedimiento de evaluación de las características analíticas de selectividad, límite de cuantificación y detección, rango de trabajo, sensibilidad, veracidad, precisión, determinación de la incertidumbre, robustez y se aplicaron las pruebas de significancia estadística necesarias.

### **Materiales y reactivos.**

Para la preparación de las disoluciones reactivas, disoluciones madre, disoluciones intermedias y patrones se utilizó agua desionizada de resistencia 18,2  $\Omega$ .

### **Reactivos para la determinación de fósforo total.**

1. Ácido ascórbico, calidad analítica:  $C_6H_8O_6$
2. Ácido sulfúrico concentrado,  $H_2SO_4$ .
4. Dodecil sulfato de sodio (SDS),  $C_{12}H_{25}NaO_4S$
- 5 p-molibdato de amonio tetrahidratado,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ , en cristales finos y calidad analítica.
- 6 Tartrato de antimonio y potasio (TAP):  $C_4H_4KO_7Sb$ .
- 7 Hidróxido de sodio.

- 8 Persulfato de potasio Merck, certificado libre de nitrógeno.
- 9 Mezcla digestiva: 12,50 g de Persulfato de Potasio + 0,50 g de Tetraborato de sodio. Se lleva a pH=9 con hidróxido de sodio 1+1.

**Reactivos para la determinación de nitrato-nitrito.**

1. Hidróxido de sodio de sodio, calidad analítica, NaOH.
2. Cloruro de amonio, NH<sub>4</sub>Cl.
3. Ácido etilendiaminotetraacético dihidratado, calidad analítica, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> · 2H<sub>2</sub>O.
4. Diclorhidrato de N-(1-naftil)etilendiamina (NED), H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC<sub>10</sub>H<sub>7</sub> · 2HCl.
5. Sulfanilamida, H<sub>2</sub>NOOSC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>.
6. Ácido fosfórico concentrado al 85%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

**Reactivos para la determinación de amonio.**

1. Dicloroisocianurato de sodio, C<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>.
2. Fenol, calidad analítica, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH.
3. Hidróxido de sodio, calidad analítica, NaOH.
4. Nitroprusiato de sodio dihidratado, Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO] · 2H<sub>2</sub>O.
5. Ácido etilendiaminotetraacético dihidratado, calidad analítica, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> · 2H<sub>2</sub>O.

**Patrones primarios.**

En los cuadros IV y V se indican los reactivos utilizados para preparar los patrones y fortificaciones con su respectiva pureza y número de lote.

**Cuadro IV:** Patrones primarios utilizados para las fortificaciones de veracidad y adiciones estándar.

<b>Analito</b>	<b>Marca</b>	<b>Lote</b>	<b>Pureza (%)</b>
<b>Nitrito de sodio.</b>	Fluka.	B0BP4739	99,999
<b>Nitrato de potasio.</b>	Merck.	B145216574 9	99,995
<b>Cloruro de amonio.</b>	Fermont.	530501	99,70
<b>ATP sal disódica*.</b>	Sigma Aldrich.	57F-7100	99,99

\*Usado para los experimentos de adiciones y recuperaciones de fósforo total.

**Cuadro V** Patrones primarios utilizados en la preparación de las disoluciones.

<b>Analito</b>	<b>Marca</b>	<b>Lote</b>	<b>Pureza (%)</b>
<b>Nitrito de potasio.</b>	Sigma Aldrich.	05529C	99,999
<b>Nitrato de sodio.</b>	Fisher.	745948	99,58
<b>Cloruro amonio</b>	IOBA Chemie.	B18819Z1603	99,999
<b>Dihidrógeno fosfato de sodio</b>	Merck.	B0061408803	99,999

### Parámetros de desempeño.

Basado en la Guía Eurachem 2014 y otras referencias se definieron los siguientes parámetros a evaluar con su respectivo criterio de aceptación en el cuadro VI.

**Cuadro VI:** Parámetros de evaluación y criterio de aceptación.

<b>Parámetro.</b>	<b>Criterio.</b>
Linealidad	Verificación de coeficiente de correlación barras de error.
Límite de cuantificación y detección	Determinado por método de Meir y Zünd, calculando el error de la pendiente y del intercepto.
Veracidad	Recuperaciones de los niveles fortificados (80- 120) %
Precisión en términos de repetividad	Desviación estándar relativa de las muestras ( $DER_R \leq 20\%$ )
Precisión en términos de reproducibilidad	Criterio según las cartas de control Recuperaciones de los BFL (80- 120) %

**Fuente:** Elaboración propia a partir de criterios establecidos en la guía Eurachem 2014 y otras fuentes.

### **Evaluación de parámetros.**

La secuencia en que se evaluaron cada uno de los parámetros fue la siguiente:

1. Curva de calibración en agua desionizada + blancos.
2. Curva de calibración en agua salobre a distintas salinidades + blancos.
3. Adiciones estándar con muestra de agua dulce y agua salobre + blancos.
4. Fortificación de muestras a nivel alto, medio y bajo en muestras de agua dulce y salobre + blancos.
5. Análisis de las muestras junto con blancos fortificados como control + blancos. Control de calidad del método.

Esta secuencia se llevó a cabo en días distintos y aplicó también para la determinación de fósforo total, con la salvedad de que en ésta se agregó la mezcla

oxidante en una proporción 4:1, tanto para las muestras, patrones y blancos fortificados y se realizó el proceso de digestión, que consistió en trasvasar todas estas disoluciones a tubos Falcon de polipropileno de 50 ml, luego colocarlas en un autoclave en donde se sometió las muestras a una temperatura de 121 °C y 200 kPa de presión, por aproximadamente dos horas.

#### **Linealidad. Curva de calibración en agua desionizada.**

Para evaluar la linealidad de los métodos se prepararon curvas de calibración en agua desionizada dentro del ámbito de linealidad esperado  $\pm 20$  % de concentración del patrón más alto y bajo. Se aplicó el criterio de linealidad del cuadro VI (Yan, 2009).

#### **Efecto matriz. Efecto de la variación de la salinidad.**

Se prepararon curvas de calibración a distintas salinidades únicamente con NaCl, en un rango de concentración aproximado de 0,0 a 20,0  $\mu\text{mol/L}$  para cada especie nitrogenada. Las salinidades se dan unidades de ups (unidades prácticas de salinidad), donde 35 g NaCl en 1000 ml de agua es una disolución de salinidad 35 ups, 25 g NaCl en 1000 ml de agua es de 25 ups y así sucesivamente. Se realizaron seis curvas distintas a salinidad a 35, 25, 15, 10, 5 y 0 ups. Se realizó un ANOVA donde se propuso como hipótesis nula que las varianzas de los pares de datos (la diferencia entre el valor de la señal y concentración sucesivas) para cada curva no eran diferentes entre sí. (Grasshoff, 1995)

#### **Efecto matriz. Adiciones estándar.**

Con una muestra de agua dulce y otra salobre, se adicionó una concentración conocida de cada uno de los analitos de una concentración más alta a una más baja. Se obtuvo una curva de adición de 7 patrones en un rango de concentración adicionada aproximado de 0,0 a 14,0  $\mu\text{mol/L}$  para cada analito. Se realizó lo mismo, pero diluyendo la muestra de la laguna Río Cuarto en agua desionizada y la muestra del estero en agua de mar artificial. Se utilizó la muestra de la estación 3 superficial del estero de Puntarenas y la muestra de la laguna de Río Cuarto de profundidad

10 m. Se realizó un ANOVA de un factor donde se propuso la hipótesis nula de que en las varianzas de los pares de datos (la diferencia entre el valor de la señal y concentración sucesivas) para cada curva no había diferencias entre sí (Graham y Paramjit, 1999).

### **Veracidad.**

Se preparó una curva de calibración en agua desionizada dentro del rango de linealidad esperado  $\pm 20\%$  de concentración del patrón más alto y más bajo. Se realizaron las fortificaciones por triplicado a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto) para cada una de las muestras. Se midieron también 7 réplicas independientes de la muestra sin fortificar. Se obtuvo el porcentaje de recuperación según la ecuación (1). (Fuentes & Monge, 2015).

$$\%Recuperación = \frac{C_{Fortificado} - C_{inicial}}{C_{adicionada}} * 100\% \quad (8)$$

### **Análisis de muestras. Control de calidad del método.**

Se preparó una curva de calibración externa en agua desionizada dentro del rango de linealidad esperado  $\pm 20\%$  de concentración del patrón más alto y bajo. Se prepararon los blancos fortificados de laboratorio, estos son un patrón con los analitos en una concentración conocida, se prepararon 2 grupos con 3 repeticiones independientes cada uno. Los BFL se utilizaron también para evaluar la eficiencia de reducción de la columna de cadmio, y la recuperación de cada uno de los analitos durante los análisis. Después se analizaron 4 muestras distintas (las cuales se etiquetaron como grupo A, B, C y D respectivamente) con 5 repeticiones independientes cada una, algunas de estas se diluyeron con agua desionizada por tener una concentración alta de amonio. Se leyeron también 2 grupos de blancos con 3 réplicas independientes cada una (Navidi, 2015). Se definió entonces el análisis de muestras en el siguiente orden:

1. Curva de 8 patrones, leídos una sola vez.
2. Primer grupo de blancos, con 3 repeticiones independientes.

3. Grupo de dos muestras, con 5 repeticiones independientes para cada muestra.
4. Primer grupo de blancos fortificados de laboratorio, con 3 repeticiones independientes.
5. Segundo grupo de muestras, con 5 repeticiones independientes para cada muestra.
6. Segundo grupo de blancos fortificados de laboratorio, con 3 repeticiones independientes.
7. Segundo grupo de blancos, con 3 repeticiones independientes.

Para un total de 40 tubos por día de análisis, que se realizó en un período de tiempo de 3 horas 30 minutos aproximadamente.

Se construyeron las cartas de control para la desviación estándar  $\bar{s}$  que se usaron para evaluar la variabilidad del proceso y la carta  $\bar{x}$  para la media del proceso con los datos obtenidos para los BFL.

En el procedimiento de las cartas de control se planteó una hipótesis nula la cual es que el proceso está bajo control estadístico. Los puntos que queden fuera de los límites serán evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Para definir los límites para S se asume que todas las muestras analizadas vienen de una población con media  $\mu$  y desviación estándar  $\sigma$ , entonces existen dos cantidades:  $\mu_s \pm 3\sigma_s$  así se puede estimar una cantidad con constantes cuyos valores dependen del tamaño de la muestra. Dichos valores están tabulados y se aplican para generar los límites estadísticos (Navidi, 2015).

Para el caso de la carta de control  $\bar{x}$ , se aplica lo mismo que en las cartas  $\bar{s}$  solamente que se trabaja con  $\mu_x \pm 3\sigma_x$ .

También se calculó la precisión en términos de repetividad y la precisión en términos de reproducibilidad, en los diferentes días de los análisis.

### **Robustez.**

#### **a) Procedimiento para evaluar la eficiencia de la columna para determinación de nitrato:**

- Se preparó un estándar de concentración conocida nitrato N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y se realizó la cuantificación.
- Se preparó un estándar de concentración conocida nitrito N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y se realizó la cuantificación.

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{[NO_3^-]}{[NO_2^-]} \cdot 100 \quad (9)$$

El criterio de aceptación es que exista una eficiencia mayor o igual al 90% (Yaqoob *et al.*, 2013). Se realizaron 6 patrones de concentración conocida (BFL) y se determinó un promedio de eficiencia.

También se evaluó la eficiencia del procedimiento de digestión de las muestras para la determinación de fósforo total.

#### **b) Procedimiento para evaluar la eficiencia de la digestión de las muestras para el analito fósforo total:**

1. Se prepararon patrones de concentración conocida de un compuesto fosforado ATP de pureza conocida.
2. Se llevó cabo el proceso de digestión en autoclave, en el ciclo de líquidos que tomaba alrededor de 2 horas con el oxidante fuerte persulfato de potasio de calidad analítica. Este proceso de digestión consistió en añadir una proporción muestra-oxidante de 4:1. Esto aplica tanto para los patrones de la curva, las muestras, los BFL y los blancos. Una de las mezclas oxidantes evaluadas fue la propuesta según el PON del CIMAR, que es 12,50 g de persulfato de Potasio más 0,50 g de Tetraborato de sodio decahidrato a pH

9. Una segunda variación probada de este oxidante fue la misma cantidad de persulfato de potasio, pero llevando la mezcla a pH cercano a 1 con ácido sulfúrico 50 % m/m. Un tercer oxidante aplicado fue el propuesto por Valderrama (1981) en el cual se utiliza 50 g de persulfato de potasio, 30,0 g de ácido bórico,  $H_3BO_3$  16,8 g de hidróxido de sodio, NaOH, calidad reactivo o 350 mL de una disolución de NaOH (1 mol/L) llevándolo a un balón de 1L con agua desionizada.

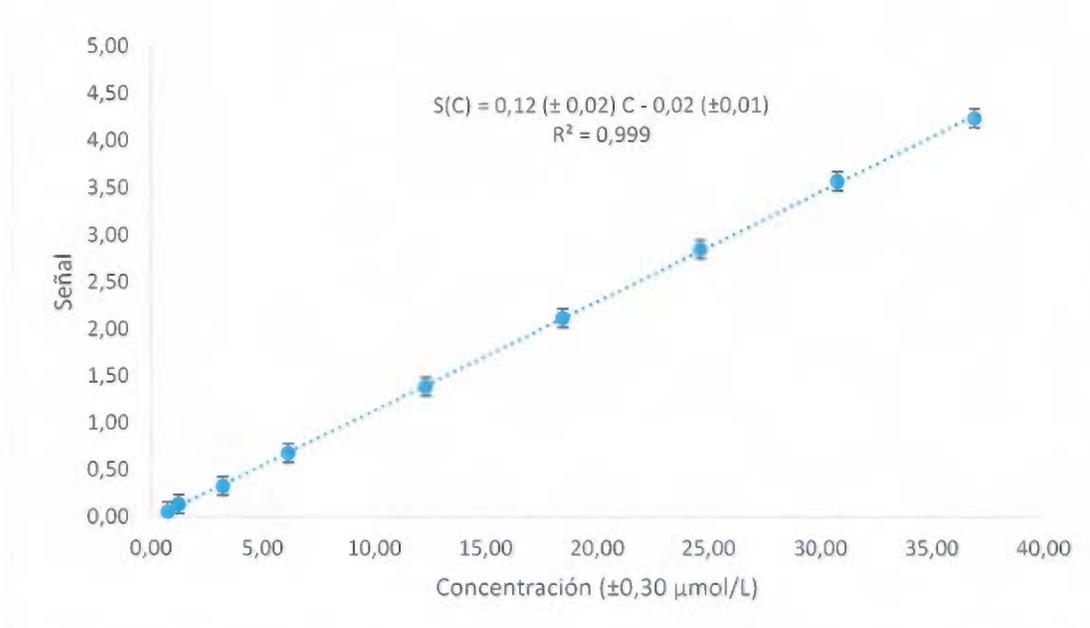
Se calculó un porcentaje de recuperación de la muestra añadida. Se definió como criterio de aceptación una recuperación de la muestra de fósforo de 80 a 120 %. (Menzel y Corwin, 1965).

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

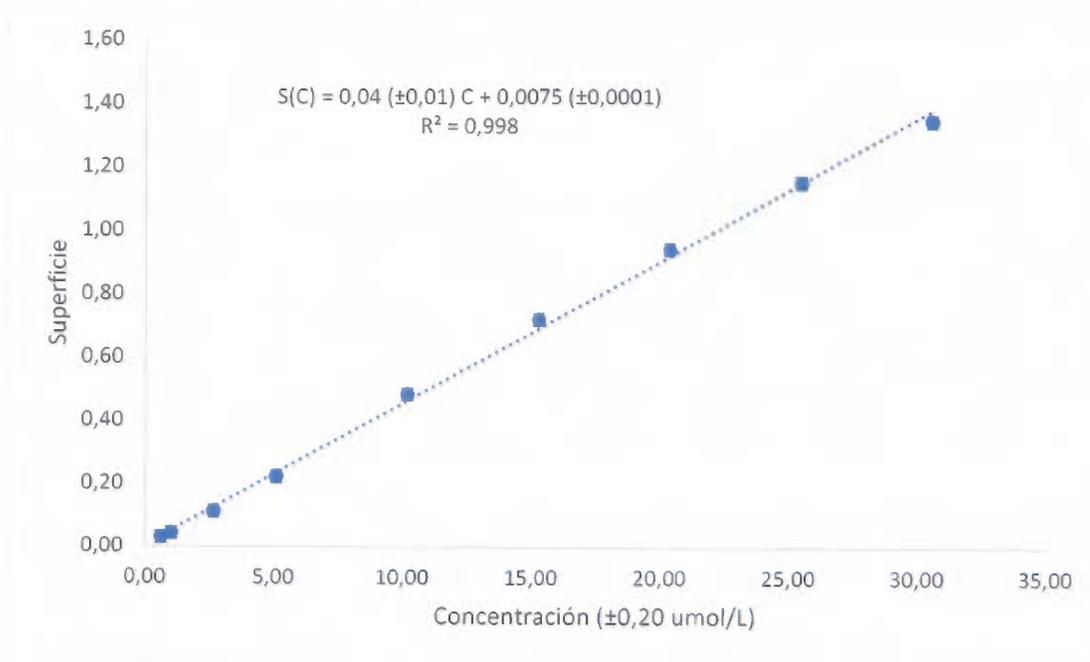
### **5.1. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD Y RANGO DE TRABAJO DEL MÉTODO.**

#### **Especies nitrogenadas.**

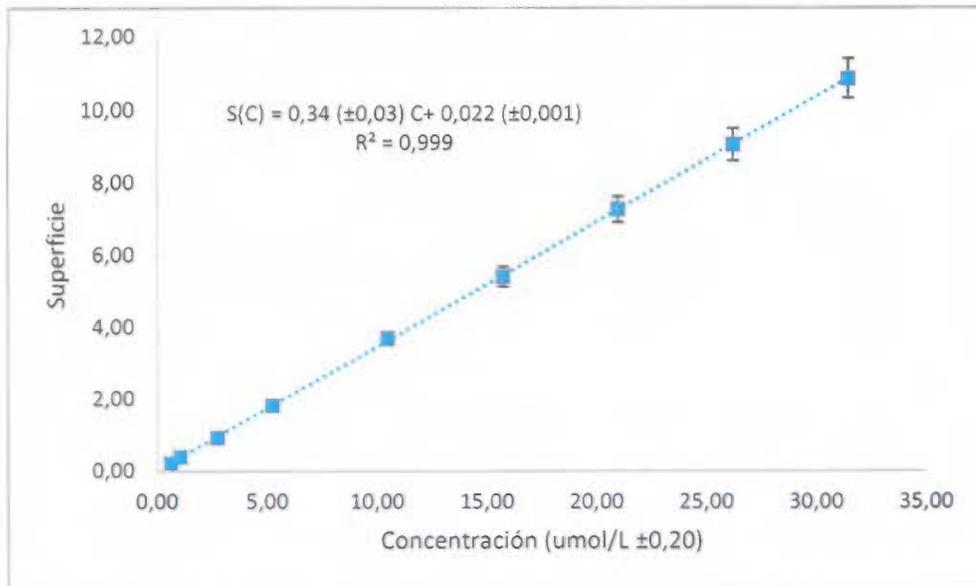
Las curvas de calibrado externo para los analitos nitrogenados se realizaron con 8 patrones y se evaluó su linealidad en un ámbito de 0,00 a 30,00  $\mu\text{mol/L}$  de concentración, bajo un criterio de aceptación de un coeficiente de correlación  $r^2 \geq 0,998$  (Yan, 2009). Esto se puede observar en las figuras 9, 10 y 11. En el anexo IV se encuentra una muestra de cálculo de todos los parámetros de las rectas.



**Figura 9:** Recta de calibración con sus respectivas barras de error para cada patrón. Analito nitrato por la reacción de Griess a 540 nm.



**Figura 10:** Recta de calibración con sus respectivas barras de error para cada patrón. Analito nitrito por la reacción de Griess a 540 nm.

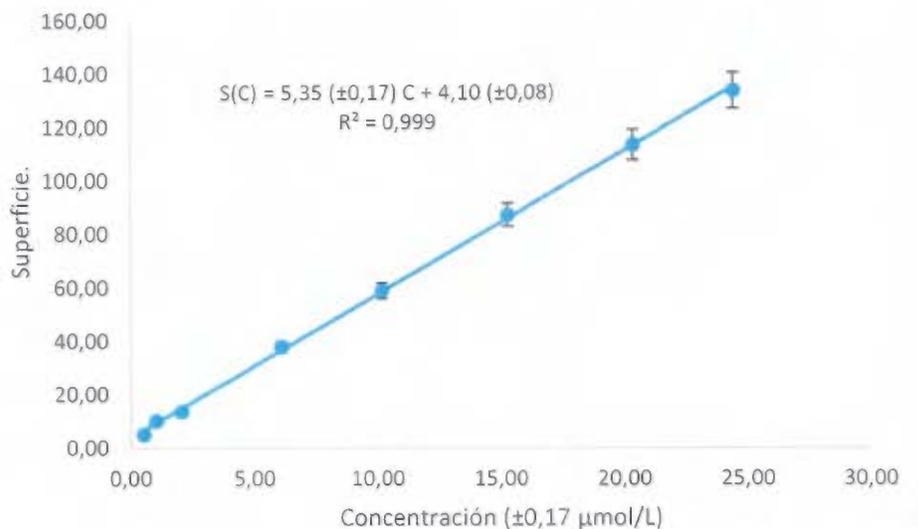


**Figura 11:** Recta de calibración con sus respectivas barras de error para cada patrón. Analito Amonio por la reacción de Berthelot 630 nm.

El coeficiente de correlación  $r^2 \geq 0,998$  significa que el 99,8% de variabilidad en el eje “y” se explica por el modelo de regresión lineal, y así se comprueba que los resultados son satisfactorios para todos los ajustes propuestos para los analitos nitrogenados (Johnson y Bhattacharyya, 2006). También se muestran las respectivas barras de error asociadas al porcentaje de desviación con respecto al valor predicho. Las barras de error en el eje “y” son cortas, mostrando que el valor promedio trazado es poco disperso (Hosmer y Lamshow, 2009).

### **Fósforo total.**

Para este caso se evaluó un rango de concentración de 0,00 a 25,00 umol/L y se obtuvo un coeficiente de correlación  $r^2 \geq 0,999$ . Se presenta la recta de calibración en la figura 12 con sus respectivas barras de error.



**Figura 12:** Recta de calibración con sus respectivas barras de error para cada patrón. Analito Fósforo total por la reacción de azul de molibdeno a 880 nm.

Por inspección visual y por el mismo criterio aplicado para las especies nitrogenadas se concluye que el ajuste lineal obtenido es satisfactorio.

Según el PON las curvas se realizan con agua desionizada más el analito de pureza conocida, pero esto no tomó en cuenta una posible interferencia en la matriz de las muestras ambientales (Miller y Miller, 2010). Es por eso que se realizaron también los experimentos de evaluación del efecto de matriz, presentados en la siguiente sección. También se determinan los límites de detección y cuantificación en las secciones siguientes.

## 5.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ. ADICIONES ESTÁNDAR.

### Especies nitrogenadas.

Para cada muestra se realizaron 2 tratamientos. Un grupo de la muestra sin diluir y otra diluida con agua desionizada tipo I. De estos grupos se extrajeron pares de datos:

$$m = \frac{S_2 - S_1}{C_2 - C_1} \quad (10)$$

Donde  $S_2$  y  $S_1$  son las señales generadas por el equipo y  $C_2$  y  $C_1$  son las concentraciones adicionadas a cada muestra.

Las medias de estos pares de datos son los que se comparan entre la muestra sin diluir y diluida, así se proponen las hipótesis para este análisis de varianza en un intervalo de confianza al 95%,

Se interpreta la  $H_0$  donde la varianza entre las medias no es significativa y que no hay evidencia suficiente para afirmar que las medias de los tratamientos sean diferentes, y la  $H_1$  donde sí existe una diferencia significativa entre las medias.

Se extrae del ANOVA para la muestra del estero la siguiente información:

- Nitrato  $p$ -Valor: 0,759.
- Nitrito  $p$ -Valor: 0,403.
- Amonio  $p$ -Valor: 0,252.

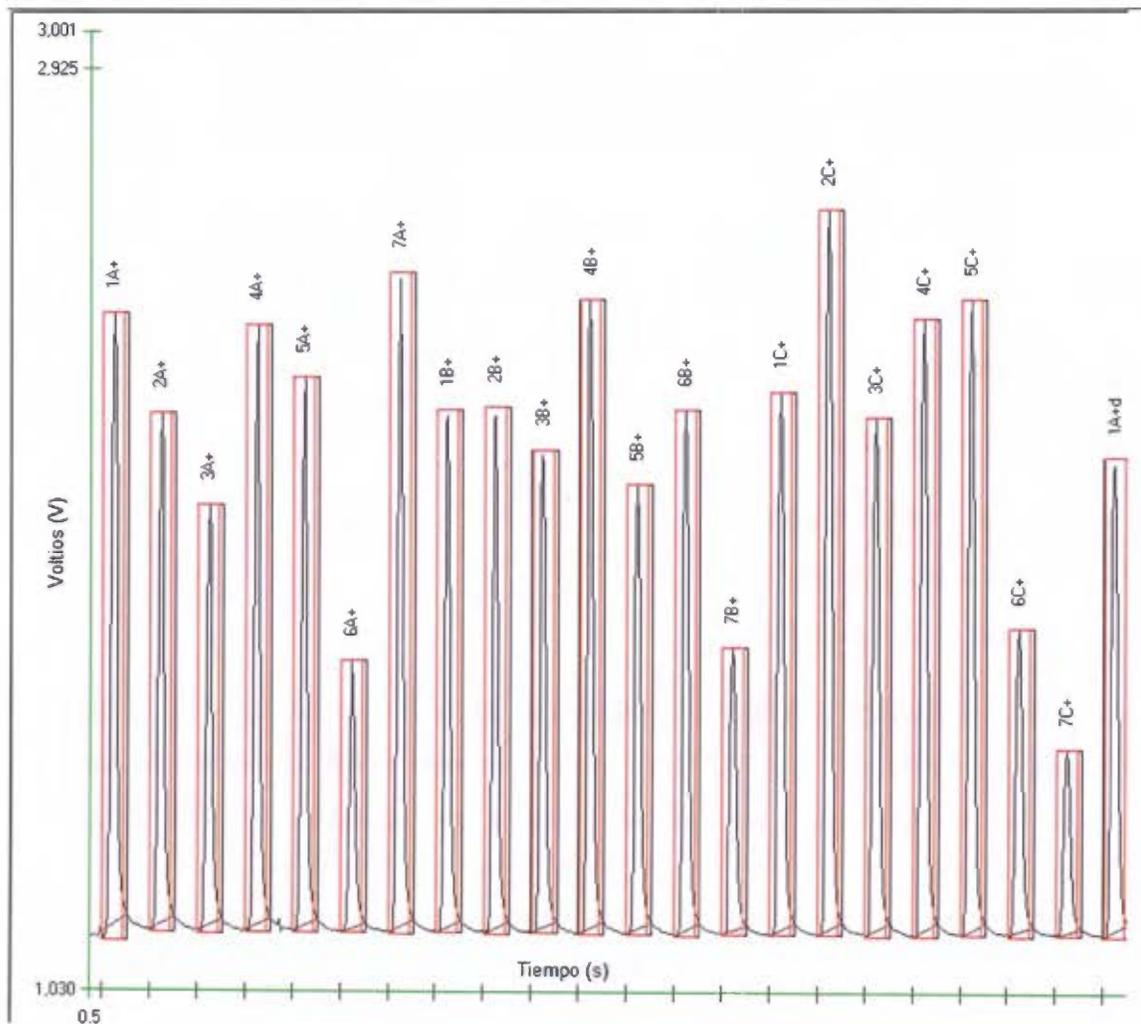
Y para la muestra del lago:

- Nitrato  $p$ -Valor: 1,000
- Nitrito  $p$ -Valor: 0,857
- Amonio  $p$ -Valor: 0,480

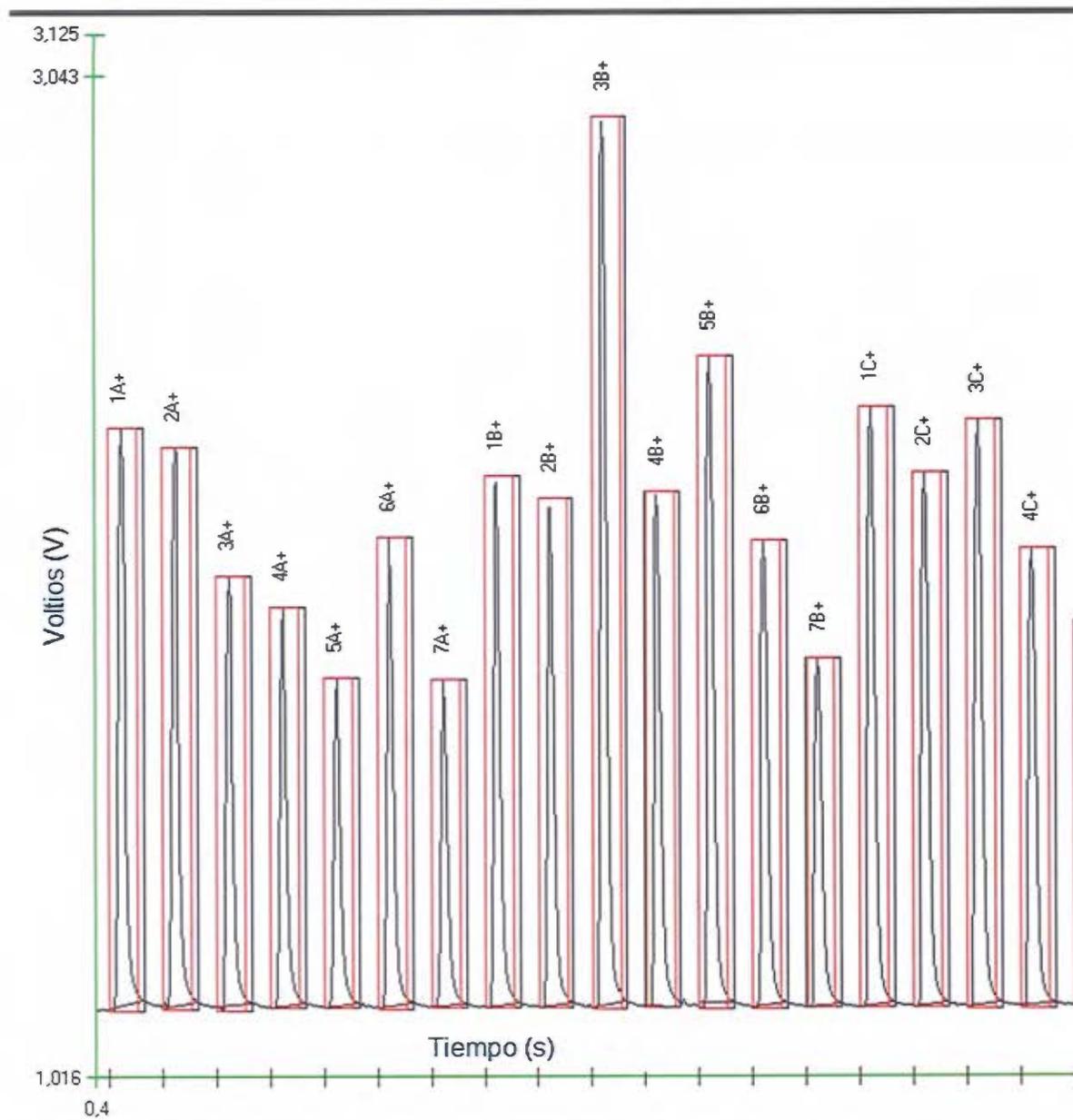
Para todos los  $p$ -valor  $> 0,05$  calculados, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula y así se evidencia que la matriz de las muestras no contiene interferencias después de ser filtradas, que puedan llevar a un resultado erróneo durante los análisis.

## Fósforo total.

Para el caso de fósforo total, se halló que el procedimiento de digestión no logró recuperar la muestra adicionada, dando señales erráticas y sin ninguna tendencia, tal y como se muestra en la figura 13 y 14.



**Figura 13:** Experimento de AE para la muestra de agua salobre. Fósforo total. A+, B+ y C+ corresponden a las réplicas de la muestra sin diluir. A+d, B+d y C+d corresponde a las réplicas diluidas.



**Figura 14:** Experimento de AE para la muestra de la laguna Río Cuarto. Fósforo total. A+, B+ y C+ corresponden a las réplicas de la muestra sin diluir. A+d, B+d y C+d corresponde a las réplicas diluidas.

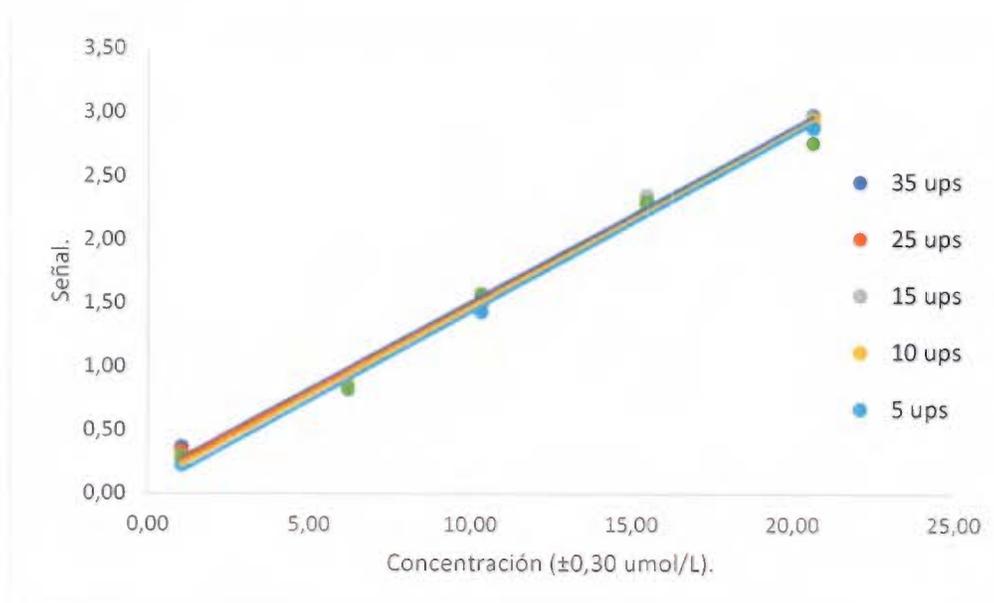
Las figuras 13 y 14 muestran que el proceso de oxidación no es homogéneo para todas las muestras. En el protocolo aplicado en este trabajo se utilizó una mezcla digestiva básica de pH=9. Al observar este comportamiento se decidió realizar dos modificaciones al procedimiento de digestión propuesto en el PON. El primero según Gales et al, (1966) la mezcla digestiva se lleva a un pH ácido con el oxidante fuerte ácido sulfúrico al 50% en masa y el segundo de acuerdo con Valderrama

(1981) donde se prepara la mezcla oxidante con ácido bórico e hidróxido de sodio para obtener un pH de 5-6 unidades. Estas variaciones fueron aplicadas y los resultados se muestran en la sección 5.6 de este documento.

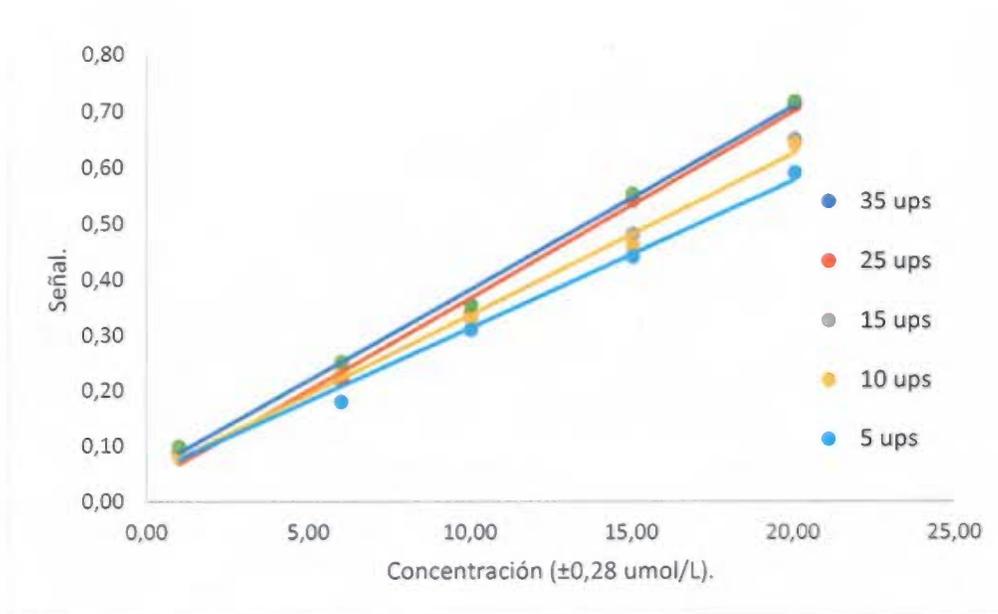
### 5.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO MATRIZ. EFECTO DE LA SALINIDAD.

#### Especies nitrogenadas.

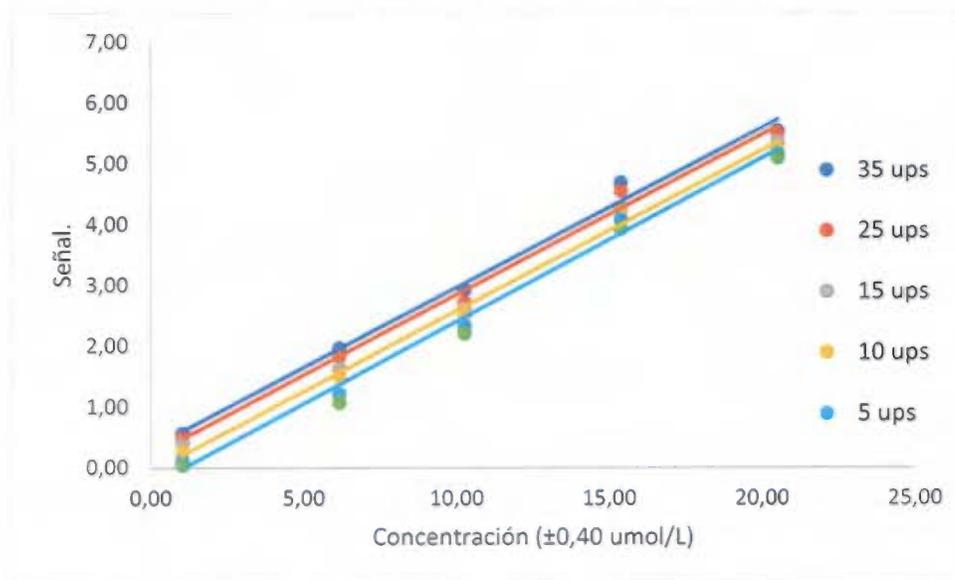
Para cada especie nitrogenada se realizó una curva de calibración a distintas salinidades: 35, 25, 15, 10, 5 y 0 ups. Se muestran los gráficos generados a en las figuras 15, 16 y 17 donde cada color corresponde a un valor obtenido a la salinidad correspondiente.



**Figura 15:** Evaluación del efecto de la salinidad para la especie nitrato.



**Figura 16:** Evaluación del efecto de la salinidad para la especie nitrito.



**Figura 17:** Evaluación del efecto de la salinidad para la especie amonio.

Para demostrar si las variaciones en la respuesta del equipo para cada valor de salinidad son significativas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de significancia de un 5%, calculando pares de datos para las n-1 réplicas que se realizaron tal y como se indica en la ecuación 10.

Se extrae del ANOVA la siguiente información:

- Nitrato  $p$ -Valor: 0,996.
- Nitrito  $p$ -Valor: 0,575.
- Amonio  $p$ -Valor: 0,999.

Como todos los  $p$ -valor obtenidos  $> 0,05$  no se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, el efecto de la variación en la salinidad no es significativo y el equipo tiene la capacidad de leer muestras de salinidad variable en el rango establecido. Este resultado es importante ya que el analista no va a tener que definir un factor de corrección por causa de la variación de la salinidad de las muestras.

Grasshoff (1995) advierte que la variación de la salinidad en las muestras puede tener un efecto significativo en la absorbancia del analito, y que podría ser más importante en la cuantificación del amonio. Estas diferencias en absorbancia se deben a que la velocidad de la reacción que genera el compuesto coloreado cambia por la presencia de distintas sales además de que puede darse una diferencia en el índice de refracción (Egan L, 2014). Es por eso que Jaromír y Hansen (1994) propone que en las metodologías espectrofotométricas se utilice agua de mar artificial para la preparación de los patrones, procurando que las salinidades sean similares a las de las muestras a analizar o que alternativamente se obtenga un factor de corrección de la salinidad realizando varias curvas de calibración a distintas salinidades. El equipo FIA al realizar la medición más rápido que un método espectrofotométrico elimina la posibilidad de que exista un efecto significativo de la salinidad (Egan L, 2014) y esto fue lo que se logró demostrar con la evaluación del efecto matriz.

### **Evaluación del Intercepto (b) para las especies nitrogenadas.**

Adicionalmente en el cuadro VII se muestran los valores de los interceptos obtenidos para cada una de las rectas de salinidad variable.

**Cuadro VII:** Interceptos obtenidos para cada una de las rectas de salinidad variable

Salinidad (ups)	Intercepto nitrato ( $\pm 0,01$ )	Intercepto nitrito ( $\pm 0,01$ )	Intercepto amonio ( $\pm 0,01$ )
35	0,14	0,05	0,34
25	0,13	0,03	0,22
15	0,07	0,07	0,09
10	0,09	0,05	0,06
5	0,04	0,05	0,30
0	0,14	0,05	0,40

Con estos datos se realizó un ANOVA de un factor para demostrar si las variaciones del valor del intercepto para cada recta de salinidad variable son significativas con un nivel de significancia de un 5%.

Se extrae del ANOVA la siguiente información:

- Nitrato  $p$ -Valor: 0,788.
- Nitrito  $p$ -Valor: 0,790.
- Amonio  $p$ -Valor: 0,784.

Como todos los  $p$ -valor obtenidos  $> 0,05$  no se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, el efecto de la variación en la salinidad no es significativo y el equipo tiene la capacidad de leer muestras de salinidad variable en el rango establecido.

## 5.4 EVALUACIÓN DE LA VERACIDAD.

### Especies nitrogenadas.

Se realizaron las recuperaciones por triplicado a cada nivel de concentración y se presenta en los cuadros VIII, IX y X el promedio de las determinaciones con una de las muestras del estero de Puntarenas y en los cuadros XI, XII y XIII el promedio de las determinaciones con una muestra superficial de la Laguna de Río Cuarto. El criterio de aceptación es que se obtenga una recuperación del analito en un rango de 80 a 120%.

**Cuadro VIII:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del estero de Puntarenas. Analito nitrato.

	Concentración Sin fortificar ( $\pm 0,30 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Fortificada. ( $\pm 0,30 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración adicionada ( $\pm 0,30 \mu\text{mol/L}$ ).	%recuperación.
Fortificación baja	1,26	2,57	1,52	86,2
Fortificación media	1,26	6,21	4,55	108,8
Fortificación alta	1,26	11,68	9,10	114,5

**Cuadro IX:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del estero de Puntarenas. Analito nitrito.

	Concentración sin fortificar ( $\pm 0,20 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Fortificada. ( $\pm 0,20 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Adicionada. ( $\pm 0,20 \mu\text{mol/L}$ ).	%recuperación.
Fortificación baja	1,96	3,34	1,51	91,0
Fortificación media	1,96	5,89	4,53	86,7
Fortificación alta	1,96	11,28	9,05	91,0

**Cuadro X:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Estero de Puntarenas. Analito amonio.

	Concentración sin fortificar ( $\pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Fortificada. ( $\pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Adicionada. ( $\pm 0,10 \mu\text{mol/L}$ ).	%recuperación.
Fortificación baja	7,78	9,30	1,55	98,5
Fortificación media	7,78	12,22	4,65	95,6
Fortificación alta	7,78	15,62	9,29	84,4

**Cuadro XI:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Laguna Río Cuarto. Analito nitrato.

	Concentración Sin fortificar ( $\pm 0,32 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Fortificada. ( $\pm 0,32 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Adicionada. ( $\pm 0,32 \mu\text{mol/L}$ ).	%recuperación.
Fortificación baja	1,05	2,74	1,52	110,0
Fortificación media	1,05	6,63	4,55	122,2
Fortificación alta	1,05	11,07	9,10	111,1

**Cuadro XII:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Laguna Río Cuarto. Analito nitrito.

	Concentración sin fortificar (±0,23 µmol/L).	Concentración Fortificada. (±0,62 µmol/L).	Concentración Adicionada. (±0,62 µmol/L).	%recuperación.
<b>Fortificación baja</b>	1,96	1,32	1,51	87,7
<b>Fortificación media</b>	1,96	5,25	4,53	115,8
<b>Fortificación alta</b>	1,96	10,71	9,05	118,4

**Cuadro XIII:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Laguna Río Cuarto. Analito amonio.

	Concentración Sin fortificar (±0,13 µmol/L).	Concentración Fortificada. (±0,13 µmol/L).	Concentración Adicionada. (±0,13 µmol/L).	%recuperación.
<b>Fortificación baja</b>	1,12	2,63	1,55	96,9
<b>Fortificación media</b>	1,12	6,57	4,65	117,0
<b>Fortificación alta</b>	1,12	9,67	9,29	92,0

Para todos los analitos nitrogenados se encuentran recuperaciones dentro del rango de aceptación de 80-120%.

### **Fósforo total.**

Se realizó lo mismo que en la sección anterior, pero con el método propuesto para fósforo total utilizando un patrón de pureza conocida de ATP y se calcula un

porcentaje de recuperación. Se muestran las recuperaciones obtenidas en los cuadros XIV y XV.

**Cuadro XIV:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra de la Laguna de Río Cuarto. Analito fósforo total.

	Concentración sin fortificar. ( $\pm 0,30 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Fortificada. ( $\pm 0,30 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Adicionada. ( $\pm 0,30 \mu\text{mol/L}$ ).	%recuperación.
Fortificación baja	2,15	6,36	1,20	59,8
Fortificación media	2,15	10,37	3,60	115,7
Fortificación alta	2,15	13,37	7,17	157,5

**Cuadro XV:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del estero de Puntarenas. Analito fósforo total.

	Concentración sin fortificar ( $\pm 0,22 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Fortificada. ( $\pm 0,22 \mu\text{mol/L}$ ).	Concentración Adicionada. ( $\pm 0,22 \mu\text{mol/L}$ ).	%recuperación.
Fortificación baja	2,07	11,99	1,20	27,7
Fortificación media	2,07	7,43	3,60	74,7
Fortificación alta	2,07	5,18	7,17	138,2

Para el caso de fósforo total no se obtuvieron porcentajes de recuperación en el ámbito de aceptación a excepción de una de fortificación media para la muestra de la laguna Río Cuarto. Es por eso que se evaluó también una modificación al procedimiento con una mezcla digestiva ácida, de pH=1 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50%, aun así, los resultados fueron similares, y no se logró una buena recuperación de la muestra. Hay que resaltar de que existe un histórico de muestras analizadas de fósforo total en el CIMAR, con datos de curvas de calibración con

linealidad aceptable y determinaciones en muestras ambientales, pero no se había evaluado una recuperación de un analito como el ATP ya que no se contaba con este patrón.

## 5.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS AMBIENTALES. CONTROL DE CALIDAD DEL MÉTODO.

Con todas las muestras recolectadas del estero de Puntarenas y la Laguna de Río Cuarto se realizó la cuantificación de las especies nitrogenadas y el fósforo total. Se construyeron las cartas de control del promedio, y desviación estándar de los blancos fortificados de laboratorio para determinar si durante los análisis el equipo cumplió con la cuantificación correcta de los analitos. Los subgrupos de datos se componen de 6 blancos fortificados de laboratorio leídos ese mismo día que se dividen en 2 subgrupos de 3 blancos fortificados cada uno. En el Anexo III se muestra un cuadro de resumen de las muestras analizadas como referencia.

### **Nitrato. Control de calidad.**

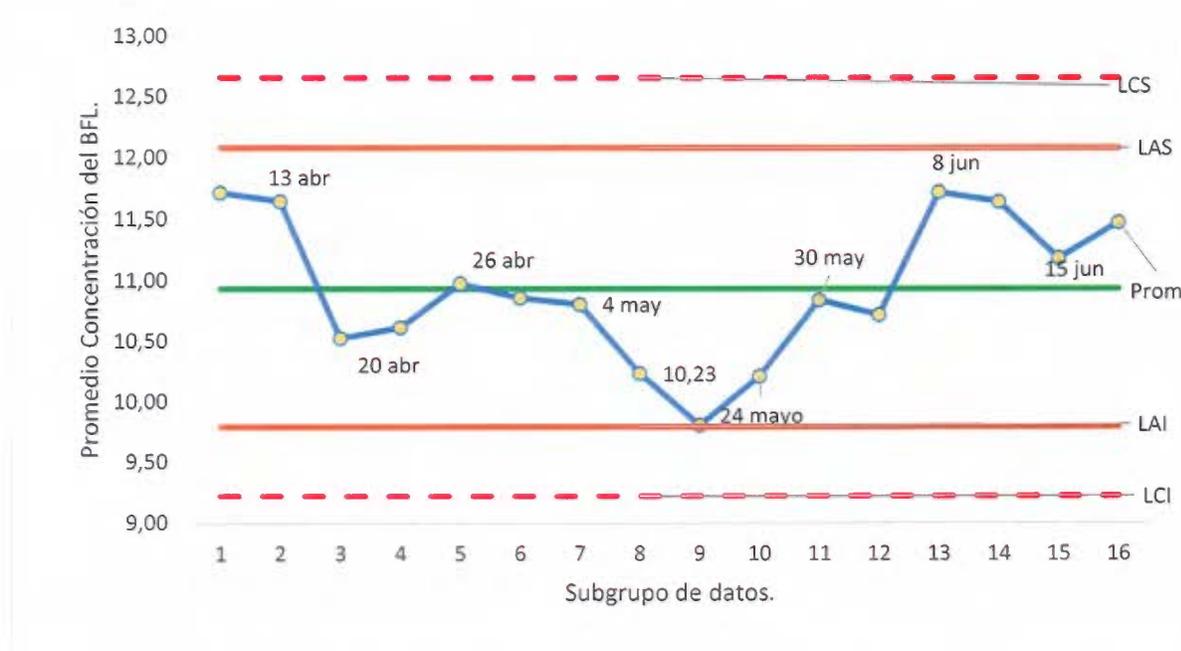
La cuantificación de nitrato debe considerar la eficiencia de reducción de la columna de cadmio, los rendimientos de este proceso se muestran en el cuadro XVI.

**Cuadro XVI:** Rendimiento de reducción de la columna de cadmio para distintos días de análisis de muestras ambientales

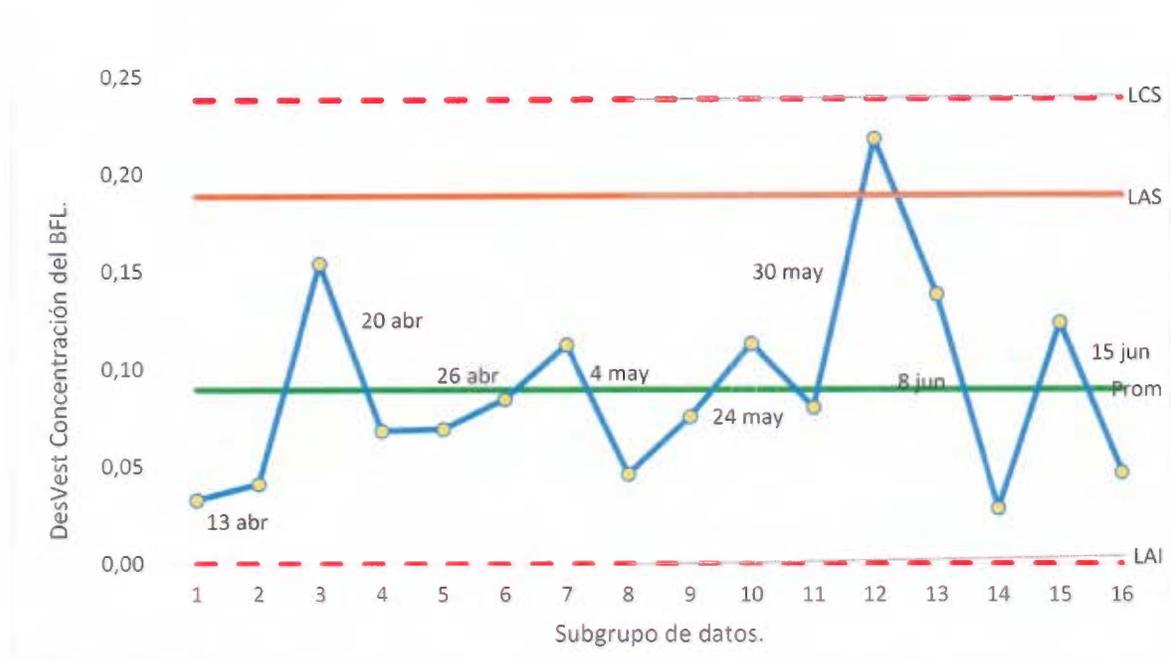
<b>Fecha análisis.</b>	<b>% rendimiento.</b>
13 de abril.	99,7
20 de abril.	100,4
26 de abril.	99,5
4 de mayo.	95,0
24 de mayo.	102,1
30 de mayo.	99,4
08 de junio.	99,7.
15 de junio.	101,3

Estos porcentajes de rendimiento se calcularon a partir de los promedios de las recuperaciones de los mismos BFL para  $N-NO_3^-$  y  $N-NO_2^-$  en una razón de eficiencia según la ecuación (9). En todos los días de análisis se obtuvo un porcentaje de rendimiento mayor al 80%, el cual, bajo recomendación del fabricante del equipo es lo ideal para la cuantificación de nitrato (QuickChem training manual, 2008).

Se generaron entonces las cartas de control mostradas en las figuras 18 y 19.



**Figura 18:** Carta de control del promedio  $\bar{X}$  para los BFL de nitrato. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI).



**Figura 19:** Carta de control de la desviación estándar  $\bar{s}$  para los BFL de nitrato. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI) que en este caso es igual que el LAI.

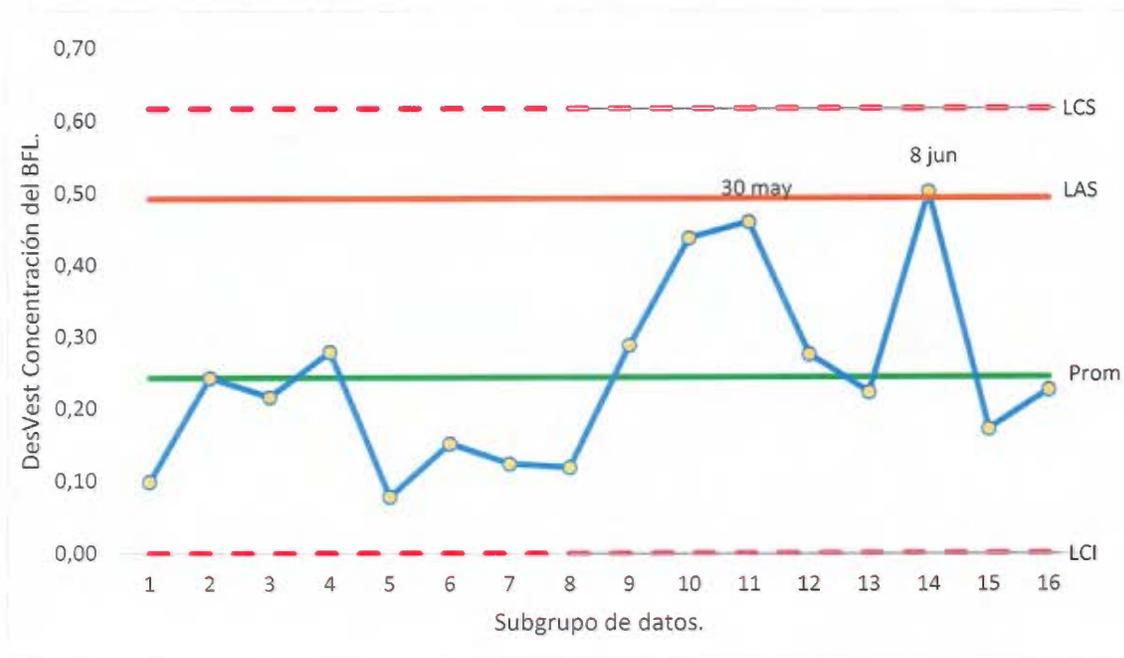
Para todos los subgrupos de datos no se encontró ninguno que sobrepasara los límites de control tanto en la figura 18 como en la 19 aunque se recomienda revisar las tendencias observadas. En la figura 18 se encontró que el 24 de mayo uno de los subgrupos se acerca al límite de advertencia inferior, se obtuvo un porcentaje de recuperación del BFL de 96,3% y no existió una desviación estándar que sobrepasara alguno de los límites según la figura 19. El 30 de mayo se observa que uno de los subgrupos sobrepasa el LAS, se revisa el porcentaje de recuperación del BFL y se obtuvo un 106,3%, y en la figura 18 se determina que la recuperación es muy cercana al promedio central. Se determina entonces que el proceso de cuantificación de nitrato se encuentra bajo control estadístico en el período de tiempo evaluado.

### **Nitrato. Control de calidad.**

Para el analito nitrato se generaron las cartas de control que se muestran en las figuras 20 y 21.



**Figura 20:** Carta de control del promedio  $\bar{X}$  para los BFL de nitrito. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI).



**Figura 21:** Carta de control de la desviación estándar  $\bar{S}$  para los BFL de nitrito. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI) que en este caso es igual que el LAI.

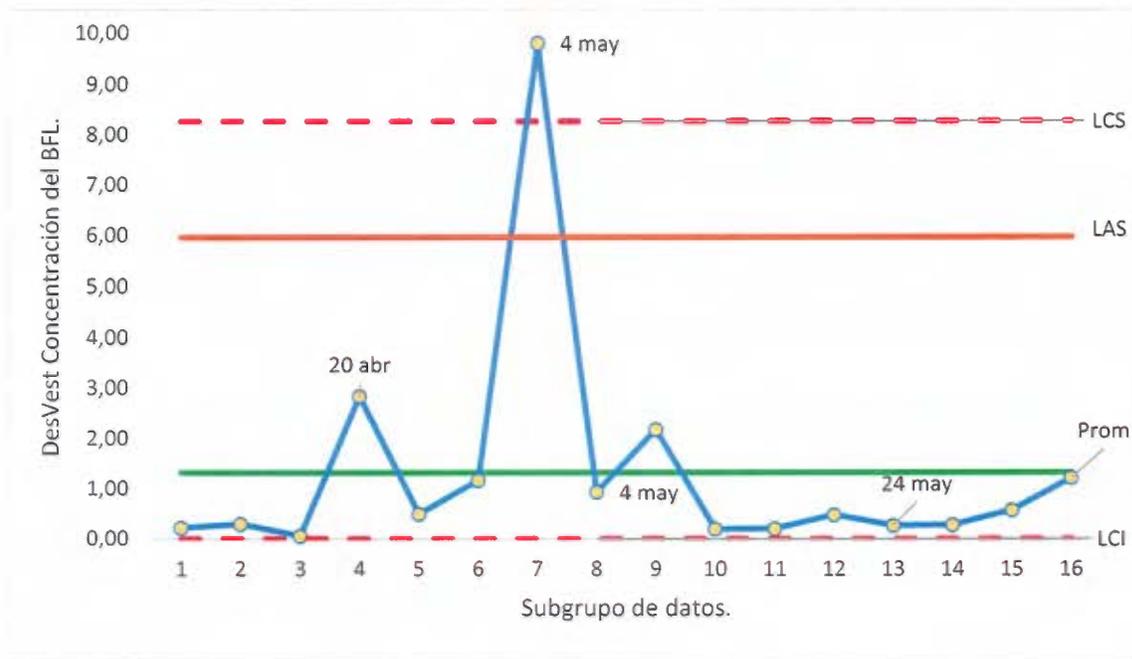
En la figura 20 no se muestra ningún punto fuera de los límites de control ni de advertencia para el promedio de los BFL. Solamente en la figura 21 se encuentra un subgrupo del 8 de junio que supera el LAS. En la bitácora para ese día no existe ninguna anotación sobre algún problema con el equipo por lo que la desviación solo podría atribuirse a un error de carácter determinado al ser una pequeña desviación entre todas las observaciones realizadas ese día (Valcárcel y Ríos, 1995). Se determina entonces que el proceso de cuantificación de nitrito se encuentra bajo control estadístico en el período de tiempo evaluado.

### Amonio. Control de calidad.

Para el analito amonio se generan las cartas de control que se muestran en las figuras 22 y 23.

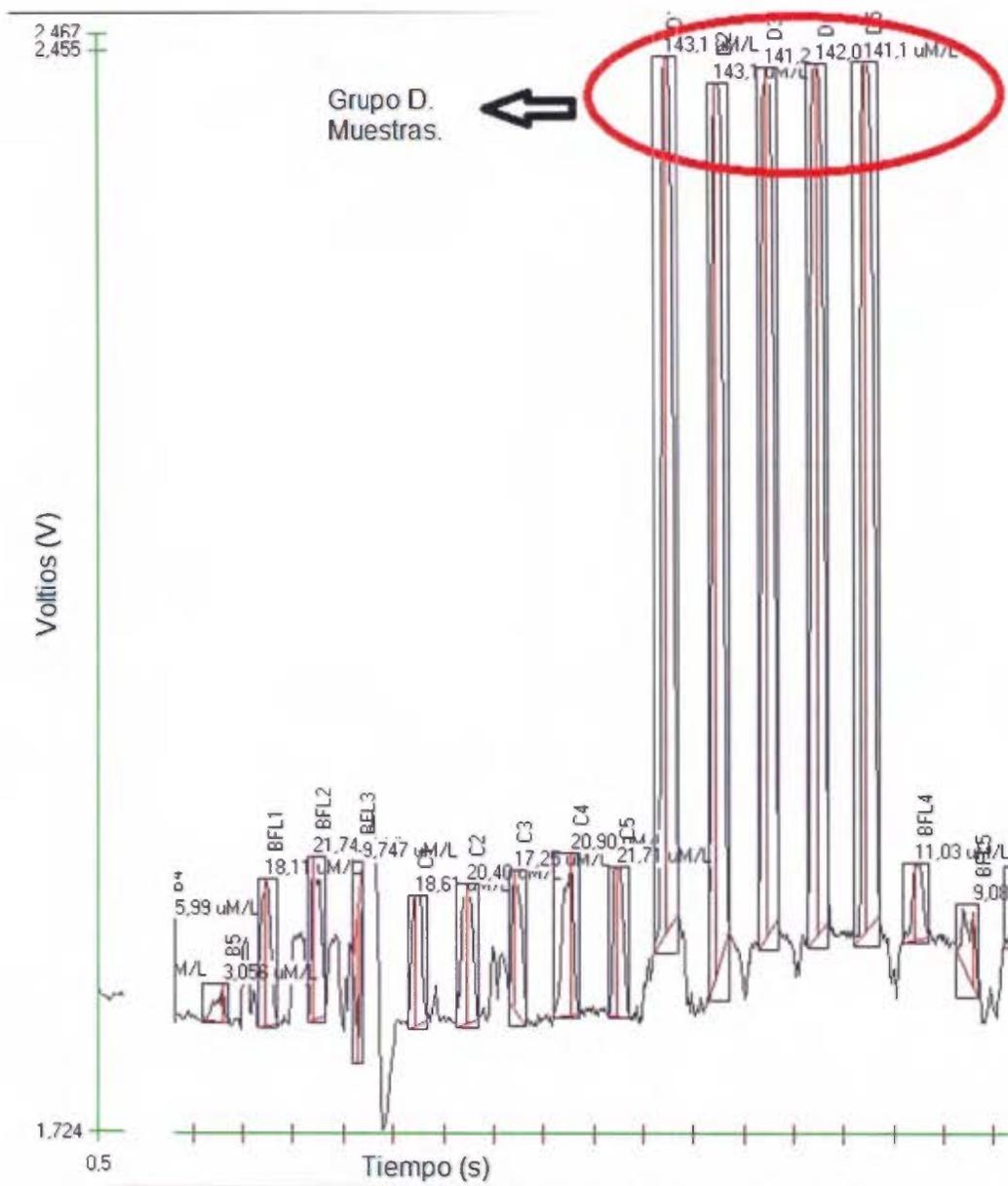


**Figura 22:** Carta de control del promedio  $\bar{X}$  para los BFL de amonio. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI).



**Figura 23:** Carta de control de la desviación estándar  $\bar{s}$  para los BFL de amonio. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI) que en este caso es igual que el LAI.

Para este canal sí existieron problemas de línea base errática que fueron debidamente anotados en la bitácora para los días 20 de abril, 4 de mayo y 10 de mayo. Esto tiene como consecuencia de que se dio una variación muy amplia en la desviación estándar promedio y que se observó un punto fuera del LCS el 4 de mayo tal y como se muestra la figura 23. Se ejemplifica el comportamiento errático de la línea base con el diagrama de los patrones mostrado en la figura 24.



**Figura 24:** Diagrama para la corrida de control de calidad del día 4 de mayo. Analito amonio. Se señala el grupo de muestras D (Muestra de 50 m de profundidad de la Laguna de Río Cuarto) las cuales debieron de ser diluidas en un análisis posterior.

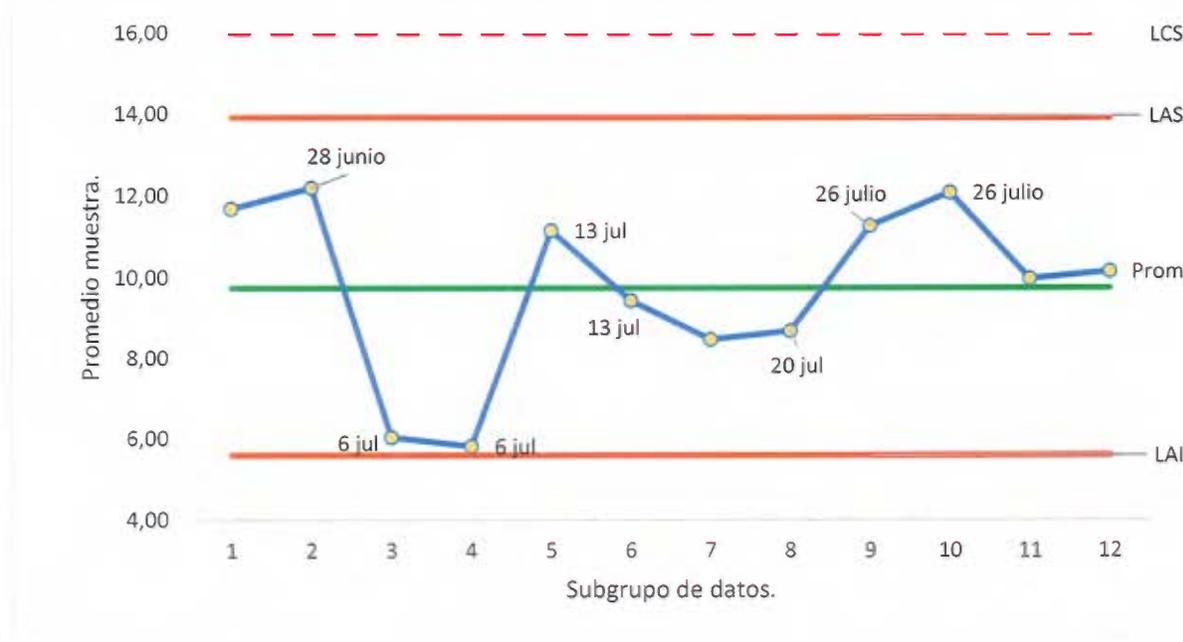
Las señales debieron de ser integradas manualmente y se observó también que el grupo D de repeticiones de la muestra de 50 m de profundidad de la Laguna de Río Cuarto tiene una señal muy grande tal y como se muestra en la figura 24, como consecuencia de que es una muestra que contiene concentración alta de amonio por lo que tuvo que ser diluida en otro día de análisis.

Cuando se observó una línea base inestable se procedió a realizar una limpieza del canal con agua desionizada durante un período de tiempo prudencial hasta observar una mejoría.

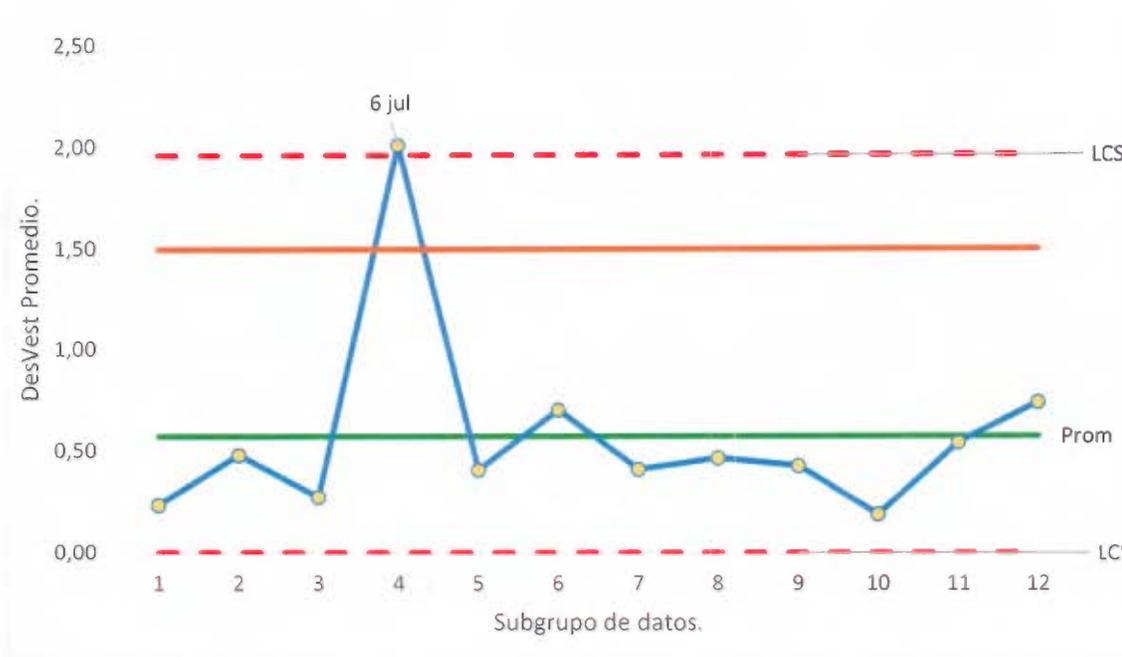
Con los datos obtenidos se determina que el método para la cuantificación de amonio no se encontró bajo control estadístico durante los días 20 de abril, 4 de mayo y 10 de mayo.

**Fósforo total. Estabilidad del método con respecto al tiempo.**

Para el analito fósforo total se generan las cartas de control que se muestran en las figuras 25 y 26.



**Figura 25 :** Carta de control del promedio  $\bar{X}$  para los BFL de fósforo total. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI).



**Figura 26:** Carta de control de la desviación estándar  $\bar{s}$  para los BFL de fósforo total. Se indica un Límite de Control Superior (LCS), Límite de Advertencia Superior (LAS), Promedio central, Límite de Advertencia Inferior (LAI) y Límite de Control Inferior (LCI).

En la figura 25 se muestra que ambos subgrupos del 6 de julio se encuentran cerca del LAI y estos muestran una tendencia de recuperación baja para los BFL. El porcentaje de recuperación para el primer subgrupo fue de 46,8% y del segundo de 45,0%. Se determina que el proceso de análisis se encuentra bajo control estadístico, exceptuando el día 6 de julio. Como las recuperaciones de los BFL no cumplieron con el criterio de aceptación establecido, el valor promedio no puede ser tomado como referencia para una carta de control, por lo tanto la figura 25 y 26 se refieren a la estabilidad del método con respecto al tiempo.

**Límite de Cuantificación y Detección.**

En los cuadros XVII y XVIII se muestran los LC y LD determinados para la cuantificación de las especies nitrogenadas y fósforo total, según el criterio de Meir y Zünd (2014). Se reportan los promedios de los LC y LD para todas las cuantificaciones de control de calidad de las especies nitrogenadas que se

realizaron durante el período del 13 de abril al 15 de junio y para fósforo total en el período del 28 de junio al 3 de agosto.

**Cuadro XVII:** LC y LD para las especies nitrogenadas en los distintos días de análisis de las especies de las muestras ambientales.

Fecha de análisis.	Nitrato ( $\mu\text{mol/L}$ ).		Nitrito ( $\mu\text{mol/L}$ ).		Amonio ( $\mu\text{mol/L}$ ).	
	LC.	LD.	LC.	LD.	LC.	LD.
13 de abril.	2,4	1,2	2,1	1,1	0,3	0,2
20 de abril.	2,5	1,3	1,9	1,0	0,9	0,5
26 de abril.	2,4	1,2	2,2	1,1	0,4	0,2
04 de mayo.	2,0	1,0	2,3	1,2	1,7	0,9
24 de mayo.	1,9	1,0	0,4	0,2	2,1	1,1
30 de mayo.	2,3	1,2	2,8	1,5	1,0	0,5
08 de junio.	0,7	0,4	0,4	0,2	0,3	0,1
15 de junio.	2,7	1,4	2,2	1,1	0,4	0,2
<b>Valor mayor.</b>	2,7	1,4	2,8	1,5	2,1	1,1

**Cuadro XVIII:** LC y LD para distintos días de análisis de fósforo total en las muestras ambientales.

Fecha de análisis.	Fósforo total ( $\mu\text{mol/L}$ ).	
	LC.	LD.
28 de junio.	2,1	1,1
06 de julio.	2,8	1,5
13 de julio.	1,6	0,8
20 de julio.	2,0	1,0
26 de julio.	1,6	0,8
03 de agosto.	2,0	1,0
<b>Valor mayor.</b>	2,8	1,5

Aquellas muestras que quedaron por debajo del límite de cuantificación se definieron como no cuantificables, y las que quedaron por debajo del límite de detección como no detectables.

**Coefficiente de variación para el análisis de muestras. Evaluación de la precisión.**

La cuantificación de la concentración de todas las muestras recolectadas en el muestreo de la Laguna Río Cuarto y el estero de Puntarenas se realizó con 5 réplicas independientes y se calculó un coeficiente de variación, el cual no debe superar un 20% según el criterio de aceptación establecido.

En el cuadro XIX se muestran los porcentajes del CV obtenidos para la especie amonio.

**Cuadro XIX:** Coeficiente de variación para la cuantificación de la especie amonio.

<b>Fecha análisis.</b>	<b>% CV muestra A</b>	<b>% CV muestra B</b>	<b>% CV muestra C</b>	<b>% CV muestra D</b>
13 de abril-	20,0	18,7	0,2	9,9
20 de abril.	22,1	41,4	0,3	41,8
26 de abril.	11,1	18,0	0,1	3,7
04 de mayo.	19,4	97,5	0,1	0,6
24 de mayo.	2,6	2,6	1,7	55,7
30 de mayo.	19,3	20,0	0,6	13,8
08 de junio.	5,5	20,6	0,1	8,2
15 de junio.	20,5	8,0	0,1	11,6

Para el análisis de amonio se encontraron coeficientes de variación de más de 20 % en los días 20 de abril, 04 de mayo y 24 de mayo. Esto coincide con el comportamiento problemático de la línea base, indicado en la bitácora.

En el cuadro XX se muestran los porcentajes del CV obtenidos para la especie nitrato.

**Cuadro XX:** Coeficiente de variación para la cuantificación de la especie nitrato.

<b>Fecha análisis.</b>	<b>% CV muestra A</b>	<b>% CV muestra B</b>	<b>% CV muestra C</b>	<b>% CV muestra D</b>
13 de abril-	No detectable.	No detectable.	No detectable.	12,8
20 de abril.	No detectable.	No detectable.	No detectable.	No detectable.
26 de abril.	6,7	17,3	0,3	2,7
04 de mayo.	12,7	No detectable.	No detectable.	No detectable.
24 de mayo.	No detectable.	No detectable.	0,05	13,7
30 de mayo.	13,2	6,0	0,1	10,6
08 de junio.	3,4	35,6*	0,7	52,0*
15 de junio.	12,8	20,0	No detectable.	No detectable.

\*Valores que superan el 20% de CV.

Se observó únicamente que el día 8 de junio se obtuvieron porcentajes de CV superiores a 20%. La muestra B era del Lago Río Cuarto de profundidad 10 m, esta fue analizada también el día 4 de mayo, y no fue detectable. La muestra D era la de 30 m de profundidad del Lago Río Cuarto, la cual ya había sido analizada el 4 de mayo y que igualmente no fue detectable.

En el cuadro XXI se muestran los porcentajes del CV obtenidos para la especie nitrito.

**Cuadro XXI:** Coeficiente de variación para la cuantificación de la especie nitrito.

<b>Fecha análisis.</b>	<b>% CV muestra A</b>	<b>% CV muestra B</b>	<b>% CV muestra C</b>	<b>% CV muestra D</b>
<b>13 de abril-</b>	32,1*	19,6	1,4	No Detectable
<b>20 de abril.</b>	6,8	4,3	0,03	No Detectable
<b>26 de abril.</b>	5,7	2,8	0,04	4,6
<b>04 de mayo.</b>	17,2	No Detectable	No Detectable	No Detectable
<b>24 de mayo.</b>	No Detectable	19,4	0,03	2,0
<b>30 de mayo.</b>	17,3	No Detectable	No Detectable	No Detectable
<b>08 de junio.</b>	6,5	22,0*	0,46	No Detectable
<b>15 de junio.</b>	4,5	2,6	No Detectable	No Detectable

\*Valores que superan el 20% de CV.

Para la cuantificación de nitrito se encuentran dos CV por encima del 20%. El 13 de abril para la muestra A que fue una superficial del estero de Puntarenas, esta fue analizada también el día 24 de mayo, y se obtuvo un CV de 0,03%. El 8 de junio la muestra de la laguna de Río Cuarto de 10 m de profundidad obtuvo un CV de 22,0% pero está ya había sido analizada el 4 de mayo y tuvo un CV de 19,4%.

En el cuadro XXII se muestra el CV para el analito fósforo total.

**Cuadro XXII:** Coeficiente de variación para la cuantificación de la especie fósforo total.

<b>Fecha análisis.</b>	<b>% CV muestra A</b>	<b>% CV muestra B</b>	<b>% CV muestra C</b>	<b>% CV muestra D</b>
28 de junio.	5,9	63,6	1,1	No Detectable
06 de julio.	No Detectable	No Detectable	No Detectable	No Detectable
13 de julio.	1,4	1,6	3,5	82,1
20 de julio.	105,5	No Detectable	42,1	457,5
26 de julio.	45,3	14,1	14,8	54,9
03 de agosto.	81,9	115,9	35,3	36,3

Se hallaron variaciones muy grandes y fuera de los límites para la cuantificación de fósforo total, por causa de la misma problemática que se observó en los experimentos de adiciones estándar, veracidad y control de calidad de los BFL para este analito.

En los cuadros XXVII y XXVIII se encuentran las concentraciones de cada una de las muestras cuantificadas en este trabajo.

## 5.6 ALTERNATIVA AL PROCESO DE DIGESTIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL.

### Mezcla ácida.

Se realizaron dos modificaciones al procedimiento de digestión propuesto en el PON basado en las observaciones de dos autores.

Lo propuesto por Gales et al, (1966) es llevar la mezcla digestiva de persulfato de potasio a un pH de 1 con ácido sulfúrico 1+1, junto con la muestra y someterla al proceso de autoclave. Se realizó un experimento rápido de veracidad, donde la curva tuvo buena linealidad, pero en la mayoría de las réplicas no se obtuvieron recuperaciones dentro del rango de aceptación establecido. Además, la señal de los blancos fue alta, indicando así, una posible contaminación u oclusión debida al proceso de digestión. Los porcentajes de recuperación se presentan en el cuadro XXIII para una muestra de la Laguna de Río Cuarto y en el cuadro XXIV para una muestra del estero de Puntarenas.

**Cuadro XXIII:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Estero de Puntarenas. Analito fósforo total, oxidante ácido.

	Concentración Sin fortificar ( $\pm 0,30 \mu\text{M}$ ).	Concentración Fortificada. ( $\pm 0,20 \mu\text{M}$ ).	Concentración Adicionada. ( $\pm 0,20 \mu\text{M}$ ).	%recuperación.
<b>Fortificación baja</b>	1,61	5,05	8,34	41,3
<b>Fortificación media</b>	1,61	3,73	4,32	49,0
<b>Fortificación alta</b>	1,61	3,71	1,48	141,6

**Cuadro XXIV:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Lago Río Cuarto. Analito fósforo total, oxidante ácido.

	Concentración sin fortificar (±0,20 µmol/L).	Concentración Fortificada. (±0,20 µmol/L).	Concentración Adicionada. (±0,20 µmol/L).	%recuperación.
<b>Fortificación baja</b>	1,89	7,20	8,34	63,6
<b>Fortificación media</b>	1,89	4,71	4,32	65,2
<b>Fortificación alta</b>	1,89	4,60	1,48	183,2

La otra modificación que se llevó acabo fue la propuesto por Valderrama (1981), en donde la mezcla oxidante se preparó con persulfato de potasio, ácido bórico e hidróxido de sodio 1 mol/L. Esta metodología da la posibilidad de realizar el análisis simultáneo de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) en la misma muestra, por eso en este proceso de digestión se agrega un analito de pureza conocida de Urea, para evaluar la posibilidad de una recuperación del nitrógeno total. En el proceso de oxidación simultánea la reacción comienza a pH 9 y termina a pH 5-6. Estas condiciones son obtenidas por un sistema de ácido bórico - hidróxido de sodio. Se muestran los resultados de recuperaciones de ATP en el cuadro XXV y de Urea en el cuadro XXVI.

**Cuadro XXV:** Porcentajes de recuperación para cada nivel en muestra del Estero de Puntarenas. Analito fósforo total, proceso de oxidación según Valderrama.

	%recuperación. Con NaOH 1 M	% recuperación Con NaOH Sólido.
<b>Fortificación baja</b>	3,3	61,2
<b>Fortificación media</b>	5,9	15,8
<b>Fortificación alta</b>	15,5	14,2

**Cuadro XXVI:** Porcentajes de recuperación para cada nivel de la Laguna de Río Cuarto. Analito nitrógeno total, proceso de oxidación según Valderrama.

	<b>%recuperación. Con NaOH 1 M</b>	<b>% recuperación Con NaOH Sólido.</b>
<b>Fortificación baja</b>	15,3	45,5
<b>Fortificación media</b>	0,9	21,3
<b>Fortificación alta</b>	12,9	11,4

Las recuperaciones fueron de nuevo muy bajas, por lo que no se prosiguió a realizar más pruebas de acuerdo a esta modificación.

#### 5.6 OBSERVACIONES SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE ESPECIES NITROGENADAS CUANTIFICADAS EN LOS MUESTREOS.

De acuerdo con los muestreos realizados en el estero de Puntarenas y la Laguna de Río Cuarto, se obtuvieron los valores de las concentraciones de cada especie nitrogenada. Con estos datos se puede realizar una clasificación de cada punto de muestreo según el criterio descrito por Vollenweider (1968) y expuesto en el cuadro I. En el cuadro XXVII se presentan las concentraciones obtenidas en el muestreo del estero de Puntarenas.

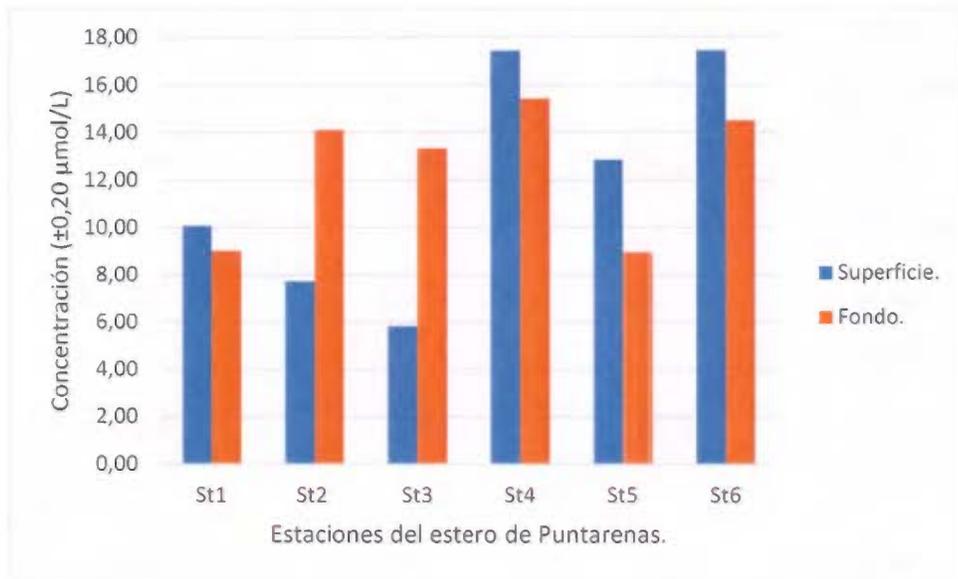
**Cuadro XXVII:** Concentraciones de las especies nitrogenadas de cada estación de muestreo del estero de Puntarenas.

<b>Muestra</b>	<b>Amonio (<math>\pm 0,20</math> <math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>Nitrato (<math>\pm 0,30</math> <math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>Nitrito (<math>\pm 0,18</math> <math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>
<b>St 1</b>	10,07	ND	4,36
<b>Superficie</b>			
<b>St 2</b>	7,72	0,87	14,21
<b>Superficie</b>			

<b>St 3</b>	5,82	0,54	10,96
<b>Superficie</b>			
<b>St 4</b>	17,42	ND	1,65
<b>Superficie</b>			
<b>St 5</b>	12,85	ND	ND
<b>Superficie</b>			
<b>St 6</b>	17,42	2,03	ND
<b>Superficie</b>			
<b>St 1</b>	9,01	ND	9,99
<b>Fondo</b>			
<b>St 2</b>	14,10	ND	13,92
<b>Fondo</b>			
<b>St 3</b>	13,33	ND	9,68
<b>Fondo</b>			
<b>St 4</b>	15,42	ND	ND
<b>Fondo</b>			
<b>St 5</b>	8,94	0,89	6,76
<b>Fondo</b>			
<b>St 6</b>	14,49	3,4	5,11
<b>Fondo</b>			

Según el muestreo (Ver figura 8) la estación 6 (St 6) fue la que se encontraba más cerca del estuario y la estación 1 (St 1) la que se encontraba más alejada. Se observa que en la St 6 tanto en la superficie como en el fondo, existe la mayor concentración de amonio con respecto a las otras estaciones, esto puede deberse a la cercanía con alguna fuente de contaminación de alguna fuente puntual de contaminación orgánica que se va diluyendo conforme se aleja del estuario

(Camargo, 2006). En la figura 27 se puede revisar que no existe ninguna otra tendencia para la concentración del analito amonio.



**Figura 27:** Tendencia de la concentración del analito amonio en los distintos puntos de muestreo del estero de Puntarenas.

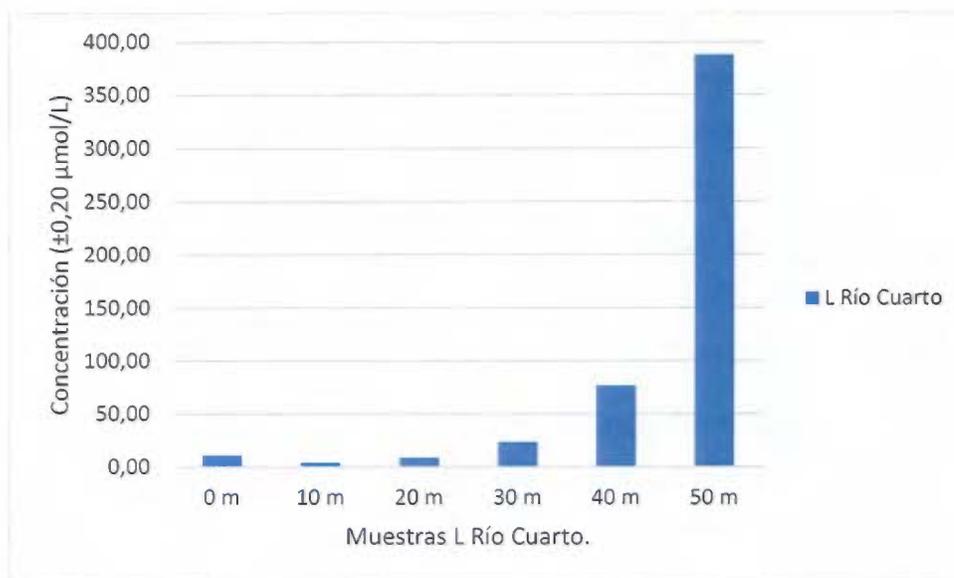
Tanto para nitrato y nitrito, en varios puntos no fue posible detectar estos analitos. La St 2 presenta la mayor concentración de nitrito, lo cual podría tener como consecuencia una acidificación superior en ese punto de muestreo (Baker *et al.*, 1991). De acuerdo con el criterio descrito por Vollenweider (cuadro I) ningún punto de muestreo se define como eutrófico.

En el cuadro XXVIII se muestran las concentraciones obtenidas de las especies nitrogenadas en el muestreo de la Laguna de Río Cuarto.

**Cuadro XXVIII:** Concentraciones de las especies nitrogenadas en cada punto de muestreo de la Laguna de Río Cuarto.

Muestra	Amonio ( $\pm 0,20 \mu\text{mol/L}$ )	Nitrato ( $\pm 0,30 \mu\text{mol/L}$ )	Nitrito ( $\pm 0,18 \mu\text{mol/L}$ )
RC 0 m	10,81	3,71	3,19
RC 10 m	4,12	0,40	0,61
RC 20 m	8,89	0,43	0,55
RC 30 m	23,84	0,45	ND
RC 40 m	76,58	ND	ND
RC 50 m	388,10	ND	ND

La tendencia marcada de la concentración de amonio se puede observar en la figura 28.



**Figura 28:** Tendencia de la concentración del analito amonio en los distintos puntos de muestreo de la Laguna de Río Cuarto.

Aquí se denota el aumento de la concentración de amonio a mayor profundidad, y una disminución de las otras dos especies más oxidadas. Esto es por consecuencia de la presencia de materia orgánica en descomposición y la disminución de la disponibilidad de oxígeno en el fondo (Schindler, 1988). De acuerdo con el criterio descrito por Vollenweider (cuadro I) el punto de muestreo RC 40 m se define con mesotrófico y el punto RC 50 m es eutrófico.

## 5.7 OBSERVACIONES SOBRE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL.

Debido a que el método de cuantificación de fósforo total no cumplió con los criterios de aceptación establecidos, fue necesario realizar un análisis de las posibles causas de esto. La finalidad de utilizar este método de digestión era poder cuantificar las formas de fósforo disueltas orgánicas, ortofosfatos, particuladas, y aquellas asociadas a coloides, provenientes de fuentes bióticas y abióticas (Toy y Walsh, 1987). En el proceso de análisis, la parte primordial es la digestión completa de todas estas formas de fósforo (Benson *et al.*, 1996). Los procedimientos que se aplicaron fueron una adaptación de metodologías no automatizadas al equipo FIA. Este equipo cuenta con una unidad de digestión en línea con lámparas UV que, al momento de realizar el trabajo, no estaba instalada. Por este motivo se decidió evaluar los procesos de digestión fuera de línea, los cuales han demostrado su capacidad de cuantificación del analito en trabajos anteriores (Burton, 1973; Valderrama, 1981; Gales *et al.*, 1966).

Existen otras metodologías de digestión que podrían ser probadas a futuro, para no descartar la idea inicial de este trabajo. Una variación interesante es la propuesta por Benson (1996), donde a la mezcla de oxidante de persulfato de amonio se le agrega ácido perclórico diluido, esto implica el uso de un oxidante fuerte reduciendo su peligrosidad para después someterlo a condiciones de presión altas en la autoclave, de la misma forma se podría utilizar ácido nítrico según Jenkins (1968). El uso de distintos ácidos fuertes se mantiene en procura de obtener el pH ideal para dar la formación del complejo de molibdato (Koroleff, 1977).

Hardwood et al (1969), sugieren además la aplicación de peróxido de hidrógeno para asegurar la digestión completa. Según Gales et al. (1966) la hidrólisis ácida junto con la presión alta aplicada ha demostrado ser útil para descomponer totalmente fosfatos inorgánicos condensados, incluyendo metafosfato de sodio, glucosa-1-fosfato, pero con este tratamiento no fue posible obtener porcentajes de recuperación aceptables para adenosina-5-monofosfato. Vogler (1966) obtuvo buena recuperación de glucosa-1-fosfato con digestión ácida con ácido sulfúrico, pero obtuvo nula recuperación del compuesto fosfocolina.

Para futuros trabajos con digestiones ácidas, se debe tomar como sugerencia, los compuestos que trabajó Gales, que fueron lecitina, triptona, fosfocolina, y ácido fenilfosfónico, además de algún compuesto inorgánico como metafosfato de sodio, para probar una eficiencia de digestión con un rango más amplio de compuestos. Si se toma en cuenta que estos procesos de digestión propuestos podrían ser aplicados también para la cuantificación de nitrógeno total de forma simultánea, se podrían utilizar patrones que contengan analitos con nitrógeno orgánico como la urea.

Armstrong (1965) propuso que para lograr una oxidación completa se puede aplicar la foto-oxidación de la muestra con lámparas de mercurio que emiten radiación UV. La idea de este autor era la de encontrar el orden de las reacciones de descomposición de distintos compuestos orgánicos utilizando la radiación UV y distintas mezclas oxidantes, con los cuales obtuvo buenas recuperaciones para distintos compuestos orgánicos. Este principio de foto-oxidación es el que se aplica en el digestor en línea del equipo, pero al no tener la posibilidad de utilizarlo se podría aplicar el proceso de digestión propuesto por Benson (1994) el cual es una digestión con un microondas doméstico junto con distintas mezclas oxidantes como: I) Sulfato de amonio y cerio (IV) y ácido perclórico; II) Persulfato de amonio y ácido perclórico; III) Persulfato de sodio y ácido perclórico y IV) Persulfato de sodio en medio ácido.

## 5.8 RECOMENDACIONES PARA LAS METODOLOGÍAS DE DETERMINACIÓN DE AMONIO, NITRATO Y NITRITO.

De acuerdo con la bitácora llevada durante el desarrollo de este trabajo en los experimentos de control de calidad del analito amonio, existió el problema de no obtener una línea base constante durante los días 13 de abril, 04 de mayo y 10 de mayo. Este comportamiento se dio al inicio de los análisis, en apariencia debido a alguna oclusión o suciedad en este canal. Por tal motivo, se procedió a revisar la preparación de los reactivos y a realizar una limpieza rápida con agua desionizada a través de los canales. En caso de ser necesario, se realizó una nueva limpieza, con una solución cáustica de NaOH. A pesar de los problemas con la línea base al cuantificar amonio, en los experimentos de veracidad se obtuvieron buenos resultados, también al realizar las evaluaciones del efecto matriz, no se encontró problema. En el caso de los analitos nitrato y nitrito no se halló un problema mayor en los experimentos de control de calidad y se cumplieron los criterios de aceptación en el coeficiente de variación y en las recuperaciones de veracidad.

Se debe entonces de buscar alguna explicación para los resultados obtenidos en el canal de amonio. Una posibilidad es que el equipo FIA al trabajar un método de análisis continuo, se podría dar un problema de "Carry Over". Este efecto consiste en una contaminación cruzada durante el análisis de dos muestras sucesivas (Valcárcel y Castro, 1988). El equipo FIA Lachat Quick Chem 8500 cuenta con un sistema de colección de muestra, donde esta se aspira, y recorre todo el sistema de reacción hasta llegar al detector. Este colector es lavado con agua desionizada mientras la muestra recorre el sistema. Este efecto de "Carry Over" puede ser cuantificado al introducir en la secuencia de análisis cuatro estándares de concentración conocida: dos que contengan una concentración alta en el ámbito de concentración del método y otros dos de baja concentración; así se tendrán cuatro señales, que se pueden identificar como  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  y  $b_2$ . Entonces el efecto de "Carry Over" puede ser denotado como sigue:

$$K = \frac{b_1 - b_2}{a_1 - a_2} \quad (11)$$

Esta operación se debe de llevar acabo, cada vez que se encuentra algún valor fuera de lo esperado, y se debe de repetir en varios días sucesivos. Si el valor de  $K$  se encuentra entre un 0,5 y un 2, se dice que el efecto de “Carry Over” no influencia el resultado de forma significativa. Más allá de este ámbito, se recomienda realizar una revisión a las condiciones del equipo en el momento del análisis (Boneno *et al.*, 2005).

## 5.9 RESUMEN DE LOS CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LAS METODOLOGÍAS EVALUADAS.

En los cuadros XXIX, XXX y XXXI se resumen los parámetros de evaluación junto con su respectivo criterio de aceptación y si este se cumplió al final de este trabajo.

**Cuadro XXIX:** Resumen de los parámetros de evaluación con su respectivo criterio de aceptación obtenidos. Especie nitrato.

<b>Parámetro.</b>	<b>Criterio</b>	<b>Cumplimiento</b>
<b>Linealidad</b>	Coeficiente de Correlación $r^2 \geq 0,998$	Sí
<b>LC (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	2,7	NA
<b>LD (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	1,4	NA
<b>Veracidad</b>	Recuperaciones de los niveles fortificados (80- 120) %	Sí
<b>Precisión en términos de repetitividad</b>	Desviación estándar relativa de las muestras ( $DER_R \leq 20\%$ )	Sí
<b>Precisión en términos de reproducibilidad</b>	Criterio según las cartas de control Recuperaciones de los BFL (80- 120) %	Sí

**Cuadro XXX:** Resumen de los parámetros de evaluación con su respectivo criterio de aceptación obtenidos. Especie nitrato.

<b>Parámetro.</b>	<b>Criterio</b>	<b>Cumplimiento</b>
Linealidad	Coeficiente de Correlación $r^2 \geq 0,998$	Sí
LC ( $\mu\text{mol/L}$ )	2,8	NA
LD ( $\mu\text{mol/L}$ )	1,4	NA
Veracidad	Recuperaciones de los niveles fortificados (80-120) %	Sí
Precisión en términos de repetitividad	Desviación estándar relativa de las muestras ( $\text{DER}_R \leq 20\%$ )	Sí
Precisión en términos de reproducibilidad	Criterio según las cartas de control Recuperaciones de los BFL (80- 120) %	Sí

**Cuadro XXXI:** Resumen de los parámetros de evaluación con su respectivo criterio de aceptación obtenidos. Especie amonio.

<b>Parámetro.</b>	<b>Criterio</b>	<b>Cumplimiento</b>
Linealidad	Coefficiente de Correlación $r^2 \geq 0,998$	Sí
LC ( $\mu\text{mol/L}$ )	2,1	NA
LD ( $\mu\text{mol/L}$ )	1,1	NA
Veracidad	Recuperaciones de los niveles fortificados (80- 120) %	Sí
Precisión en términos de repetitividad	Desviación estándar relativa de las muestras ( $DER_R \leq 20\%$ )	Sí
Precisión en términos de reproducibilidad	Criterio según las cartas de control Recuperaciones de los BFL (80- 120) %	Sí

En el caso de fósforo total, ninguno de los criterios se cumplió aun con las modificaciones realizadas durante este trabajo.

## 6 CONCLUSIONES.

Según la evaluación de las metodologías de determinación de nitrato, nitrito y amonio en las dos matrices estudiadas se concluye que estas son idóneas para el alcance que fueron definidas en el Protocolo Operativo Normalizado del Laboratorio de Oceanografía Química. Aun así, se propone adicionar dos procedimientos de verificación rutinaria semanal; el primero, la evaluación de al menos 6 blancos fortificados de laboratorio para poder construir la carta de control y llevar un historial de comprobación. La construcción de estas cartas se puede llevar en la misma plantilla del software Excel®, utilizado en este proyecto, el cual se le entregó al usuario analista de este equipo. También, para el caso del analito amonio se debe de integrar en el PON, el procedimiento para la evaluación del efecto de "Carry Over" que podría ser significativo según las observaciones en las cartas de control que se construyeron en este trabajo.

Para el caso de la cuantificación del analito fósforo total, se recomienda evaluar alguna otra sustancia fosforada como patrón para así descartar que el proceso de digestión propuesto en este trabajo no es el adecuado. En caso del patrón de ATP utilizado, se evidencia que se debe integrar el proceso de digestión UV que no está conectado actualmente al sistema en línea. Una vez integrado este módulo de digestión, se debe de realizar la evaluación de todos los parámetros de mérito propuestos en este trabajo y extender el alcance del método a la cuantificación de nitrógeno total.

Con la cuantificación de las especies nitrogenadas en ambos puntos de muestreo se pudieron observar tendencias en la concentración de acuerdo con la variación de la profundidad de la columna de agua para el caso de la laguna de río Cuarto y la posición en el estuario según las muestras recolectadas del estero de Puntarenas. Esto es importante a la hora de desarrollar un modelo biogeoquímico en un sitio específico.

Se aporta un anexo con sugerencias para realizar modificaciones al Protocolo Normalizado de Operación (PON NUTRIS FIA, 2014), donde se indica el

procedimiento para integrar el control de calidad del método por medio cartas de control a partir de los datos obtenidos de una serie de blancos fortificados de Laboratorio, también se muestra el procedimiento para la evaluación del efecto del Carry Over. Estos dos procedimientos se deben de aplicar cuando el usuario analista observe: comportamientos erráticos de la línea base, recuperaciones bajas de muestras o después de aplicar un procedimiento de limpieza de los canales del equipo.

## Bibliografía.

1. Andrew, K. N.; Worsfold, P. J.; Comber, M., On-line flow injection monitoring of ammonia in industrial liquid effluents. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *95* (314), 33-43.
2. Allen, J.; Davey, H.; Broadhurst, D.; Heald, J.; Rowland, J.; Oliver, S.; Kell, D., High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat. Biotechnol* **2003**, *6* (21), 692-696.
3. Alvarado, G., *Los volcanes de Costa Rica: geología, historia, riqueza natural y su gente*. 3ra. ed.; UNED: 2008.
4. Armstrong, F. A., The determination of phosphorus in sea water. *Oceanogr. mar. Biol. ann.* **1965**, *33* (1), 79-93.
5. Baker, L. A.; Herlihy, A. T.; Kaufmann, P. R.; Eilers, J. M., Acidic lakes and streams in the : the role of acidic deposition. *Science*. **1991**, *3* (22), 1151-1154.
6. Benson, R. L.; Mckelvie, I. D.; Hart, B. T.; Truong, Y. B.; Hamilton, I. C., Determination of total phosphorus in waters and wastewaters by on-line UV thermal induced digestion and flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*. **1996**, *326* (11), 29-32.
7. Benson, R. L.; Mckelvie, I. D.; Hart, B. T., Determination of total phosphorus in waters and wastewaters by on-line microwave-induced digestion and flow-injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *291* (94), 233-242.
8. Boneno, J.; Fokakis, M.; Armbruster, D., Reagent Carryover Studies: Preventing Analytical Error with Open Clinical Chemistry Systems. *LabMedicine*. **2005**, *36* (11), 705-710.

9. Broecker, W. J.; Peng, T. H., Internal cycling and throughput pathways from river mouth to sea floor. In *Tracers in the sea.*, Observatory, L.-B. G., Ed. LaMont-Boherty Geological Observatory.: 1982.; p 690.
10. Burton, J. D., Problems in the Analysis of Phosphorus Compounds. *Water Resour Res.* **1973**, 7 (10), 291-397.
11. Cai, Y.; Guo, L., Abundance and variation of colloidal organic phosphorus in riverine, estuarine, and coastal waters in the northern Gulf of Mexico. *Limnol. Oceanogr.* **2009**, 54 (4), 1393-1402.
12. Camargo, J. A.; Alonso, A., Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas* **2007**, 16 (2).
13. Clesceri, L. S., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* American Public Health Association: 1998; Vol. 8th, p 1220.
14. QuickChem 8500 Automated Ion Analyzers. Training manual. 4th. ed.; Lachat., Department., T. S., Ed. 2008.
15. Desconocido. Quickchem 8500 Series 2 FIA System Features. (accessed 02/09/18).
16. Desconocido. QuikChem 8500 Series 2 FIA System Specs. (accessed 02/09/18).
17. Desconocido. QuikChem 8500 Series 2 FIA System: Components. (accessed 02/09/18).
18. Desconocido. ECA Laboratorios Acreditados. (accessed 01/2017).

19. Desconocido., Understanding "Brackish" Integration. Instruments., H. C. a. L., Ed. 2014.
20. Ebina, J.; Tsutsui, T.; Shirai, T., Simultaneous Determination of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Water Using Peroxidisulfate Oxidation. *Water Res.* **1982**, *17* (12), 1721-1726.
21. Egan, L. *Understanding "Brackish" Integration.*; 2014.
22. Esteves, F., Fundamentos de Limnología. 2nd. ed.; Interciencia.: Sao Pablo., 1998.; Vol. 2, pp 85-90.
23. Epifanio, C. E.; Maurer, D.; Dittel, A. I., Seasonal changes in nutrients and dissolved oxygen in the Gulf of Nicoya, a tropical estuary in the Pacific coast of Central America. *Hydrobiol* **1983**, *101* (41), 231-238.
24. García Robledo, E.; Corzo, A.; Pappaspyrou, S., A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Mar. Chem.* **2014**, *162* (23), 30-36.
25. Gales, M. E.; Julian, E. C.; Kroener, R. C., Method for Quantitative Determination of Total Phosphorus in Water. *J Am Water Works Assoc.* **1966**, *58* (10), 1363-1368.
26. Grasshoff, K.; Erhardt, M.; Kremling, K., *Methods of Seawater Analysis*. 3rd ed.; Wiley and Sons: 1995; Vol. 8th.
27. Granger, D. L.; Taintor, R. R.; Boockvar, K. S.; Hibbs, J. B., Measurement of

- nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol.* **1996.**, 4 (268.), 142-151.
28. Graham, R. B.; Gill, P. S., Estimates of Precision in a Standard Additions Analysis. *J Chem Ed* **1999**, 76 (6), 805-807.
29. Gross, A.; E. Boyd, C., A Digestion Procedure for the Simultaneous Determination of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Pond Water. *J World Aquacult Soc* **1998**, 29 (3), 300-303.
30. Guilford, S.; Hecky, R., Total nitrogen, total phosphorus, and nutrient limitation in lakes and oceans: Is there a common relationship? *Limnol. Oceanogr.* **2000**, 45 (6), 1213-1223.
31. Hernández Alpizar, L.; Coy Herrera, R., Evaluación de técnicas de cuantificación de Nitratos en agua potable para análisis en línea. *Tecnología en Marcha.* **2015**, 28 (4), 86-93.
32. Hirandani, L. H., Flow Injection Analysis: An overview. *J Crit Rev.* **2015.**, 2 (4), 19-24.
33. Hosmer, D. W.; Lemeshow, S., *Applied Logistic Regression.* 2nd ed.; New York., 2000; Vol. 12.
34. Hosomi, M.; Ryuchi, S., Simultaneous determination of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Freshwater samples Using Persulfate digestion. *Int. J. Environ. Studies* **2013**, 27 (4), 267-275.
35. Jacobson, W., Programa de formación continua en educación ambiental para profesores y asesores de enseñanza secundaria. UNESCO.: España., 1996.;

Vol. 3, pp 39-40.

36. Janus, L. L.; Vollendweider, R. A., The OECD Cooperative programme on Eutrophication: Summary Report-Canadian Contribution. Canada, M. o. E., Ed. Inland Waters Directorate: Burlington, Ontario, 1981; Vol. 4, p 58.
37. Jaromír, R.; Hansen, E. H., *Flow Injection Analysis*. 3rd ed.; John Wiley & Sons: Canada, 1994; Vol. 62, p 498.
38. Jenkins, D., The differentiation, analysis, and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters. *Water Adv Chem*. **1968**, 73 (6), 265-280.
39. Johnson, K. S.; Petty, R. L., Determination of Phosphate in Seawater by Flow Injection Analysis with Injection of Reagent. *Anal. Chem*. **1982**, 54 (4), 1185-1187.
40. Johnson, R.; Bhattacharyya, G. K., *Statistics Principles and Methods*. 2006; Vol. 8.
41. Khan, F. A.; Ansari, A. A., Eutrophication: An Ecological Vision. *Bot. Rev*. **2005**, 4 (71), 452-455.
42. Koroleff, F.; Hansen, H. P., Determination of Nutrients. In *Methods of Seawater Analysis*, 3rd ed.; Grasshoff, K.; Ehrhardt, K. M., Eds. Wiley-Vch: Canada, 1995; Vol. 10, pp 159-204.
43. Kress, N.; Brenner, S.; Brenes, L., Ecological Assessment of the Gulf of Nicoya, Costa Rica. Office of Agriculture & Food Security Bureau for Global Programs, F. S. a. R. U. A. f. I. D., Ed. Washington DC, EEUU., 1997.; p 50.

44. Kroon, H., Determination of nitrogen in water: comparison of a continuous-flow method with on-line UV digestion with the original Kjeldahl method. *Anal. Chim. Acta.* **1993.**, 3 (276), 287-293.
45. Kulkarni, A. A.; Vaidya, I. S., Flow Injection Analysis: An Overview. *J Crit Rev* **2015**, 2 (4), 19-24.
46. Magnusson, B.; Ornemark, U., *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* 2nd ed.; 2014.
47. Margalef, R., *Ecología*. 3 ed.; Omega: Universidad de Michigan., 1986.
48. Martín, C.; Domínguez, E., A new enzyme electrode for quantification of salicylic acid in a FIA system. *J Pharmaceut Biomed* **1999**, 19 (98), 107-113.
49. Meir, P. C.; Zünd, R. E., *Statistical Methods in Analytical Chemistry*. 2nd ed.; Jhon Wiley & Sons: Canada, 2005; p 456.
50. Menzel, D. W.; Corwin, N., The Measurement of Total Phosphorus in Seawater Based on the Liberation of Organically Bound Fractions by Persulfate Oxidation. *Limnol Oceanogr* **1965**, 10 (2), 280-282.
51. Miller, J. N.; Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education Limited.: 2010.
52. Miranda, K. M.; Espey, M. G.; Wink, D. A., A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide-Biol CH.* **2001.**, 5 (1), 62-71.

53. Molina Cabrera, E.; Hernández Garciadiego, L.; Gómez Ruiz, H., Determinación de nitratos y nitritos en agua. Comparación de costos entre un método de flujo continuo y un método estándar. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2003**, 47 (1), 88-92.
54. Nagul, E. A., The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Anal. Chim. Acta.* **2015**, 60 (82), 6-67.
55. Navidi, W., *Statistics for Engineers and Scientists*. 4th. ed.; Mc Graw Hill.: Colorado School of Mines., 2015.; Vol. 3.
56. Ongley, E. D., Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos Hídricos. In *Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos Hídricos.*, 1era. ed.; Unidas., N., Ed. FAO.: Roma, Italia., 1997; Vol. 2, pp 41-43.
57. Orive, E.; Elliott, M.; de Jonge, V. N., *Nutrients and Eutrophication in Estuaries and Coastal Waters*. Springer: London, 2002; Vol. 8th.
58. Pasquali, C. E.; Hernando, F. P.; Alegría, D. J. S., Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 7 (600), 177-182.
59. Patton, C. J.; Kryskalla, J. R. *Methods of Analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory—Evaluation of Alkaline Persulfate Digestion as an Alternative to Kjeldahl Digestion for Determination of Total and Dissolved Nitrogen and Phosphorus in Water.*; U.S Geological Service.: Denver, Colorado., 2003.
60. Roldán, G.; Jhon Jairo, R., *Fundamentos de limnología tropical*. Universidad de Antioquía.: Colombia., 2008; Vol. 15, p 440.

61. Ruzicka, J.; Hansen, E. H., Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta* **1975**, *78* (1), 145-157.
62. Ruzicka, J.; Harald, H., Injec Analysis: Form Beaker to Microfluidics. *Anal. Chem.* **2000**, *21* (45), 212-217.
63. Saeid, M.; D, M.; I, B., Rapid and simple flow injection analysis tandem mass spectrometric method for the quantification of melphalan in a lipid-based drug delivery system. *RCM* **2017**, *31* (18), 1481-1490.
64. Schindler, D. W., Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science* **1988**, *3* (22), 149-157.
65. Fuentes, P.; Wong Monge, A., Determinación de ácidos grasos, Glicerina libre y total en Biodiésel. *Ciencia y Tecnología* **2015**, *2* (31), 52-65.
66. Strickland, J. D.; Parsons, T. R., *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. 3rd ed.; Alger Press Ltd: Ottawa, 1972; Vol. 2, p 328.
67. Taverniers, I.; Marc, D. L.; Bockstaele, E. V., Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23* (8), 535-552.
68. Tabash, F. A., Un modelo biogeoquímico para el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **2006.**, *55* (1), 33-42.
69. Toy, A.; Walsh, E. N., *Phosphorus Chemistry in Everyday Living*. 1987.
70. Turner, A.; Chislock, M., Blinded by the stink: nutrient enrichment impairs the

perception of predation risk by freshwater snails. *Ecol Appl.* **2010**, *8* (20), 2089-95.

71. Trojanowicz, M., Flow Injection Analysis Origin and Development. In *Flow Injection Analysis of Food Additives*, 3rd ed.; Press, C., Ed. CRC Press: NW, 2015; Vol. 58, p 17.

72. Unknow. *Ammonia Nitrogen, USEPA by Flow Injection Analysis (FIA)*. US EPA: 2010; pp 1-4.

73. Valcárcel, M.; Luque de Castro, M. D., *Automatic Methods of Analysis*. 1998; Vol. 9.

74. Valcárcel, M.; Ríos, A., *La Calidad en los Laboratorios Analíticos*. 3ra. ed.; Reverté: 2002.

75. Valderrama, J. C., The Simultaneous Analysis of total Nitrogen and Total Phosphorus in Natural Waters. *Mar Chem* **1981**, *10* (60), 109-122.

76. Vollenweider, R., Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. O.E.C.D, Ed. Organisation for Economic Co-operation and Development.: 1981.; Vol. 3, p 14.

77. Weatherburn, M. H., Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Anal Chem.* **1967.**, *39* (8), 971-973.

78. Worsfold, P. J., Flow injection analysis as a tool for enhancing oceanographic nutrient measurements—A review. *Anal.Chim.Acta* **2013.**, *4* (52), 1-25.

79. Yan, X., *Linear Regresion Analysis: Theory and Computing*. World Scientific Publishing: 2009; Vol. 8, p 348.
80. Yaqoob, M.; Nabi, A.; Worsfold, P. J., Determination of Nitrite and Nitrate in Natural Waters Using Flow Injection with Spectrophotometric Detection. *J.Chem.Soc.Pak.* **2013.**, 35 (2), 533-539.
81. Yihua, C.; Laodong, G., Abundance and variation of colloidal organic phosphorus in riverine, estuarine, and coastal waters in the northern Gulf of Mexico. *Limnol Oceanogr.* **2009**, 54 (4), 1393-1402.

## ANEXO I. INFORME DE LA INCERTIDUMBRE.

Para realizar este anexo se sigue lo establecido en la guía CG 4 EURACHEM/CITAC. Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas 2012.

### **Determinación de nutrimentos en las matrices de agua salobre y dulce por el equipo FIA Lachat QuickChem 8500.**

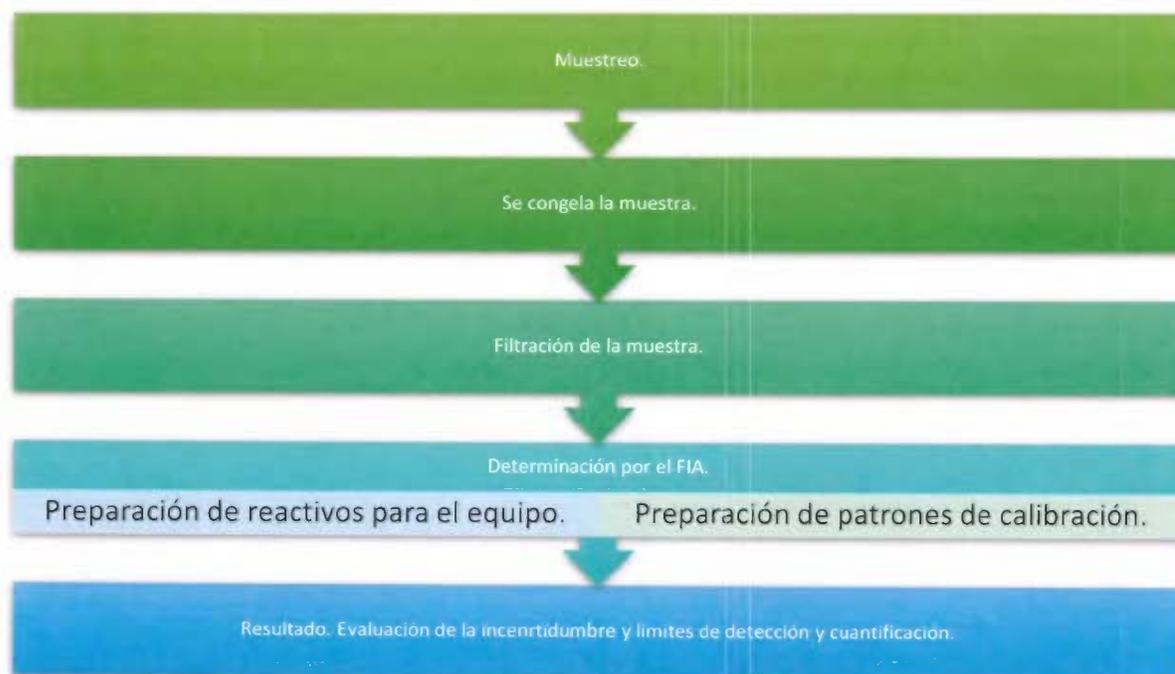
**Resumen. Determinación de nutrimentos nitrato, nitrito y amonio.**

#### **Objetivo.**

Se cuantifican estos nutrimentos utilizando el equipo de análisis por inyección en flujo. Procedimiento normalizado en el laboratorio de Oceanografía Química, CIMAR-UCR.

#### **Procedimiento de medición.**

En el diagrama de flujo de la Figura 29 se indican las distintas etapas para realizar la cuantificación de nutrimentos (nitrato, nitrito y amonio) en la matriz de agua dulce y salada.



**Figura 29:** Diagrama del procedimiento para la determinación de nutrimentos, nitrato, nitrito, amonio y fósforo total.

## Mensurando.

Es la concentración de cada nutriente determinado en ambas matrices según la recta de calibración externa y la señal transitoria dada por el equipo, tomando en cuenta algún factor de dilución que haya sido necesario realizar.

La concentración de los nutrientes amonio, nitrito y fósforo total está dada por la siguiente relación.

$$C_n = \frac{(A_o - b_o)}{m_1} * f_d \quad (12)$$

Donde:

$C_n$ : Concentración del nutriente.

$A_o$ : Área integrada de la señal generada por el fotodetector restando la señal del blanco.

$b_o$ : Ordenada en el origen de la curva de calibración.

$m_1$ : Pendiente de la curva de calibración.

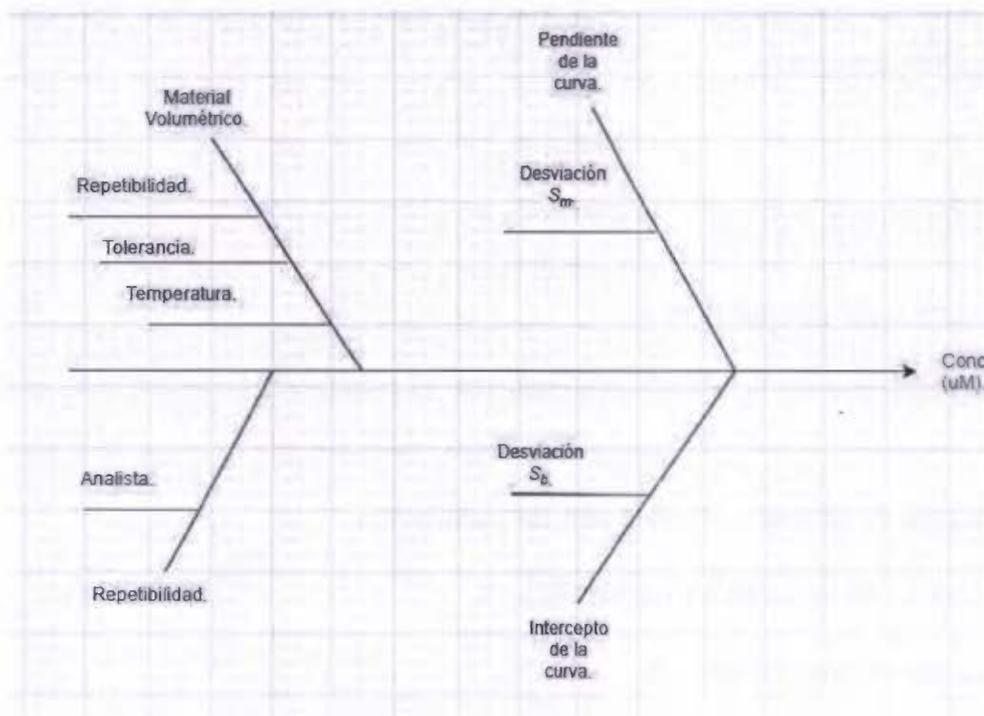
$f_d$ : Factor de dilución (si aplica).

Para el caso de la cuantificación de nitrato, el canal del equipo determina la señal de nitrato + nitrito, ya que la muestra en su totalidad pasa por la columna de Cadmio para que el nitrato sea reducido a nitrito. Por lo tanto, se agrega un factor más que es la señal de nitrito.

$$C_n = \frac{(A_o - b_o)}{m_1} * f_d - A_oNO_2 \quad (13)$$

### Identificación de las fuentes de incertidumbre.

Con el fin de encontrar las contribuciones más significativas para la incertidumbre se construyó un diagrama de causa-efecto que se muestra en la figura 30.



**Figura 30:** Diagrama de causa efecto para la cuantificación de la incertidumbre.

### Cuantificación de la incertidumbre.

Se determina directamente la contribución combinada a la incertidumbre de los resultados de todas las fuentes indicadas en la figura 28, usando datos del desempeño del método. Se presenta a continuación un ejemplo del cálculo de incertidumbre para una de las muestras analizadas.

**Ejemplo:** Análisis del 04 de mayo de un blanco fortificado de laboratorio 1, analito nitrito.

**Cuadro XXXII:** Variables y valores obtenidos para la pipeta aforada.

Variable.	Tolerancia.	Repetibilidad.
Volumen 5,00 ml.	0,03	0,0005

**Cuadro XXXIII:** Variables y valores obtenidos para la curva y la repetibilidad.

Variable.	Incertidumbre.
Repetibilidad.	0,053
S <sub>m</sub> .	0,0017
S <sub>b</sub> .	0,022

$$u(Cn) = Cnx \sqrt{\left(\frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{6}}\right)^2 + (\text{rep})^2 + (\text{temperatura})^2 + (\text{reanalista})^2 + S_m^2 + S_b^2}$$

$$u(Cn) = 11,10uMx \sqrt{\left(\frac{0,03}{\sqrt{6}}\right)^2 + (0,0005)^2 + \left(\frac{5x3x2.1x10^{-4}}{\sqrt{3}}\right)^2 + (0,053)^2 + (0,0017)^2 + (0,022)^2}$$

$$u(Cn) = 11,10uMx0,060$$

$$u(Cn) = 0,070$$

Incertidumbre expandida asociada a la concentración de nitrito a un 95% de confianza y un factor de cobertura  $K = 2u(cn) = u(\text{concentración})x2$

$$u(Cn) = 0,14$$

$$Cn = 11,10 \pm 0,14 uM.$$

## ANEXO II. MODIFICACIONES SUGERIDAS AL PROTOCOLO DE OPERACIÓN NORMALIZADO (PON NUTRIS FIA 2014, CIMAR LOQ) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ANALITOS NITRATO, NITRITO Y AMONIO EN AGUAS DULCES Y SALOBRES.

- Se sugiere agregar en las secciones tituladas como:

### H.1 Procedimientos. (Página 4 sección número 5 del PON):

Se debe mantener en el laboratorio y en un archivo de Excel accesible y titulado como “carta de control de blancos fortificados” y que sea del conocimiento del usuario analista, un gráfico de control de Shewhart actualizado, para los Blancos Fortificados de Laboratorio (blancos control) de cada nutrimento. Se deben de leer un mínimo de 3 blancos control (hasta 6) preparados a partir de patrones certificados de cada analito. Estos contienen una concentración que coincide con el patrón intermedio de la curva y con todos analitos que se deseen evaluar.

Para las cartas de control se plantea una hipótesis nula la cual es que el proceso está bajo control estadístico. Los puntos que queden fuera de los límites serán evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula.

Para definir los límites para  $S$  se asume que todas las muestras analizadas vienen de una población con media  $\mu$  y desviación estándar  $\sigma$ , entonces existen dos cantidades:  $\mu_s \pm 3\sigma_s$  así se puede estimar una cantidad con constantes cuyos valores dependen del tamaño de la muestra. Dichos valores están tabulados y se aplican para generar los límites estadísticos (Navidi, 2015). Para el caso de la carta de control  $\bar{X}$ , se aplica lo mismo que en las cartas  $\bar{S}$ , solamente que se trabaja con  $\mu_x \pm 3\sigma_x$ .

La frecuencia de evaluación de los blancos control queda a criterio del usuario analista, según se considere necesario al observarse: comportamientos erráticos de la línea base, recuperaciones bajas de muestras o después de aplicar un procedimiento de limpieza de los canales del equipo.

## J. Control y evaluación de la técnica. (Página 23 del PON):

### J.1 Evaluación del efecto de Carry Over.

Se preparan cuatro estándares de concentración conocida: dos que contengan una concentración alta en el rango de concentración del método y otros dos de baja concentración; así se tendrán cuatro señales, que se pueden identificar como  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$  y  $b_2$ . Entonces el efecto de "Carry Over" puede ser denotado como sigue:

$$K = \frac{b_1 - b_2}{a_1 - a_2} \quad (14)$$

Si el valor de  $K$  se encuentra entre un 0,5 y un 2,0%, se dice que el efecto de "Carry Over" no influencia el resultado de forma significativa. Más allá de este rango, se recomienda realizar una revisión a las condiciones del equipo en el momento del análisis

La frecuencia de evaluación del Efecto de Carry Over queda a criterio del usuario analista, según se considere necesario al observarse: comportamientos erráticos de la línea base, recuperaciones bajas de muestras o después de aplicar un procedimiento de limpieza de los canales del equipo.

ANEXO III. RESUMEN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE CONTROL DE CALIDAD DEL MÉTODO.

**Cuadro XXXIV:** Resumen de muestras analizadas durante los experimentos de control de calidad. Analito: Especies nitrogenadas.

<b>Muestra</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora inicio</b>	<b>Hora finalización</b>
(A) Estero Estación 1 Superficie	13/04/18	9:32 am	12:54 pm
(B) Estero. Estación 4 Superficie	13/04/18	9:32 am	12:54 pm
(C) Estero. Estación 5. Superficie.	13/04/18	9:32 am	12:54 pm
(D) Estero. Estación 6. Superficie.	13/04/18	9:32 am	12:54 pm
(A) Estero Estación 1 Fondo.	20/04/18	9:15 am	12:16 pm
(B) Estero Estación 2 Fondo.	20/04/18	9:15 am	12:16 pm
(C) Estero Estación 3 Fondo.	20/04/18	9:15 am	12:16 pm
(D) Estero Estación 4 Fondo.	20/04/18	9:15 am	12:16 pm
(A) Estero Estación 2 Superficie.	26/04/18	10: 33 am	1:43 pm
(B) Estero Estación 3 Superficie.	26/04/18	10: 33 am	1:43 pm

<b>Muestra</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora inicio</b>	<b>Hora finalización</b>
(C) Estero Estación 5 Superficie.	26/04/18	10: 33 am	1:43 pm
(D) Estero Estación 6 Fondo.	26/04/18	10: 33 am	1:43 pm
Fallo del equipo	10/05/18	Fallo del equipo	Fallo del equipo
(A) Estero Estación 2 Superficie.	30/05/18	9:10 am	12:55 pm
(B) Estero Estación 1 fondo.	30/05/18	9:10 am	12:55 pm
(C) Estero Estación 4 Fondo.	30/05/18	9:10 am	12:55 pm
(D) Estero Estación 3 Fondo.	30/05/18	9:10 am	12:55 pm
(A) Río Cuarto 40 m	24/05/18	10:30 am	1:30 pm
(B) Río Cuarto 50 m	24/05/18	10:30 am	1:30 pm
(C) Estero Estación 1 Superficie	24/05/18	10:30 am	1:30 pm
(D) Estero Estación 2 Superficie	24/05/18	10:30 am	1:30 pm
(A) Río Cuarto 0 m	08/06/18	11:14 am	4:30 pm
(B) Río Cuarto 10 m	08/06/18	11:14 am	4:30 pm
(C) Río Cuarto 20 m	08/06/18	11:14 am	4:30 pm
(D) Río Cuarto 30 m	08/06/18	11:14 am	4:30 pm

<b>Muestra</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora inicio</b>	<b>Hora finalización</b>
(A) Estero Estación 2 Superficie.	15/06/18	10: 45 am	2:15 pm
(B) Estero Estación 3 Superficie.	15/06/18	10: 45 am	2:15 pm
(C) Río Cuarto 40 m	15/06/18	10: 45 am	2:15 pm
(D) Río Cuarto 50 m	15/06/18	10: 45 am	2:15 pm

**Cuadro XXXV:** Resumen de muestras analizadas durante los experimentos de control de calidad. Analito: Fósforo total.

<b>Muestra</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora inicio</b>	<b>Hora finalización</b>
(A) Estero Estación 1 Superficie.	28/06/18	9:32 am	12:54 pm
(B) Estero Estación 5 Fondo.	28/06/18	9:32 am	12:54 pm
(C) Estero Estación 2 Fondo.	28/06/18	9:32 am	12:54 pm
(D) Estero Estación 6 Superficie.	28/06/18	9:32 am	12:54 pm
(A) Estero Estación 1 fondo.	06/07/18	10:32 am	1:50 pm
(B) Estero Estación 2 Superficie.	06/07/18	10:32 am	1:50 pm
(C) Estero Estación 3 Fondo.	06/07/18	10:32 am	1:50 pm

<b>Muestra</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora inicio</b>	<b>Hora finalización</b>
(D) Estero Estación 4 Fondo	06/07/18	10:32 am	1:50 pm
(A) Estero Estación 3 Superficie.	13/07/18	10:35 am	1:52 pm
(B) Estero Estación 4 Fondo.	13/07/18	10:35 am	1:52 pm
(C) Estero Estación 5 Fondo.	13/07/18	10:35 am	1:52 pm
(D) Estero Estación 6 fondo.	13/07/18	10:35 am	1:52 pm
(A) Estero Estación 1 Fondo.	20/07/18	10:12 am	1:40 pm
(B) Estero Estación 2 Superficie.	20/07/18	10:12 am	1:40 pm
(C) Estero Estación 3 Fondo.	20/07/18	10:12 am	1:40 pm
(D) Estero Estación 4 Superficie.	20/07/18	10:12 am	1:40 pm
(A) Río Cuarto 20 m	26/07/18	10:36 am	2:12 pm
(B) Río Cuarto 40 m	26/07/18	10:36 am	2:12 pm
(C) Río Cuarto 50 m	26/07/18	10:36 am	2:12 pm
(D) Lago Gonzáles 0 m	26/07/18	10:36 am	2:12 pm
(A) Río Cuarto 0 m	03/08/18	10:29 am	1:49 pm

Muestra	Fecha	Hora inicio	Hora finalización
Río Cuarto 10 m	03/08/18	10:29 am	1:49 pm
Río Cuarto 30 m	03/08/18	10:29 am	1:49 pm
L Gonzáles Fondo	03/08/18	10:29 am	1:49 pm

#### ANEXO IV. EJEMPLO DE CÁLCULO PARA LA EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD CON RECTAS DE CALIBRADO EXTERNO.

Se muestra un ejemplo de cálculo para la evaluación de la linealidad del analito nitrato. En el cuadro XXXVI se muestran los valores de la superficie generados por el software Omnion® para la curva realizada por triplicado.

**Cuadro XXXVI:** Datos de la curva para la evaluación de la linealidad mostrada en la Figura 9.

Patrón	Volumen alícuota (ml)	Concentración uM	Sup A	Sup B	Sup C	Promedio	Desvest
1	15,00	36,92	4,24	4,23	4,20	4,22	0,023
2	12,50	30,77	3,55	3,57	3,56	3,56	0,010
3	10,00	24,62	2,86	2,84	2,84	2,85	0,012
4	7,50	18,46	2,12	2,11	2,12	2,12	0,006
5	5,00	12,31	1,39	1,39	1,39	1,39	0,000
6	2,50	6,15	0,68	0,68	0,68	0,68	0,000
7	1,30	3,20	0,33	0,33	0,33	0,33	0,000
8	0,50	1,23	0,14	0,15	0,13	0,14	0,010

0,30            0,74                            0,06   0,05   0,07            0,06            0,010

---

\*Superficie del blanco fue igual a 0. Este es el 10mo patrón.

A partir de estos datos se procede a calcular los parámetros necesarios para realizar el cálculo del LC y LD según Meir y Zund (Método de cálculo fue referenciado en la propuesta de este proyecto). Los resultados se muestran en el cuadro XXXVII.

**Cuadro XXXVII:** Resultados de los parámetros calculados a partir del criterio de Meir y Zund.

<b>Número de datos</b>	<b>10</b>
<b>Sum X</b>	134,40
<b>Sum Y</b>	15,37
<b>Sum X<sup>2</sup></b>	3458,63
<b>SumY<sup>2</sup></b>	45,80
<b>Sum XY</b>	397,97
<b>Prom X</b>	13,44
<b>Prom Y</b>	1,54
<b>S<sub>xx</sub></b>	1652,20
<b>S<sub>yy</sub></b>	22,17
<b>S<sub>xy</sub></b>	191,37
<b>S<sub>y</sub></b>	0,02
<b>r</b>	1,00
<b>Desvest pendiente</b>	0,02
<b>Desvest intercepto</b>	0,01
<b>T student 95% (N-2)</b>	2,31

Así se determina un LD de 0,00 y un LQ de 3,9 µmol/L.