



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA

UNAN - MANAGUA

**RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QUÍMICA AMBIENTAL**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN
QUÍMICA AMBIENTAL**

TÍTULO:

**Boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) en finca Alemán
Martínez por el método azometina-H empleando espectroscopia
UV/VIS, LABSA-UNA, julio - diciembre 2019**

AUTORAS:

Br. Adriana Abigail Aguilar Matamoros
Br. Caroline Fabiana Del Castillo Eugarrios

TUTOR:

Lic. Irvin Miguel Alemán Vásquez

ASESOR METODOLÓGICO:

Esp. José Luis Prado Arroliga

Managua, junio del 2020

TÍTULO:

Boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) en finca Alemán Martínez por el método azometina-H empleando espectroscopia UV/VIS, LABSA-UNA, julio-diciembre 2019



ASPECTOS GENERALES

DEDICATORIA

A Dios

La presente tesis se la dedico primeramente a Dios, por darme siempre fuerzas para seguir adelante, por ser él quien guía mis pasos por el camino del bien y me dio la fortaleza necesaria para no desfallecer ante las adversidades.

A mis Padres

Helen Eugarríos, quien me ha apoyado y ha luchado día a día para que yo lograra alcanzar el sueño de graduarme y siempre han estado presente para darme su amor y cariño incondicionalmente. Por su comprensión en mis tropiezos y por la fortaleza que me han brindado para salir adelante.

Luis Moreira, aunque no lleve tu misma sangre siempre has estado apoyándome, quien ha puesto empeño en mi crianza y ha sido parte de edificar quien soy ahora, pero sobre todo por su amor.

A mi familia

A mis abuelos, *Helen Navarrete*, *Elena Tijerino* y *Noel Del Castillo*, quienes siempre me han demostrado su cariño y me tendieron su mano para poder seguir adelante.

A mis hermanos, por apoyarme incondicionalmente gracias por estar ahí en las diversas situaciones de la vida.

A mi tía *Davys* por el apoyo incondicional a lo largo de todos mis años de estudios.

Caroline Fabiana Del Castillo Eugarríos

A Dios

Esta monografía se la dedico primeramente a Dios por la fortaleza, la sabiduría y la salud para seguir a delante, mis logros que son resultado de tu ayuda y por guiar mis pasos por el buen camino.

A Mis padres

Por siempre apoyarme en cada paso que doy, gracias a su apoyo incondicional he podido culminar otra etapa en mi vida con éxito. Estar presente en cada decisión que tomo, estar presente para guiarme y aconsejarme, por apoyarme en momentos en los que no sabía cómo seguir gracias por estar presente en toda mi educación. Gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mí persona.

Adriana Abigail Aguilar Matamoros

AGRADECIMIENTOS

Dios primeramente por habernos dado salud, sabiduría, inteligencia y guiado a lo largo de mi carrera, por mi fortaleza en momentos de debilidad y por darme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo de felicidad.

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua(UNAN-Managua), por darme la oportunidad de cursar y alcanzar la meta con mucho éxito, gracias a cada uno de los profesores por haber compartido sus conocimientos durante los 5 años de la carrera, los cuales dieron lo mejor para formación profesional.

Laboratorio de suelo y agua de la Universidad Nacional Agraria (UNA), especialmente al *Ing. Luis Alberto Hernández* por abrir las puertas para la realización del estudio y por poner en disposición material, reactivos y equipos para los cuales se logró culminar esta investigación. Agradezco al personal de trabajo por su apoyo, cariño y compartir sus conocimientos.

Lic. Irvin Miguel Alemán Vásquez, por brindar su tiempo, conocimiento y su paciencia, agradezco sus aportes y consejos que fueron muy útiles para llevar a cabo el presente estudio.

Esp. José Luis Prado Arroliga, por la ayuda incondicional y el tiempo que me ha brindado

Br. Adriana Abigail Aguilar Matamoros, Te agradezco por ser mi compañera de tesis y apoyarnos mutuamente nuestra formación profesional

Br. Stephany Jennedieth Aragón González, Por formar parte importante de mi vida, por cada una de las experiencias compartidas

Caroline Fabiana Del Castillo Eugarrrios

Primeramente agradezco a Dios por darme salud, fuerza para seguir a delante en este camino, la sabiduría e inteligencia para culminar con éxito mi carrera.

Laboratorio de suelo y agua de la Universidad Nacional Agraria (UNA), por darnos la oportunidad y abrir las puertas para la realización de la investigación y por la confianza brindada en esta. Agradezco al personal de trabajo por su apoyo y tiempo.

Al **Ing. Luis Alberto Hernández** por esta oportunidad y confianza brindada, para la realización de esta investigación y por los conocimientos obtenidos en este proceso en cada etapa de esta investigación.

A nuestro tutor **Lic. Irvin Miguel Alemán Vásquez**, por su tiempo y paciencia proporcionada en cada etapa de la investigación y todos los conocimientos que adquirimos para la realización de esta.

Nuestro asesor metodológico **Esp. José Luis Prado Arroliga**, por el tiempo brindado y ayuda en la metodología de esta investigación.

Adriana Abigail Aguilar Matamoros



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Adriana Abigail Aguilar Matamoros y Caroline Fabiana Del Castillo Eugarríos, estudiantes de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua) con números de carné 15-04848-8 y 15-04233-9 respectivamente al haber cursado y aprobado el pensum de la carrera de Química Ambiental ofertada por la Facultad de Ciencias e Ingenierías por medio del Departamento de Química, damos fe y veracidad de la autoría y originalidad de la presente monografía bajo el Título: ***“Boro total en la hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) en finca Alemán Martínez por el método azometina-H empleando espectroscopia UV/VIS, LABSA-UNA, julio-diciembre, 2019.”*** el cual no ha sido previamente presentado por ningún otro autor a nivel nacional, dicha monografía presenta datos experimentales reales obtenidos única y exclusivamente por nosotras durante el período de realización de esta investigación.

Br. Adriana Aguilar

Br. Caroline Del Castillo

Aspirantes al Título de Licenciado (a) en Química Ambiental
UNAN-Managua



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



CARTA AVAL DEL TUTOR Y ASESOR

La presente Monografía bajo el Título: ***“Boro total en la hojas de limón Tahití (Citrus x latifolia) en finca Alemán Martínez por el método azometina-H empleando espectroscopia UV/VIS, LABSA-UNA, julio-diciembre, 2019”*** ha sido realizada por las bachilleres: Adriana Abigail Aguilar Matamoros y Caroline Fabiana Del Castillo Eugarríos con números de carné 15-04848-8 y 15-04233-9 respectivamente bajo la tutoría del ***Lic. Irvin Miguel Alemán Vásquez*** y la asesoría metodológica del ***Esp. José Luis Prado Arroliga***.

Ambos damos fe que las bachilleres han cumplido con todas las disposiciones y requisitos académicos según la ***Normativa de Modalidad de Graduación***, emitida por el Vicerrectorado de Docencia-Dirección de Docencia de Grado en mayo de 2017 y el ***Instrumento de Evaluación para Modalidades de Graduación del Departamento de Química*** en cuanto a la elaboración de la presente Monografía para optar al título de *Licenciada en Química Ambiental*.

Lic. Irvin Alemán
Docente Universitario
LABSA
Universidad Nacional Agraria

Esp. José Prado
Docente Universitario
Departamento de Química
UNAN-Managua

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de suelo y agua de la Universidad Nacional Agraria (UNA), con el fin de evaluar la concentración estimada de boro total presente en hojas de limón Tahití, pues de esta forma, se dispondrá de un método analítico para la determinación de boro total en muestras de tejido vegetal.

La cuantificación de boro total en las hojas del limón Tahití se realizó por espectroscopia ultravioleta/visible utilizando el método colorimétrico de la azometina-H, como tratamiento a las hojas se llevaron a combustión seca a una temperatura de 500 °C. Se tomaron 4 árboles a conveniencia, adicionalmente se obtuvo una muestra compuesta. Se analizaron las muestras por triplicado obteniendo un total neto de 30 análisis realizados entre dos analistas, los minerales totales y las concentraciones de boro total en las hojas del limón Tahití no son constantes, esto debido a las condiciones edafoclimáticas de cada árbol.

La concentración de boro promedio determinada, según la metodología experimental utilizada, fue de $43,89 \pm 2,46$ mg B/kg, este valor se sitúa en los niveles óptimos según el CENTA, el valor poco significativo estimado de la incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de las 30 muestras analizadas indica que el método colorimétrico de la azometina-H es un método adecuado para la determinación de boro total en las hojas de limón Tahití.

Palabras clave: *Método analítico, Boro total, Limón Tahití, Azometina-H*

ÍNDICE

Dedicatoria	i
Agradecimiento	iii
Declaración de originalidad.....	v
Carta aval tutor y asesor	vi
Resumen	vii

Capítulo I

1.1 Introducción	1
1.2 Planteamiento del problema.....	2
1.3 Justificación	3
1.4 Objetivos de investigación	4
1.4.1 Objetivo General	4
1.4.2 Objetivos Específicos.....	4

Capítulo II

2.1 Marco teórico.....	5
2.1.1 Descripción Botánica del Limonero (Citrus x latifolia)	5
2.1.1.1 Factores ambientales	6
2.1.2 Boro	7
2.1.2.1 Estructura	8
2.1.2.2 Propiedades	8
2.1.2.3 Boro en tejido vegetal	8
2.1.2.4 Absorción y distribución de boro en plantas	11
2.1.2.5 Rutas de entrada y salida del boro en las células	12

2.1.3 Espectroscopia molecular Ultravioleta Visible	13
2.1.3.1 Propiedades de la radiación electromagnética	13
2.1.3.2 Interacciones de la radiación con la materia	14
2.1.3.3 Absorción de la radiación	16
2.1.4 Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas	18
2.1.4.1 Cálculo de la incertidumbre estándar.....	18
2.1.4.1.2 Evaluación de incertidumbre estándar Tipo B.....	18
2.1.4.2 Cálculo de la incertidumbre estándar combinada	19
2.1.4.3 Cálculo de la incertidumbre expandida	19
2.1.5 Descripción General del Método de Análisis para la Cuantificación de Boro Total	20
2.1.5.1 Principio	20
2.1.5.2 Interferencias	23
2.2 Antecedentes.	24
2.3 Hipótesis.....	25

Capítulo III

3.1 Diseño metodológico	26
3.1.1 Descripción del ámbito de estudio	26
3.1.2 Tipo de estudio.....	26
3.1.3 Población y Muestra.....	27
3.1.3.1 Población.....	27
3.1.3.2 Muestra.....	27
3.2 Variables y Operacionalización.....	28
3.2.1 Variables Independientes.....	28
3.2.2 Variables Dependientes	28
3.2.3 Operacionalización de las variables.....	28
3.3 Materiales y métodos.....	29
3.3.1 Materiales para recolectar información	29

3.3.2 Fuentes de información.....	30
3.3.3 Materiales para procesar la información.....	30
3.3.3.1 Materiales	30
3.3.4 Método (Fase experimental).....	32
3.3.4.1 Muestreo	33
3.3.4.2 Preparación de la muestra	34
3.3.4.3 Determinación del porcentaje de humedad	34
3.3.4.4 Determinación de cenizas totales.	35

Capitulo IV

4. Análisis de resultados.....	39
4.1 Determinación de humedad en las muestras de la hojas de limón Tahití (<i>Citrus x latifolia</i>)	39
4.2 Determinación de las Cenizas Totales en las muestras de las hojas de limón Tahití (<i>Citrus x latifolia</i>) y blancos de análisis.....	41
4.2.1 Resultados del analista A.....	41
4.2.2 Resultados del analista B.....	42
4.3 Determinación de boro total por el método Azometina-H en la solución ácida digerida de las cenizas en hojas de limón Tahití (<i>Citrus x latifolia</i>), muestra control y blancos de análisis.	44
4.3.1 Resultados del analista A.....	46
4.3.2 Concentración de boro total en hojas de limón Tahití (<i>Citrus x latifolia</i>), muestra control y blancos de análisis.....	47
4.3.3 Resultados del analista B.....	48
4.3.4 Concentración de boro total en hojas de limón Tahití (<i>Citrus x latifolia</i>), muestra control y blancos de análisis.....	49
4.4 Cuantificación de boro total en hojas de limón Tahití (<i>Citrus x latifolia</i>), muestra control y blancos de análisis.....	51
4.4.1 Prueba de distribución normal múltiple de los datos experimentales de las concentraciones de boro total de las muestras de las hojas de limón Tahití	51

4.4.2 Prueba de distribución normal de los datos experimentales de las dos determinaciones de boro total de las muestras de las hojas de limón Tahití.....	52
4.5 Estimación de la incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de las concentraciones de boro total de las muestras analizadas por el método de Kragten según la guía QUAM 2012.....	53

Capítulo V

5.1 Conclusiones	56
5.2 Recomendaciones	57
5.3 Bibliografía	58
Anexo	1

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ubicación de la zona de muestreo	1
Anexo 2. Preservación y transporte de la muestra.....	3
Anexo 3. Preparación de la muestra.....	4
Anexo 4. Determinación del porcentaje de humedad.....	5
Anexo 5. Determinación de cenizas totales.....	6
Anexo 6. Calibración del equipo Ultravioleta/Visible	8
Anexo 7. Estándares de calibración del analista A para determinación de boro total.....	15
Anexo 8. Estándares de calibración del analista B para la determinación de boro total....	16
Anexo 9. Cuantificación de boro a partir de las cenizas de la hoja de limón Tahití (<i>Citrus x latifolia</i>).....	17
Anexo 10. Incertidumbre de la concentración de Boro de la hoja de limón Tahití (<i>Citrus x latifolia</i>).....	21
Anexo 11. Límites de cantidad de nutrientes en cítricos.	27
Anexo 12. Fertilizante.....	28
Anexo 13. Método de yema de los dedos.....	29

ÍNDICE DE DIAGRAMA

Diagrama 4. 1. Nivel de concentración de boro en el limón tahití.....	53
Diagrama 4. 2. Causa-efecto, diagrama ishikawa.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

figura 2. 1. Radiación electromagnética polarizada en plano que muestra el campo eléctrico oscilante en rojo y el campo magnético oscilante en azul. se muestra la amplitud de la radiación, a , y a su longitud de onda. normalmente, la radiación electromagnética no está polarizada, con campos eléctricos y magnéticos oscilantes presentes en todos los planes posibles perpendiculares a la dirección de propagación.....	14
figura 2. 2. Espectro electromagnético	15
figura 2. 3. Transmisión y color. el color es una propiedad importante de una sustancia. el color de la materia está relacionado con su capacidad de adsorción o reflectividad. el ojo humano ve el color complementario al que se absorbe, como se muestra en la figura.....	16
figura 2. 4. Reacción del azometina con el ácido bórico	20
figura 2. 5. Estructura geométrica molecular de la azometina	22
figura 3. 1. Ubicación labsa una.....	26
figura 3. 2. Secado de la muestra luego del lavado.	4
figura 3. 3. Secado de la muestra antes del secado en el horno.	4
figura 3. 4. Secado de la muestra en el horno a 60°.	4
figura 3. 5. Trituración de la muestra en el molino.	4
figura 4. 1. Primer peso de la muestra fresca.....	5
figura 4. 2. Se colocaron las muestras en el horno para la toma del segundo peso.....	5
figura 4. 3. Segundo peso de la muestra seca.	5

figura 5. 1. Se toma 1 g de la muestra seca para proceder a calcinar a 500°C	6
figura 5. 2. Muestra calcinada	6
figura 5. 3. Peso de las cenizas calcinadas para el cálculo de %ct	6
figura 6. 1. Set de estándar para la calibración del equipo ultravioleta/visible	9
figura 6. 2. Soluciones para la calibración del uv/vis	14
figura 6. 3. Calibración del equipo uv/vis	14
Figura 9. 1. Solución buffer con acetato de amonio, EDTA, agua HPLC y ácido acético.	17
Figura 9. 2. Preparación de la solución azometina-H con ácido ascórbico al 1%.	17
Figura 9. 3. Se agregaron 10 mL de ácido clorhídrico en los crisoles que contiene las cenizas.....	17
Figura 9. 4. Se calentó en un plato calefactor hasta ebullición.	17
Figura 9. 5. Se filtró el contenido del crisol a través de un papel de filtro, recibiendo el filtrado en un matraz volumétrico de 100 mL.....	18
Figura 9. 6. Se prepararon 6 estándares, en el que se miden alícuotas de la solución estándar de trabajo de B 10 ppm según la tabla 6 Y se transfieren a matraces volumétricos clase A de 100 mL y se almacenaron en un frasco de polietileno	18
Figura 9. 7. Se tomó del filtrado y de los estándares una alícuota de 4 mL y se agregó 4 mL de solución buffer y de la solución azometina-H dejando desarrollar el color por 1 hora para leer en el equipo las muestras, controles y blancos a una longitud de onda de 416 nm.....	20
Figura 12. 1. Portada de envase del fertilizante utilizado como muestra control.	28
Figura 12. 2. Tabla nutricional del envase del fertilizante utilizado como muestra control.	28

ÍNDICE DE GRÁFICOS

gráfica 4. 1. Porcentaje de humedad en las hojas del limón tahití (citrus x latifolia.....	40
gráfica 4. 2. Probabilidad normal múltiple de las determinaciones de los analistas a y b.	43
gráfica 4. 3. Probabilidad normal de las determinaciones de los analistas a y b.	44

gráfica 4. 4. Recta de calibrado no ponderada con sus respectivos límites de confianza (nivel de confianza del 95%) en cada punto de concentración 0,0 – 1,25 ppm de b para el.....	46
gráfica 4. 5. Recta de calibrado no ponderada con sus respectivos límites de confianza (nivel de confianza del 95%) en cada punto de concentración 0,0 – 1,25 ppm de b para el analista a.	49
gráfica 4. 6. Probabilidad múltiple de a, b.....	51
gráfica 4. 7. Distribución normal de los datos experimentales	52
gráfica 4. 8. Contribuciones de las incertidumbres estándares relativas en el cálculo de la incertidumbre expandida para la determinación de boro total.	55
Gráfica 6. 1. Región espectral visible.....	11
Gráfica 6. 2. Curva de calibración equipo UV/VIS 600 nm.....	12
Gráfica 6. 3. Curva de calibración UV/VIS 600 nm.....	12
Gráfica 6. 4. Curva de calibración UV/VIS 650 nm.....	13
Gráfica 6. 5. Curva de calibración 650 nm.....	13
Gráfica 6. 6. Curva de calibración 600-650 nm.....	13

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. 1. Descripción botánica de limón tahití (citrus x latifolia).	5
Tabla 2. 2. Rutas de entrada y salida del boro en la célula	12
Tabla 3. 1. Operacionalización de las variables	28
Tabla 3. 3. Equipos.....	30
Tabla 3. 4. Materiales	31
Tabla 3. 5. Reactivos.....	32
Tabla 3. 6. Volúmenes de alícuotas a medir para la preparación de la curva de calibrado	37

Tabla 4. 1. Determinación de humedad de la muestra de hojas de citrus x latifolia.....	39
Tabla 4. 2. Determinación de cenizas totales en las muestras analizadas de hojas limón tahití (citrus x latifolia), analista a	41
Tabla 4. 3. Determinación de cenizas totales en las muestras analizadas en las hojas de limón tahití (citrus x latifolia), analista b	42
Tabla 4. 5. Determinación de boro total en las muestras analizadas del árbol citrus latifolia, analista a	47
Tabla 4. 6. Determinación de boro en las muestras analizadas del árbol tahití analista b	49
Tabla 4. 7. Hoja de cálculo microsoft excel, método de Kragten	54
Tabla 6. 1. Set de estándares de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8
Tabla 6. 2. Valores de referencia de absorbancias para $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en $5 \times 10^{-3} \text{ m H}_2\text{O}$	10
Tabla 6. 3. Valores de referencia de absorbancia para $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2%) en 1% H_2SO_4	10
Tabla 6. 4. Absorbancia del set de estándares de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	12
Tabla 7. 1. Set de estándares del analista a para la curva de calibración para la determinación de boro total.....	15
Tabla 7. 2. Estadísticos de regresión de la determinación del analista a	15
Tabla 7. 3. Límite de la cantidad de nutrientes en cítricos.	27
Tabla 8. 1. Estándar de la curva de calibración del analista b para la determinación de boro.	16
Tabla 8. 2. Estadísticos de regresión para la determinación de boro total.	16
Tabla 10. 1. Hoja de cálculo optimizada con los estadísticos asociados en la regresión de la curva de calibración.....	24



CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

El boro es fundamental para la división celular y creación de células vegetales nuevas, además, juega un papel importante en la utilización y distribución de los glúcidos dentro de las plantas. También, interviene en la síntesis de la sacarosa y almidón.

Los cítricos deficientes en boro, se caracterizan por niveles menores de 15 a 20 ppm en materia seca, los niveles adecuados se encuentran en un intervalo comprendido entre 30 - 100 ppm; mientras que 200 ppm están asociado a síntomas de toxicidad. Por lo que la deficiencia de boro en las hojas de la planta provoca su exposición a enfermedades, plagas y sus niveles próximos al nivel superior de toxicidad, pueden causar la muerte de la planta, si no se mantiene dentro de los rangos.

El objetivo de la investigación tiene como designio cuantificar la concentración de boro en las hojas de la planta de limón Tahití (*citrus x latifolia*) por el método azometina-H mediante la técnica UV/VIS, subsiguientes de la eliminación de humedad, minerales o materia orgánica con ácido clorhídrico que podrían interferir en la realización del análisis, el cual aportará información científica en cuanto al contenido de boro en las hojas, estableciendo el análisis del micronutriente para el LABSA-UNA y ser utilizado de referencia para futuros estudios, extendiéndolo a otras especies de plantas que se requiere conocer la concentración de boro total.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El boro uno de los microelementos importante para crecimiento adecuado de la planta, al ser absorbido por la misma en concentraciones favorables y óptimas; su toxicidad puede causar la muerte y su baja concentración la deja expuesta a enfermedades y deterioro.

Por lo tanto, esto requiere una técnica precisa para determinar el nivel de boro en las plantas. La espectrofotometría es una técnica de espectrometría sin masa para la determinación de boro en muestras basadas en el uso de reactivos específicos. Se subdivide en dos categorías, la colorimétrica y la fluorimétrica. En el método colorimétrico, los reactivos reaccionan con el boro en solución para formar complejos de boro coloreados que se pasan a través de un detector donde la cantidad de luz absorbida se mide a una longitud de onda equivalente a las propiedades de color del reactivo utilizado. Los reactivos comúnmente utilizados a este respecto son; la curcumina, el carmín y la azometina-H.

En el laboratorio de suelo y agua de la Universidad Nacional Agraria no ha desarrollado un método analítico para determinar boro en tejido vegetal. Debido a lo anterior, se plantea la siguiente pregunta: ¿Mediante azometina-H se puede cuantificar boro total en hoja de *Citrus x latifolia* en el laboratorio de suelo y agua de la Universidad Nacional Agraria?

Las preguntas de sistematización correspondientes se presentan a continuación: ¿Cuáles son las propiedades botánicas y los mecanismos de reacción del boro en hoja de limón Tahití (*Citrus x latifolia*)? ¿Cuánto es el porcentaje de cenizas totales en la hoja de limón Tahití (*Citrus x latifolia*)? ¿Cuál es el nivel de concentración de boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) cuantificado por el método azometina-H por medio de espectroscopia ultravioleta/visible? ¿Qué incertidumbre expandida presenta el método asociada a la concentración final promedio de boro determinado en todas las muestras analizadas en hoja de limón Tahití (*Citrus x latifolia*)?

1.3 JUSTIFICACIÓN

La insuficiencia de boro en las plantas puede perjudicar el crecimiento, afectando el rendimiento, dependiendo de la gravedad de la deficiencia. Su exceso es tóxico para las plantas, los síntomas de toxicidad por boro pueden variar de necrosis de algunos órganos de la planta hasta la muerte de esta, dependiendo del rango de toxicidad.

El procedimiento analítico proporciona medios para evaluar y monitorear sustancias en el medio ambiente, el agua, el suelo y los materiales biológicos, tanto en términos cualitativos como cuantitativos. Hay varios métodos disponibles para detectar boro en diferentes matrices, se pueden clasificar como técnica basada en plasma, técnica de espectrometría de masas, enfoque ionométrico y método de espectrofotometría. Cada uno de estos métodos tiene ventajas, desventajas y límites de detección. Por lo tanto, se necesita un conocimiento previo del rango de concentración del mensurando en la muestra a investigar para seleccionar el método analítico apropiado.

La realización de esta investigación aportará información científica en cuanto a la determinación del contenido de boro en plantas y beneficiará directamente al laboratorio de suelo y agua de la Universidad Nacional Agraria, ya que dispondrá con un método adecuado para la determinación de boro en tejido vegetal. En adición a lo anterior, de este modo el laboratorio podría prestar servicios de ensayos a los productores nicaragüenses y así aportar al mejoramiento del estado nutricional de las plantas.

Al respecto conviene decir que esta investigación está basada en la presencia de boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) por el método de azometina-H empleando espectroscopia UV/VIS en el laboratorio de suelo y agua de la Universidad Nacional Agraria, julio-diciembre, 2019.

1.4 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1 Objetivo General

- Cuantificar la concentración de boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) en finca Alemán Martínez por el método azometina-H empleado espectroscopia UV/VIS en el laboratorio de suelo y agua de la Universidad Nacional Agraria, julio - diciembre, 2019.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Describir las propiedades botánicas y mecanismos de reacción del boro en las hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*).
2. Obtener la cantidad recobrada de boro total presentes en las cenizas totales en las hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) utilizando el método de pre-tratamiento por combustión seca.
3. Evaluar la concentración de boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) utilizando el método colorimétrico de azometina-H el cual cumple con la ley de Lambert-Beer.
4. Estimar la incertidumbre expandida asociada a la concentración final promedio de boro total determinada en todas las muestras de hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*).



CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 Descripción Botánica del Limonero (*Citrus x latifolia*)

En el limón Tahití (*Citrus x latifolia*) alcanza una altura de 6 a 7 metros. Su tronco es corto y sus ramas crecen en varias direcciones por lo que es necesario realizar poda de formación de manera sistemática. Posee brotes con espinas cortas y muy agudas.

Tabla 2. 1. Descripción Botánica de limón Tahití (*Citrus x latifolia*).

Clase	Dicotiledóneas
Sub-clase	Arquiclamídeas
Orden	Geraniales
Sub-orden	Geraniineas
Familia	Rutaceae
Sub-familia	Aurantioideas
Genero	Citrus
Especie	Latifolia
Nombre científico	Citrus latifolia.
Sinónimo	Citrus aurantifolia Yu. Tanaka, Swingle var. Tahití

Fuente: CENTA cultivo de limón Tahití.

El follaje es denso y de color verde, con hojas de tamaño medio, lanceoladas y con pecíolos alados. Las hojas nuevas y retoños, generalmente tienen coloración violeta.

La floración ocurre durante casi todo el año, principalmente en los meses de mayo-junio. Los frutos presentan tamaño medio grande; son ovalados, oblongos o levemente elípticos, con la base generalmente redondeada; ápice redondo superficie aureolar elevada en un pequeño montículo. Las semillas son escasas o ausentes.

La cáscara es, en general fina, con superficie lisa y color amarillo pálido cuando maduró; aunque para exportación el fruto debe presentar una cáscara con superficie ligeramente rugosa, verde oscuro y de tamaño mediano.

En promedio, los frutos están listos para la cosecha de 100 - 120 días después de la floración y presentan aproximadamente 10 segmentos con un eje pequeño generalmente sólido; la pulpa es de color amarillo verdoso pálido, succulento y ácido.

El conocimiento de la fenología del limón pérsico o Tahití, en las condiciones tropicales, es de suma importancia, para la optimización en el manejo del cultivo y el establecimiento de las condiciones necesarias para el aumento en la productividad.

2.1.1.1 Factores ambientales

Entre los factores ambientales que influyen en la producción comercial de limón Pérsico se encuentran la temperatura, agua, luz y viento.

a. Temperatura

En general, a temperaturas entre 25 °C a 31 °C el limón pérsico alcanza su máximo índice de crecimiento y además está asociado en presentar crecimientos y floraciones frecuentes, interrumpidos por la ocurrencia de períodos de déficit hídrico. En cambio a temperaturas entre 12 y 13 °C la mayoría de las especies cítricas presentan paralización de su crecimiento.

b. Requerimientos de agua

Por la producción continua de limón pérsico se requieren cantidades razonables de agua para riego en épocas con déficit hídrico, para que la cosecha de frutas no se interrumpa. Un nivel de 150-180 mm por mes es suficiente para suplir los requerimientos de la planta. Déficit hídrico provoca interrupción de la floración, fructificación, maduración anticipada del fruto, frutos de menor tamaño y menor cantidad de jugo en los frutos.

c. Luz

Para que el árbol de limón y sus frutos se desarrollen bien, necesitan de alta luminosidad. Se ha observado que al disminuir la intensidad de luz, el crecimiento de su nueva brotación se alarga y se presentan más débiles, menos floración, frutos más amarillos y más incidencia de insectos y enfermedades. Por lo que es necesario que el productor efectúe podas de cortinas y cercos que le permitan mayor captación de luz al cultivo.

d. Viento

Por su densa área foliar, el viento es un factor que se debe considerar al momento de establecer una plantación. No es recomendable establecer plantaciones en áreas expuestas a vientos con velocidades mayores de 20 km/h ya que causan daño en sus hojas, y roce de frutos con las ramas, desmejorando su calidad, a tal grado que no se puede comercializar. Por lo que se recomienda la utilización de cortinas rompe vientos.

2.1.2 Boro

El Boro es un elemento químico que ocupa el primer lugar del grupo III-A de la tabla periódica, de símbolo B, número atómico 5, y masa 10,811 g. (AQUISE, 2016)

Tiene tres elementos de valencia (trivalente) y se comporta como no metal. Se le clasifica como metaloide y es el único elemento de su grupo de carácter no metálico, con menos de cuatro electrones en la capa externa. Es semiconductor y tiene propiedades químicas más similares al carbono o al silicio que a otros elementos de su propio grupo.

El Boro no se encuentra de forma libre en la naturaleza, se encuentra principalmente en forma de boratos y abundantemente en el mineral bórax. Está ampliamente distribuido, tanto en el medio acuático como en el medio terrestre y la concentración en la que se le puede hallar es muy variada.

2.1.2.1 Estructura

El boro presenta multitud de formas alotrópicas que tienen como elemento estructural común un icosaedro regular.

El boro cristalino los icosaedros pueden asociarse de varias maneras para originar los alótropos correspondientes: Boro tetragonal (T - 50): formado por 50 átomos de boro por celdilla unidad, que son cuatro unidades icosaédricas unidas entre sí por algunos enlaces B - B y de dos boros elementales que actúan como unión tetraédrica entre icosaedros. Posee una densidad de 2,31 g/cm³.

Boro romboédrico alfa (R - 12): está formado por láminas de icosaedros unidas paralelamente. Las uniones intralaminares se efectúan por medio de enlaces de tres centros, mientras que las uniones interlaminares se producen mediante enlaces de dos centros. La densidad de este tipo de boro es de 2,46 g/cm³.

2.1.2.2 Propiedades

Muchas propiedades del boro no están lo suficientemente establecidas en forma experimental por la pureza discutible de algunas fuentes de boro, las variaciones en los métodos y las temperaturas de preparación.

El boro es inodoro e insípido; es insoluble en agua, alcoholes y soluciones de álcalis; es soluble en ácido nítrico y sulfúrico y en muchos metales fundidos como el aluminio, el calcio, el cobre, el hierro y el magnesio; el boro no se ve afectado por el aire a temperatura ambiente pero a temperaturas elevadas forma el nitruro y el óxido B₂O₃. A temperatura ambiente, su conductividad eléctrica es pequeña, pero es buen conductor de la electricidad a alta temperatura.

2.1.2.3 Boro en tejido vegetal

El boro es absorbido por la planta como ácido bórico H₃BO₃ por su aparato radicular o por vía foliar (García, 2003, pág. 361)

a. Un nutriente esencial

La esencialidad del boro para el desarrollo de las plantas fue demostrada por primera vez en leguminosas por Warington. El boro es un micronutriente esencial para plantas vasculares, diatomeas y algunas especies de algas verdes. No parece ser esencial para hongos y bacterias (con la excepción de las cianobacterias) ni tampoco para animales. (García, 2015)

El boro es un elemento que presenta una escasa movilidad en la planta. Esta característica se pone de manifiesto cuando se aplican disoluciones de sales de boro directamente por pulverización en algunas hojas de las plantas; el elemento queda fijado preferentemente en las hojas tratadas.

También está comprobado que las plantas jóvenes absorben el boro más intensamente que las adultas, y que la movilidad del elemento de los tejidos viejos a los jóvenes es pequeña. Incluso es frecuente que una hoja particular pueda contener suficiente boro, o exceso del mismo, mientras otra hoja del mismo tallo puede ser deficiente.

No obstante, cada vez hay más evidencias de que la movilidad del B en el floema varía drásticamente de unas especies a otras. A finales de los años noventa, se descubrió que las plantas transportan azúcares del tipo manitol o sorbitol presentan una importante retranslocación floemática de B. Esto se produce como consecuencia de la formación de complejos bis(diol) entre el B y dichos azúcares.

b. Función estructural

Actualmente, se sabe que el B está implicado en el mantenimiento de la estructura y la funcionalidad de la pared celular. Esto se ha conocido gracias al aislamiento y caracterización de los complejos rhamnogalacturonano-II-boro (RG-II-B), donde se puso de manifiesto la presencia de enlaces entre el B y residuos de apiosa unidos a, pectinas, lo que permite estabilizar la compleja red péctica y regular el tamaño de los poros de la pared celular.

Por eso, la baja concentración de boro en las plantas produce una disminución de los enlaces de borato entre las pectinas conduciendo a los síntomas de deficiencias de boro tan característicos.

Sin embargo, la función estructural del boro no explica totalmente los efectos de la deficiencia de B en las plantas, lo que hace pensar que este elemento podría desempeñar otras funciones.

Bolaños y Col propusieron que el B pudiese establecer enlaces covalentes con grupos cis-hidroxilo de moléculas que forman parte del citoesqueleto de las células como fosfoinositoles, glicoproteínas y glicolípidos. Wimmer y Col. confirmaron este hecho utilizando el ácido borónico en cultivos celulares. Este ácido es un derivado alquilo-aril substituido del ácido bórico con la fórmula química $R - BO_2H_2$ que contiene un enlace carbono-boro, perteneciente a la familia de los compuestos órgano-boranos.

El ácido borónico compite directamente con el ácido bórico en los enlaces del boro con las proteínas y su presencia en los cultivos de callos celulares altera la unión de las paredes entre dos células adyacentes. Estos investigadores identificaron proteínas microsomales que tenían una alta afinidad por los boronatos, y propusieron que el boro podría interactuar con la fracción de azúcares de los glicolípidos de las membranas confiriéndoles una gran estabilidad.

c. Metabolismo de glúcidos

Al boro se le atribuye un importante papel en la translocación de los azúcares en el interior de la planta. Está comprobado experimentalmente que la deficiencia de este elemento provoca una acumulación de azúcares en los tejidos. Este hecho se relaciona con la capacidad complejante que presenta el anión borato con los polialcoholes, y por ello se sugiere que cuando este elemento se halla en cantidad adecuada en la planta forma complejos boro-hidratos de carbono que favorecen la movilidad del azúcar.

2.1.2.4 Absorción y distribución de boro en plantas

a. Absorción rápida de boro por las plantas

Todos los nutrientes minerales esenciales de las plantas son absorbidos en su forma iónica. La carga de estos nutrientes reduce en gran medida su permeabilidad a través de las membranas celulares, una característica que es fundamental para que las células puedan controlar su composición interna. El uso selectivo de una amplia gama de proteínas transportadoras de membrana, permite a las células regular el flujo de nutrientes, y expulsar o compartimentar internamente moléculas tóxicas o nutrientes en exceso.

El boro es una excepción al resto de nutrientes; ya que a pH fisiológico, existe como ácido bórico no cargado. Los solutos neutros pequeños de esta naturaleza tienen una alta permeabilidad a través de las bicapas lipídicas que constituyen la base de las membranas biológicas.

b. Distribución de boro en las plantas sin necesidad de transportadores de membrana

El boro es capaz de moverse en las plantas a través de la ruta simplástica y apoplástica a través de difusión y flujo másico. En el apoplasto, el flujo de agua impulsado por la transpiración puede llevar cualquier soluto disuelto en él, así que el boro puede viajar rápidamente grandes distancias en el xilema.

En esta ruta, las diferencias de concentración de boro entre la xilema y los tejidos circundantes (por ejemplo, tallo, hojas) crean un gradiente de concentración que hace que el boro entre en estos tejidos por difusión pasiva con o sin la participación de canales de boro. Muchos estudios han demostrado la estrecha relación entre la acumulación de boro en las hojas y las tasas de transpiración.

El boro no se requiere cantidades grandes en el tejido vegetal, pero puede ocasionar problemas de crecimiento y desarrollo sino están en niveles adecuados.

El boro se diferencia de los demás micronutrientes porque no hay clorosis asociada a su insuficiencia, no obstante, tiene síntomas de toxicidad igual.

La influencia de boro en las paredes celulares es aspecto altamente importante. Está comprobado que la célula de las plantas deficientes presenta una membrana más delgada que las plantas normales. (García, 2003, pág. 362)

Los síntomas principales reflejan dificultades en la división y desarrollo celular. Las células se dividen pero la disociación no se produce correctamente, por lo que se presenta un progreso inconcluso e irregular, que aparecen distorsionadas, y una falta de elongación de los entrenudos.

2.1.2.5 Rutas de entrada y salida del boro en las células

Existen tres principales vías por las que el boro entra y sale de las células: a) pasivo, difusión bidireccional a través de la bicapa lipídica, b) difusión pasiva bidireccional a través de canales selectivos o no selectivos y c) transporte activo de excreción de boro.

Tabla 2. 2. Rutas de entrada y salida del Boro en la célula

Pasivo	Difusión bidireccional a través de la bicapa lipídica La bicapa de fosfolípidos, estructura básica de la membrana biológica, presenta alta
Permeabilidad al boro	Esto se ha puesto de manifiesto en los múltiples ensayos en los que se ha medido la permeabilidad de este nutriente en diferentes vesículas celulares.
Difusión pasiva bidireccional	A través de canales selectivos o no selectivos Además de la difusión a través de la bicapa lipídica, hay evidencias de que, en las membranas plasmáticas, al menos hay un camino paralelo que implica el empleo de canales de membrana que pueden facilitar el movimiento de boro en las plantas, pero no queda claro si el boro es el sustrato deseado, o simplemente un viajero oportunista
Transporte activo de excreción de boro	Transporte activo de excreción de boro A pesar de la rápida entrada de boro en las células, algunos tejidos de las plantas son capaces de mantener la concentración interna de boro por debajo de la del medio externo.

Fuente: Boro en planta y suelo. García (2003)

2.1.3 Espectroscopia molecular Ultravioleta Visible

Las medidas basadas en la luz y otras formas de radiación electromagnética se utilizan mucho en química analítica. Las interacciones de la radiación con la materia son el tema de la ciencia denominada espectroscopia. Los métodos analíticos espectroscópicos se fundamentan en medir la cantidad de radiación que producen o absorben las especies moleculares o atómicas de interés. Es posible clasificar los métodos espectroscópicos según la región del espectro electromagnético utilizado para la medida.

2.1.3.1 Propiedades de la radiación electromagnética

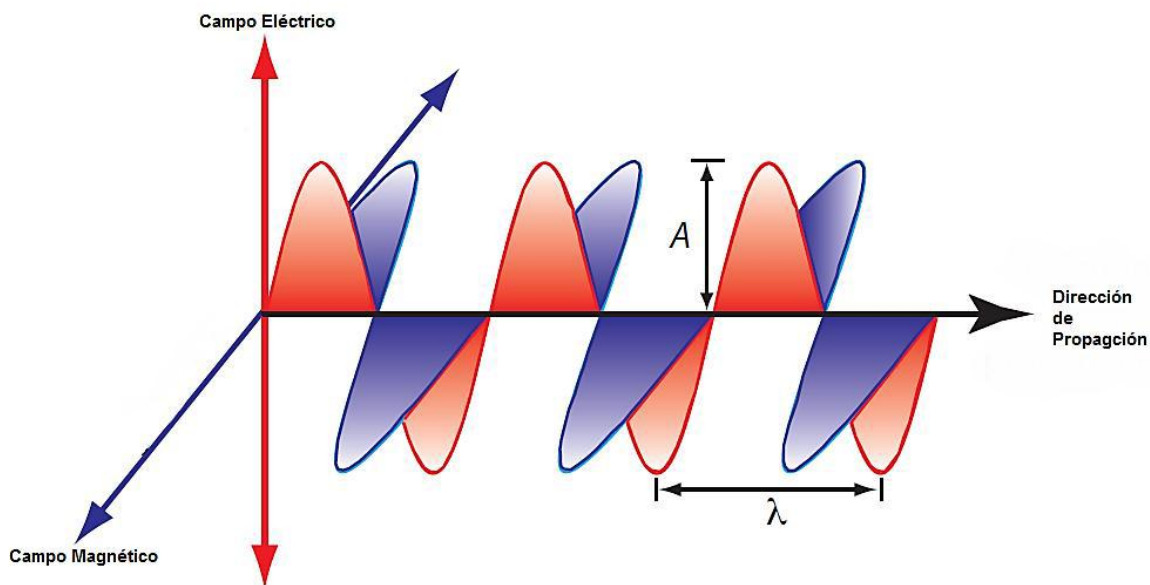
La radiación electromagnética es una forma de energía que se transmite por el espacio a enorme velocidad. Se denomina luz a la radiación electromagnética en las regiones del UV/visible, y en ocasiones de la región IR, si bien el sentido estricto del término abarca sólo la radiación visible.

La radiación electromagnética puede describirse como una onda con propiedades de longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud.

a. Propiedades de la onda

La radiación electromagnética es una forma de energía radiante que se propaga en forma de ondas transversales. Su vibración es perpendicular a la dirección de su propagación, lo cual imparte un movimiento ondulatorio a la radiación, como se muestra en la (figura 2.1). La onda se describe ya sea en términos de su longitud de onda, que es la distancia que ocupa un ciclo completo, o en función de su frecuencia, que es la cantidad de ciclos que pasan por un punto fijo por unidad de tiempo. Al recíproco de la longitud de onda se llama número de onda, y es la cantidad de ondas que hay en una longitud unitaria, o sea la distancia por ciclo. (Christian, 2009)

Figura 2. 1. Radiación electromagnética polarizada en plano que muestra el campo eléctrico oscilante en rojo y el campo magnético oscilante en azul. Se muestra la amplitud de la radiación, A , y a su longitud de onda. Normalmente, la radiación electromagnética no está polarizada, con campos eléctricos y magnéticos oscilantes presentes en todos los planos posibles perpendiculares a la dirección de propagación.



Fuente: Editado de Harvey, 2009, pág.545. Editado

b. Naturaleza de las partículas

En muchos tipos de interacciones de la radiación con la materia, es de utilidad considerar la luz como fotones o cuantos. Es posible relacionar la energía de un fotón con su longitud de onda, frecuencia y número de onda.

2.1.3.2 Interacciones de la radiación con la materia

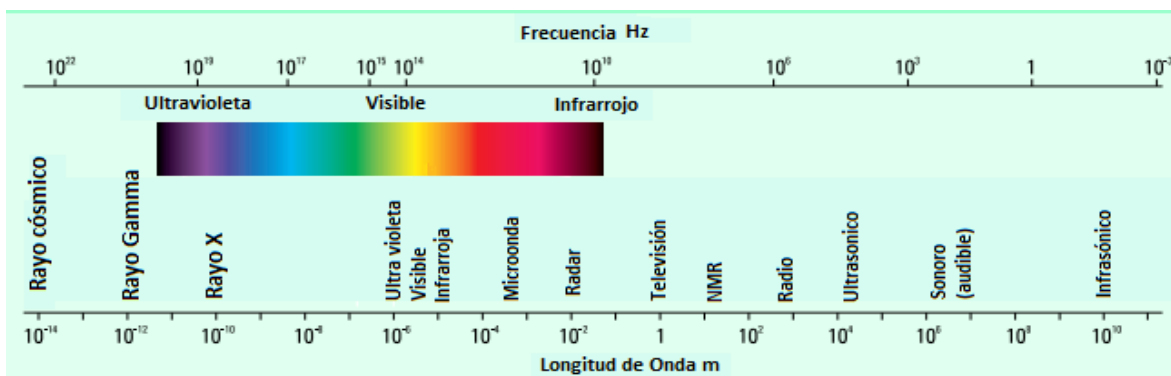
Los tipos más interesantes de interacciones en espectroscopia abarcan transiciones entre diversos niveles de energía de especies químicas. Otros tipos de interacciones como la reflexión, refracción, dispersión elástica, interferencia y difracción, están más relacionados con las propiedades generales de la materia, no con los niveles de energía de moléculas o átomos específicos. Aunque estas

interacciones también son interesantes en espectroscopia, aquí se analizarán las interacciones con transiciones de niveles de energía. Los tipos específicos de interacciones observados dependen en gran parte de la energía de la radiación utilizada y del modo de detección.

a. Espectro electromagnético

El espectro electromagnético abarca un amplio intervalo de energías (frecuencias) y, por tanto, de longitudes de onda. Las frecuencias útiles varían de $>10^{19}$ Hz (rayos γ) hasta 10^3 Hz (ondas de radiofrecuencia). Por ejemplo, un fotón de rayos X ($\nu \sim 3 \times 10^{18}$ Hz, $\lambda \sim 10^{-10}$ m) tiene casi 10 000 veces más energía que otro emitido por una bombilla o foco ordinario ($\nu \sim 3 \times 10^{14}$ Hz, $\lambda \sim 10^{-6}$ m) y 10^{15} veces más energía que un fotón de radiofrecuencia ($\nu \sim 3 \times 10^3$ Hz, $\lambda \sim 10^5$ m).

Figura 2. 2. Espectro electromagnético



Fuente de *Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy*. Editado

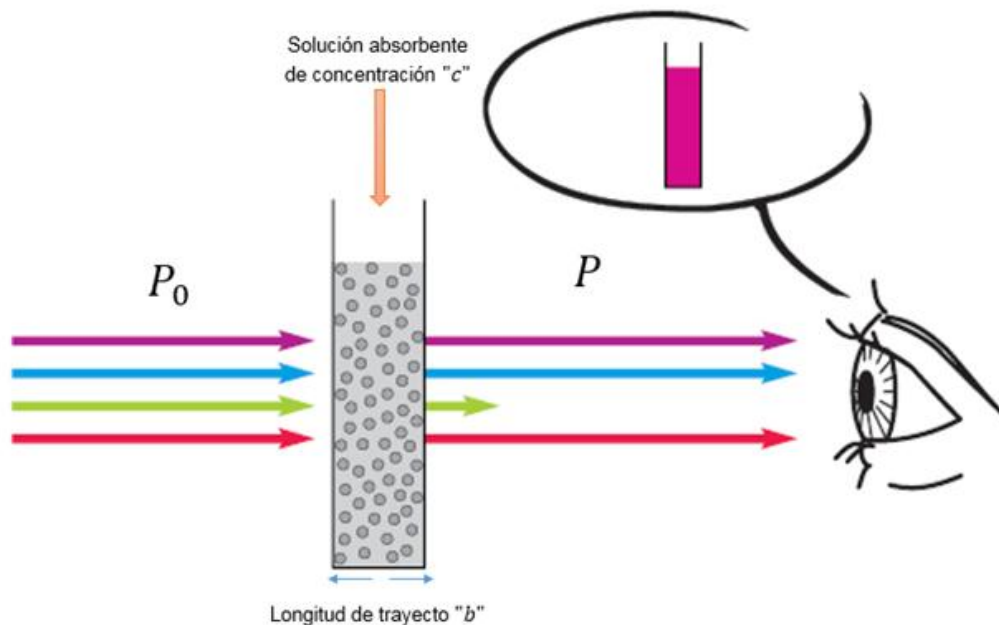
b. Medidas espectroscópicas

Los espectroscopistas emplean la interacción de la radiación con la materia para obtener información sobre las muestras, Diversos elementos químicos se descubrieron mediante espectroscopia.

Habitualmente la muestra se estimula en cierto modo al aplicar energía en la forma de calor, energía eléctrica, luz, partículas o una reacción química. Antes de la aplicación del estímulo, el analito está predominantemente en su estado de energía más bajo, o estado fundamental.

Posteriormente, el estímulo hace que alguna especie del analito experimente una transición a un estado de mayor energía o estado excitado. Se obtiene información sobre el analito al medir la radiación electromagnética emitida conforme regresa al estado fundamental o al cuantificar la radiación electromagnética que se absorbe como resultado de la excitación. (Skoogf & A.)

Figura 2. 3. Transmisión y color. El color es una propiedad importante de una sustancia. El color de la materia está relacionado con su capacidad de adsorción o reflectividad. El ojo humano ve el color complementario al que se absorbe, como se muestra en la figura.



Fuente: Editado de *Fundamentals of Uv-visible Spectroscopy*

2.1.3.3 Absorción de la radiación

Este proceso transfiere energía a la molécula y disminuye la intensidad de la radiación electromagnética incidente.

a. Transmitancia y absorbancia

La transmitancia T de la solución (figura 2.3) es la fracción de radiación incidente que se trasmite en la solución, como se muestra en la ecuación 2.1. Es frecuente que se exprese como un porcentaje, denominado porcentaje de transmitancia.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (2.1)$$

La absorbancia A de una solución se relaciona con la transmitancia de manera logarítmica, como lo indica la Ecuación 2.2.

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T \quad (2.2)$$

b. Ley de Lambert-Beer

Según la ley de Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente c y la longitud de trayecto b del medio de absorción (figura 2.3) como se muestra en la ecuación 3.

$$A = \frac{P_0}{P} = abc \quad (2.3)$$

Aquí a es la constante de proporcionalidad llamada absorptividad. Dado que la absorbancia es una cantidad, la absorptividad debe tener unidades que elimine a las de b y c . Por ejemplo si c tiene como unidades $g L^{-1}$ y b tiene cm , la absorptividad posee las unidades de $L g^{-1} cm^{-1}$.

$$A = \epsilon bc \quad (2.4)$$

Cuando se expresa la concentración en la ecuación 3 con moles por litros, y b en centímetros, la constante de proporcionalidad se llama absorptividad molar y recibe el símbolo especial de ϵ , en la ecuación 4 ϵ tiene unidades de $L mol^{-1} cm^{-1}$.

2.1.4 Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas

Parámetros asociados al resultado de medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuido al mensurado

2.1.4.1 Cálculo de la incertidumbre estándar

Antes de combinarlas, todas las contribuciones de las incertidumbres deben estar expresadas como incertidumbres estándar, es decir, como desviaciones estándar. Esto puede implicar la conversión de algunas de las otras medidas de dispersión. Las reglas siguientes dan una orientación para convertir un componente de la incertidumbre en una desviación estándar.

2.1.4.1.1 Evaluación de incertidumbre estándar Tipo A

Evaluación de un componente de incertidumbre de medición por un análisis estadístico de valores de cantidades medidos bajo condiciones de medición definidas

Nota

- Para información acerca del análisis estadístico, vea por ej. la GUM:1995
- Vea también GUM:1995, 2.3.2, ISO 5725, ISO 13528, ISO/TS 21748, ISO 21749.

2.1.4.1.2 Evaluación de incertidumbre estándar Tipo B

Evaluación de un componente de incertidumbre de medición determinado por otra forma que la evaluación de incertidumbre de medición Tipo A

Ejemplos:

- Evaluación basada sobre información
A con valores de cantidad publicados por organizaciones normalizadas.
- Asociada con el valor de cantidad de un material de referencia certificado.
- Obtenida de un certificado de calibración.

- Obtenida a partir de la clase de exactitud de un instrumento de medición verificado.

2.1.4.2 Cálculo de la incertidumbre estándar combinada

Después de estimar los componentes individuales o los grupos de componentes de la incertidumbre y de expresarlos como incertidumbres estándar, el siguiente paso es calcular la incertidumbre estándar combinada. En algunos casos, las expresiones para combinar incertidumbres se reducen a formas mucho más sencillas. Aquí se dan dos reglas simples para combinar incertidumbres estándar.

Regla 1

Para modelos que supongan solo una suma o diferencia de cantidades, por ejemplo $y = (p+q+r+\dots)$, la incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$ viene dada por:

$$u_c(y(p, q \dots)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (2.4)$$

Regla 2

Para modelos que impliquen un producto o un cociente, por ejemplo $y = (p \times q \times r \times \dots)$ o $y = p / (q \times r \times \dots)$, la incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$ es dada por:

$$u_c(y) = y \sqrt{\left[\frac{u(p)}{p}\right]^2 + \left[\frac{u(q)}{q}\right]^2 + \dots} \quad (2.5)$$

2.1.4.3 Cálculo de la incertidumbre expandida

Cantidad definiendo un intervalo acerca del resultado de una medición, en el cual puede esperarse que se encuentre una fracción grande de la distribución de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando.

Notas

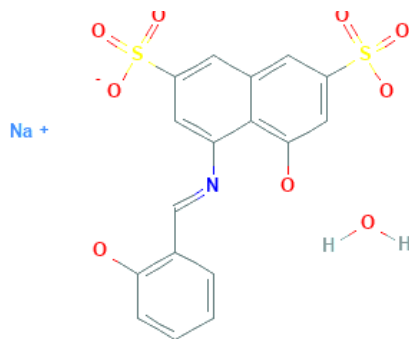
- i. La fracción puede ser estimada como una probabilidad de cobertura o el nivel de confianza del intervalo.
- ii. La incertidumbre expandida U es calculada a partir de la incertidumbre estándar (y) combinada y un factor de cobertura k .
- iii. La incertidumbre expandida provee un intervalo dentro del cual el valor del mesurando se cree que se encuentra con un nivel de confianza alto. La elección del factor k se basa en el nivel de confianza deseado.

2.1.5 Descripción General del Método de Análisis para la Cuantificación de Boro Total

2.1.5.1 Principio

Azometina-H, un producto de condensación de salicilaldehído y ácido H (ácido 8-amino-1-naftol-3,6-disulfónico), fue sugerido para la determinación cuantitativa del boro por Patrovsky (1963). Basson et al., 1969, quienes desarrollaron un procedimiento de utilización de azometina-H para la determinación de B en el tejido vegetal después de la incineración en seco y la disolución de la ceniza en ácido sulfúrico diluido. Este procedimiento para el tejido vegetal tenía la gran ventaja de estar libre de ácidos concentrados (Berger y Truog, 1944) y adaptable a la metodología automatizada. Wolf (1971, 1974) amplió el procedimiento para incluir extractos de suelo, aguas de riego, soluciones nutritivas, compost, abonos y tejidos vegetales. (Plank, 1992)

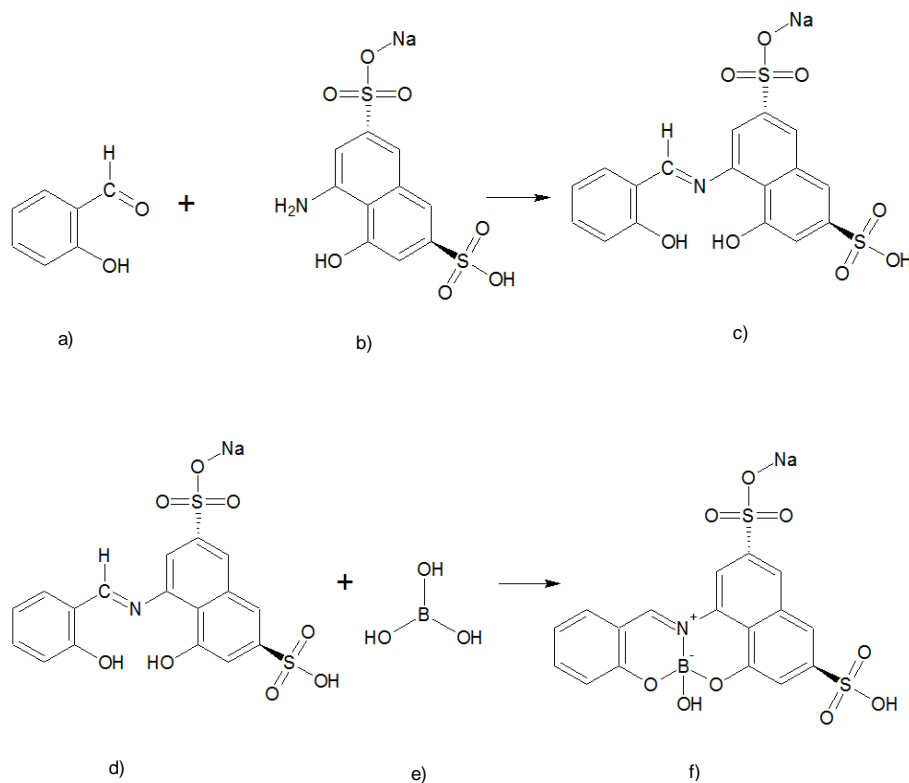
Figura 2. 4. Reacción del azometino con el ácido bórico



Fuente: Trazada en PubChem y visualizada en 2D Viewer por el equipo de trabajo.

La azometina-H es un reactivo colorimétrico para la detección de boro. Forma un complejo naranja con boro en solución acuosa. La capacidad de absorción molar de este complejo es de 415 nm. El rango de detección de boro en las soluciones de muestra es 1,0-6 ppm. Para detectar boro en muestras de plantas, EDTA se usa para enmascarar iones de cobre, hierro y aluminio.

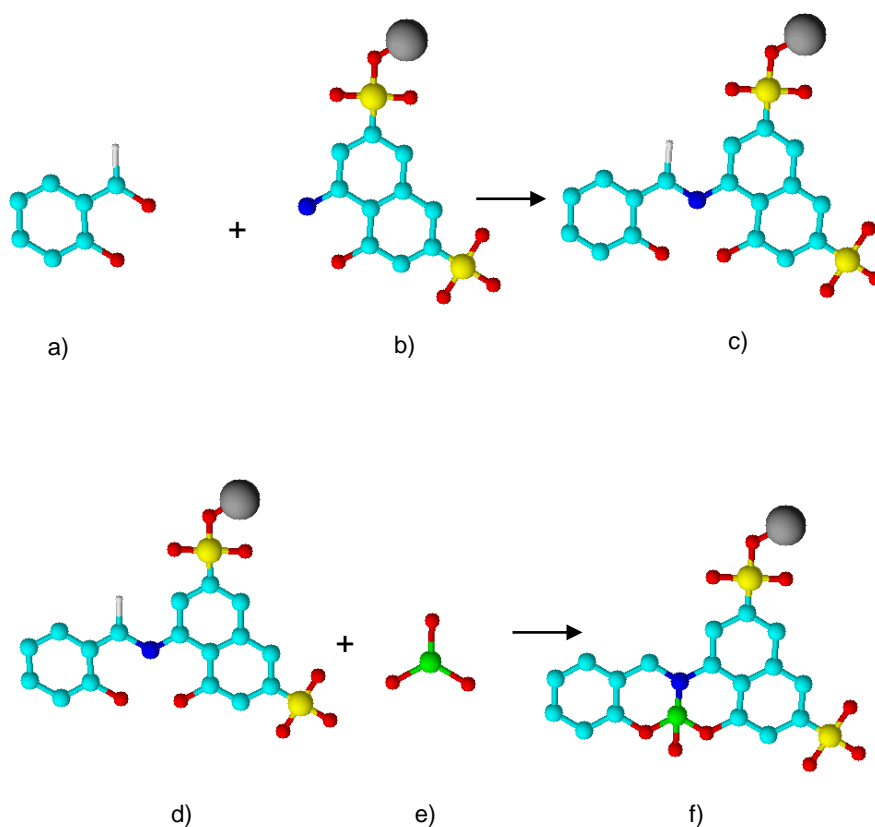
Figura 2. 5. Reacción del azometino con el ácido bórico



Fuente: Trazada en ChemSketch 12.0 y visualizada en 3D Viewer por el equipo de trabajo.

En “c” se presenta la estructura plana de la reacción de “a” 2-hidroxibenzaldehído y “b” ácido 8-hidroxi-1- (salicilideneamino) -3,6-naftalenodisulfónico, sal monosódica. El complejo “f” es producto de “d” y “e” ácido bórico.

Figura 2. 6. Estructura geométrica molecular de la azometina



Fuente: Trazada en ChemSketch 12.0 y visualizada en 3D Viewer por el equipo de trabajo.

La figura 2.6 muestra la estructura geométrica del complejo boro-azometino “f”, el átomo central es el B (verde) a pH = 6 en presencia de formas disueltas de boratos, la reacción de condensación se completa rápidamente (en 15 minutos) y se forma un complejo amarillo. Después de la formación del complejo, la solución se ajusta a un pH ácido para una medición óptima del color a $\lambda = 415$ nm. El boro se encuentra coordinado por el N (color azul) y OH (color rojo). Los átomos de color amarillo corresponden al S y el gris al Na.

2.1.5.2 Interferencias

Según (Plank, 1992) las posibles interferencias por: 1) NH_4 se superó mediante el uso de NH_4OAc ; 2) K fue superado mediante el uso de KOAc ; y 3) Al, Cu y Fe se superaron mediante el uso de EDTA y NTA. Se subrayó la importancia de la calidad del agua para los reactivos, etc. Se indicó que el tratamiento del agua desionizada con carbón vegetal eliminaría las sustancias orgánicas que pueden interferir con el desarrollo del color.

2.2 ANTECEDENTES.

En 2008, en Mustafa Kemal University, Facultad de Ciencias y Letras, Departamento de Química, Turquía, Antakya capital de la provincia de Hatay. Sana Sungur y Ramazan Okur, publican; “*Using azomethine-H method determination of boron contents of various foods consumed in Hatay Region in Turkey*”. Recolectaron muestras de suelo y plantas (32 especies de vegetales y 17 de frutas) y determinaron boro usando el método de azometina-H. El rango de boro en suelo fue 32,43 – 93,43 ppm y, la mayoría de los alimentos tenían concentraciones de 1,48 – 3,60 ppm.

En 1999, el equipo de trabajo de; Li Zaijun, Zhenzhong, Tang Jan de la Wuxi University of Light Industry, Wuxi y Ching-Gin Hsu, Pan Jiaomai de la East China Normal University, Shanghái, publican; “*4-Methoxy-azomethine-H as a reagent for the spectrophotometric determination of boron in plants and soils*”. Determinan por sextuplicado boro en arroz, grama verde, café y suelo, concluyendo que el método de azometina no necesita de un control riguroso y además es confiable y exacto.

En Nicaragua no se encontró registro de estudios concretos que aborden en su totalidad la estimación de boro total en tejido vegetal y, por ende, en limón Tahití (*Citrus x latifolia*) en los laboratorios, centros de investigación o industrias

2.3 HIPÓTESIS

El método colorimétrico de azometina-H es aplicable para la cuantificación de boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*), empleando previa eliminación del alto contenido de materia orgánica de calcinación seca y posterior disolución de las cenizas con ácido clorhídrico.



CAPÍTULO III

3.1 DISEÑO METODOLÓGICO

3.1.1 Descripción del ámbito de estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Suelo y Agua (LABSA-UNA) es una unidad de apoyo a la docencia e investigación y presta servicios al sector agrícola, forestal y ambiental del país en pro al desarrollo sostenible del agropecuario que pertenece a la Universidad Nacional Agraria, en el periodo comprendido julio-diciembre 2019.



Figura 3. 1. Ubicación LABSA UNA

3.1.2 Tipo de estudio

Según Piura López (2008) se considera que el método de investigación del presente estudio es experimental según el nivel inicial de profundidad del conocimiento es descriptivo obteniendo la concentración de boro en las hojas de limón Tahití.

Conforme a la clasificación de Hernández, Fernández y Baptista 2014, el tipo de estudio es correlacional entre las variables de concentración en las hojas del limón Tahití y la absorbancia. Dado, al tiempo de ocurrencia de los hechos y registro de la información el estudio es prospectivo obteniendo información de la población, la cual corresponde a todos los cítricos presentes en la finca y tomando de muestra las hojas del limón Tahití.

Por el período y secuencia del estudio se realizará en el tiempo determinado de julio a diciembre del 2019, por lo tanto, según el alcance del tiempo es transversal y según el análisis y alcance de los resultados el estudio es analítico y predictivo

3.1.3 Población y Muestra

3.1.3.1 Población

Se considera como población: Todos los árboles cítricos que se encuentran en la finca Alemán Martínez (*Citrus X sinensis*, *Citrus reticulada* Blanco y *Citrus latifolia*) área de estudio donde se puede investigar la presencia de boro total en la hoja, encontrándose a 486 m sobre el nivel del mar.

3.1.3.2 Muestra

La muestra correspondiente al árbol Tahití empleando un tipo de muestreo a conveniencia seleccionando cuatro arboles (anexo 1) de la finca Alemán Martínez de cada uno de esto, realizando un muestreo a conveniencia las muestras de hojas de limón Tahití (*citrus x latifolia*).

3.1.3.2.1 Criterios de inclusión.

- ✓ Morfología ideal (color verde intenso, sin defectos ni picaduras de animales)
- ✓ Remover el excedente de polvo sobre la superficie de la hoja.
- ✓ Hojas con la debida madurez partiendo del color, y realizando una práctica con yema de los dedos (anexo 13).

Boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) en finca Alemán Martínez por el método azometina-H empleando espectroscopia UV/VIS, LABSA-UNA, julio-diciembre 2019

- ✓ Sin ser expuestas a pesticidas

3.1.3.2 Criterios de exclusión

- ✓ Morfología no ideal (hojas pálidas, hojas con plagas o picaduras de insectos)
- ✓ Hojas jóvenes

3.2 Variables y Operacionalización

3.2.1 Variables Independientes

- Concentración de boro total
- Incertidumbre de la concentración de boro total

3.2.2 Variables Dependientes

- Absorbancia

3.2.3 Operacionalización de las variables

Tabla 3. 1. Operacionalización de las variables

<i>Variables</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Indicadores</i>	<i>Valores</i>	<i>Unidad de medida</i>
Independientes				
<i>Concentración de boro total</i>	<i>Ecuación de la recta de calibración permitirá determinar la concentración de boro en la solución ácida de los minerales totales de las hojas citrus x latifolia.</i>	<i>Ecuación de la regresión de la recta de calibrado no ponderada obtenida por MCO</i>	<i>0-200</i>	<i>mg/kg</i>
<i>Incertidumbre de la concentración de boro total</i>	<i>La incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de la concentración de boro determinada en todas las muestras de hojas de citrus x latifolia puede ser estimada tomando en cuenta: volumen de alforo,</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Incertidumbre estándar</i> • <i>Incertidumbre combinada</i> 	<i>No hay un valor de referencia disponible</i>	<i>mg/kg</i>

	<i>masa de la muestra, respetabilidad de la determinación y estadístico sx_0.</i>	<i>• Incertidumbre expandida</i>		
Dependiente				
<i>Absorbancia</i>	<i>El método colorimétrico de la azometina-H obedece la ley de Lambert y Beer por lo que puede prepararse una curva de calibración con estándares externos de concentraciones conocidas obteniendo las absorbancias correspondientes de cada una de éstas, así como de las muestras de las hojas de citrus x latifolia preparadas simultáneamente</i>	<i>Agilent 8452 UV-visible spectrophotometer</i>	<i>0-1.54</i>	<i>u.a</i>

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Materiales para recolectar información

La información para la cuantificación de Boro total en las hojas de *Citrus x latifolia* se recolecta utilizando:

- ✓ Fichas de artículos científicos
- ✓ Fichas de resumen
- ✓ Diseño matriz de síntesis
- ✓ Métodos estándar
- ✓ Publicaciones en sitios web
- ✓ Revistas virtuales

3.3.2 Fuentes de información

Fuentes primarias

- Libros
- Documentos

Fuentes secundarias

- Artículos científicos
- Publicaciones en sitios web

3.3.3 Materiales para procesar la información

Los materiales o recursos para procesar la información son los programas: Microsoft Office Excel, Microsoft Office Word, Minitab 18, obteniendo datos y pruebas estadísticas descriptivas, contrastes de significación, que arrojan resultados en forma de gráficos, tablas y diagramas donde se procesa toda la información requerida de manera sencilla y sistematizada, Chem sketch/Draw Software estructuras químicas.

3.3.3.1 Materiales

Tabla 3. 2. Equipos

Nombre del equipo	Modelo	Compañía
Balanza analítica	Kern ABJ-NM/ABS-N	kern
Espectrofotómetro Ultravioleta/Visible	8452a	Agilent Technologies
Mufla	LM 212.11	VEB Elektro
Agitador magnético	PC-353	Corning
Campana	*	*
Agitador	PC-353	Corning
Horno de mufla	Wsu100	mLw

Fuente: Adriana Aguilar, Caroline Del Castillo

Tabla 3. 3. Materiales

Nombre del material	Marca	Capacidad/tamaño	clase
Beakers	Pyrex	50 mL	A
Beakers	Pyrex	200 mL	A
Embudos de filtración			
Matraces volumétricos	Pyrex	50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL	B, A
Buretas	Pirex	25, 50 mL	A
Celdas para espectroscopias Ultravioleta/Visible			
Papel filtro	Whatman	185 mm	
Papel toalla		s	
Guantes			
Soporte universal			
Cápsulas de porcelana			

Fuente: Adriana Aguilar, Caroline Del Castillo

Tabla 3. 4. Reactivos

Nombre del reactivo	Formula química	Grado	Marca
Acetato de amonio	$C_2H_7NO_2$	ACS	Fisher chemical
Sal disódica EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	ACS	Fisher Scientific
Ácido acético glacial	$C_2H_4O_2$	ACS Certificado	Fisher chemical
Azometina-H	$C_{17}H_{12}NNaO_8S_2 \cdot xH_2O$	*	Alfa Aesar
Ácido ascórbico	$C_6H_8O_6$	BioReagent	Fisher
Ácido bórico	H_3BO_3	ACS C	Fisher Chemical
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	ACS certificado	Fisher chemical
Dicromato de potasio	$K_2Cr_2O_7$	ACS,ISO	EMSURE
Sulfato de cobre pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	ACS,ISO	EMSURE
Agua	H_2O	HPLC	J.T.Baker
Ácido clorhídrico	HCl	ACS certificado	Fisher Scientific

Fuente: Adriana Aguilar, Caroline Del Castillo

3.3.4 Método (Fase experimental)

El método analítico implementado para el alcance del objetivo general del presente estudio es cuantitativo basado en el desarrollo de color tanto de los estándares externos a partir de las cuales se prepara la recta de calibración para la

posterior cuantificación, así como en la matriz de la muestra una vez que esta ha sido liberada de las interferencias por el pretratamiento adecuado y sometida a los procesos de digestión convenientes que permitieron la determinación de la concentración de boro total recobrada en las muestras de las hojas de citrus x latifolia.

Para la realización de la fase experimental se utilizó como método de referencia el Método de la A.O.A.C 982.01 Boro en fertilizante, de los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC versión 17, 2002), cabe mencionar que de esta misma se usaron los métodos oficiales para determinar el: porcentaje de humedad (AOAC 936.04) y cenizas totales en la hoja (AOAC 930.05), de igual manera se tomaron las directrices para preparación de muestra.

Según la Norma ISO/IEC 17025:2017, en el ítem “6. Equipo”

6.4.5 El laboratorio debe identificar el equipo utilizado para las mediciones y capaz de lograr la precisión requerida y cumplir con las especificaciones pertinentes para las actividades concernientes. Debe establecer un programa de calibración documentado para dicho equipo, para asegurar la trazabilidad metrológica de los resultados de medición.

NOTA: Los tipos de equipos que tienen un efecto sobre la exactitud de la medición pueden incluir:

- ✓ Los utilizados para la medición directa del mensurando, por ejemplo, el uso de un balance para realizar una medición de masa;
- ✓ Aquellos utilizados para hacer correcciones al valor medido, por ejemplo, mediciones de temperatura;
- ✓ Los utilizados para obtener un resultado de medición calculado a partir de múltiples mediciones.

3.3.4.1 Muestreo

a. Se obtuvieron las muestras de las hojas de los árboles de limón Tahití en la finca Alemán Martínez conforme a los criterios de inclusión y muestreo por conveniencia.

- b. Se toma la hoja de la planta para muestrear, dado que es el órgano en donde se realiza la mayor actividad de la planta, generalmente constituye el mejor tejido para reflejar el estado nutricional de planta.
- c. Se toma la muestra según criterios de inclusión en hojas completamente maduras cercanas al fruto.
- d. El muestreo se realiza antes de la recolección del fruto-temporada de cosecha.
- e. Colocar la muestra en bolsas de papel kraft para su movilización.

3.3.4.2 Preparación de la muestra

a. Descontaminación

- Las muestras frescas se lavan con agua destiladas, posterior se deja en reposo con HCl por 24 h.
- Después de la descontaminación, las muestras se secan para estabilizar el tejido y detener las reacciones enzimáticas.

b. Secado

- Introducir las muestras en bolsas de papel
- Colocar las bolsas en una estufa con aire forzado a 70 °C por 12 a 24 h.

c. Molienda

- Una vez seca la muestra se tritura hasta obtener el tamaño pequeño de las partículas.
- Después de la trituración, a partir de la muestra se obtiene una porción de 5 g para los análisis.

d. Almacenaje

- Colocar la porción de muestra significativa, seca, molida y homogénea, en una bolsa de plástico hermético.

3.3.4.3 Determinación del porcentaje de humedad

- a. Una vez secas las cápsulas de porcelana, se marca la base exterior utilizando un marcador persistente colocando una clave que identifique a cada muestra y los blancos.
- b. Se colocan las muestras con ayuda de una pinza metálica dentro de la estufa de convección a una temperatura de $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante una hora, tomando el tiempo desde el momento en el que se alcanzó esta temperatura, cumplida la hora, sacar las cápsulas y colocarlas dentro del desecador hasta alcanzar la temperatura del laboratorio (30 – 45 minutos).
- c. Pesar cada cápsula de porcelana y anotar la primera pesada.
- d. Repita los pasos b y c pero esta vez durante media hora desde que se alcance nuevamente la temperatura de $70 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la segunda pesada.
- e. Repita el paso d para la tercera pesada. Calcular el promedio de la masa de cada cápsula (Tabla 4.1) la diferencia entre las pesadas de cada capsula no deberán ser mayor de 0,1% en valor absoluto para asegurar peso constante.
- f. Se realizan los calculos respectivos del porcentaje de humedad mediante la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \times 100 \quad (3.1)$$

3.3.4.4 Determinación de cenizas totales.

- a. Pese 1 g de muestra en un crisol de porcelana incluir dos blancos.
- b. Colocar en un horno de temperatura controlada y lentamente subir la temperatura a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ en dos horas calcinar por 4-8 h.
- c. Dejar enfriar la mufla a temperatura ambiente, lentamente abrir la puerta, sacar los crisoles evitando disturbar la ceniza pesar y determinar el % en ceniza.

- d. Entreabrir la tapa y agregar cuidadosamente 1-2 mL de agua para humedecer las cenizas.
- e. Agregar 10 mL de ácido clorhídrico 2 M y calentar en un plato calefactor hasta ebullición. Enfriar
- f. Filtrar el contenido del crisol a través de papel filtro whatman, recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 100 mL.
- g. Realizar los cálculos del % de cenizas totales según la siguiente ecuación:

$$\%Ceniza = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.4.5 Preparación de soluciones

a. Solución Buffer.

Se pesaron 25 g de acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$), 1,5 de sal disódica de EDTA, se agregaron 40 mL de agua grado HPLC y se añadieron 12,5 mL de ácido acético glacial concentrado.

b. Solución Azometina –H.

Se pesó 0,45g de Azometina-H en 100 mL de ácido ascórbico al 1%. (1 g y aforar con agua HPLC).

c. Solución estándar de 100 ppm de B

Pesar 0,5720 g de ácido bórico. Transferir a un balón volumétrico de 1 L y aforar con agua HPLC. Guardar en frasco polietileno.

d. Solución estándar de 5ppm de B

Se diluyó 25 mL de la solución a en un matraz volumétrico de 500 mL y se aforo con agua grado HPLC. Guardar en frasco polietileno.

3.3.4.6 Preparación de la curva de calibración a partir de estándares externos de concentración conocida de boro.

a. Preparar 6 estándares, en el que se midan alícuotas de la solución estándar de trabajo de B 10 ppm según la tabla 3.5 y se transferir a matraces volumétricos clase B de 100 mL.

Tabla 3. 5. Volúmenes de alícuotas a medir para la preparación de la curva de calibrado.

Concentración de B (ppm)	Alícuotas a tomar de la solución estándar de trabajo a 100 ppm (mL)
0,00	0,0
0,25	2,5
0,50	5
0,75	7,5
1,00	10
1,25	12,5

b. En matraces volumétrico de 100 mL. Aforar con agua destilada de modos que los estándares y las muestra tenga soluciones idéntica.

c. Se procede a leer la absorbancia del estándar cero y de cada estándar de concentración conocida de B a una longitud de onda de 410 nm, la primera lectura después de 40 min después de la formación del complejo.

3.3.4.7 Determinación de Boro por el método Azometina-H de las cenizas de las muestras de análisis, muestra control, estándares y blancos de análisis.

De la solución ácida digeridas de las cenizas obtenidas de las muestras de análisis, muestra control, estándares y blancos se toman las siguientes alícuotas:

a. Tomar del filtrado y los estándares alícuotas de 4 mL.

b. Se agregan 4 mL de solución buffer.

- c. Agregar una alícuota de 4 mL de Azometina –H mezclar bien. Dejar desarrollar el color por 1 hora.
- d. Se enciende previamente el espectrofotómetro mientras alcanza sus parámetros óptimos.
- e. Se ajusta la línea base del usuario por medio de la lectura del solvente que se utiliza en todo el análisis.
- f. Luego se realizan las lecturas de los blancos de análisis, muestra control y muestra de análisis en el espectrofotómetro Ultravioleta/Visible a 416 nm.
- g. Se calcula la concentración de B en mg/kg (ppm) de la solución ácida digeridas de las cenizas utilizando los datos de calibrado, utilizando la siguiente ecuación:

$$A_c = b \times [B \text{ mg/L}] + a \quad (3.3)$$

$$B \text{ mg/kg} = \frac{\text{mg} * \text{mL}}{\text{L} * \text{g}} \times \frac{1\text{g}}{0,001 \text{ kg}} \times \frac{1\text{L}}{1000 \text{ mL}} = \frac{\text{mg}}{\text{kg}}$$

Donde:

- A_c = absorbancia corregida de las muestras, $A_c = A_1 - A_0$
- A_0 = absorbancia del blanco
- A_1 = absorbancias de las muestras controles y muestras de análisis
- $[B]$ = concentración de B (mg/kg).
- a = ordenada de la región
- b = pendiente de la recta
- Fd = factor de dilución

$$[B \text{ mg/kg}] = \frac{(A_c - a)}{b} \times fd \quad (3.4)$$



CAPÍTULO IV

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Determinación de humedad en las muestras de la hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*)

En la tabla 4.1 reúnen los resultados del apartado 3.3.4.3 que corresponde al ensayo de determinación de humedad correspondiente a la sección 3.3 abordado en el diseño metodológico.

Tabla 4. 1. Determinación de humedad de la muestra de hojas de citrus x latifolia

Etiqueta del crisol	m_0 (g)	m- muestra (g)	m_1 (g)	m_2 (g)	%H	%H- corregida
B	14,5771		14,5771	14,5772	0,93	0,66
B	16,5727		16,5727	16,57278	0,40	
A ₁ R ₁	15,0303	5,0000	20,0303	19,4896	12,13	11,46
A ₁ R ₂	15,0303	5,0000	20,0303	19,4499	13,13	12,47
A ₂ R ₁	15,6623	5,0002	20,6625	20,1311	11,89	11,23
A ₂ R ₂	15,7941	5,0003	20,7944	20,1576	14,59	13,93
A ₃ R ₁	14,9816	5,0002	19,9818	19,4235	12,57	11,91
A ₃ R ₂	18,5252	5,0004	23,5256	23,0014	11,71	11,05
A ₉ R ₁	15,0315	5,0001	20,0316	19,4682	12,70	12,04
A ₉ R ₂	16,0324	5,0010	21,0334	20,4265	13,81	13,15
A _p R ₁	14,6429	5,0009	19,6438	19,0755	12,82	12,16
A _p R ₂	14,8789	5,0002	19,8791	19,2656	13,99	13,32

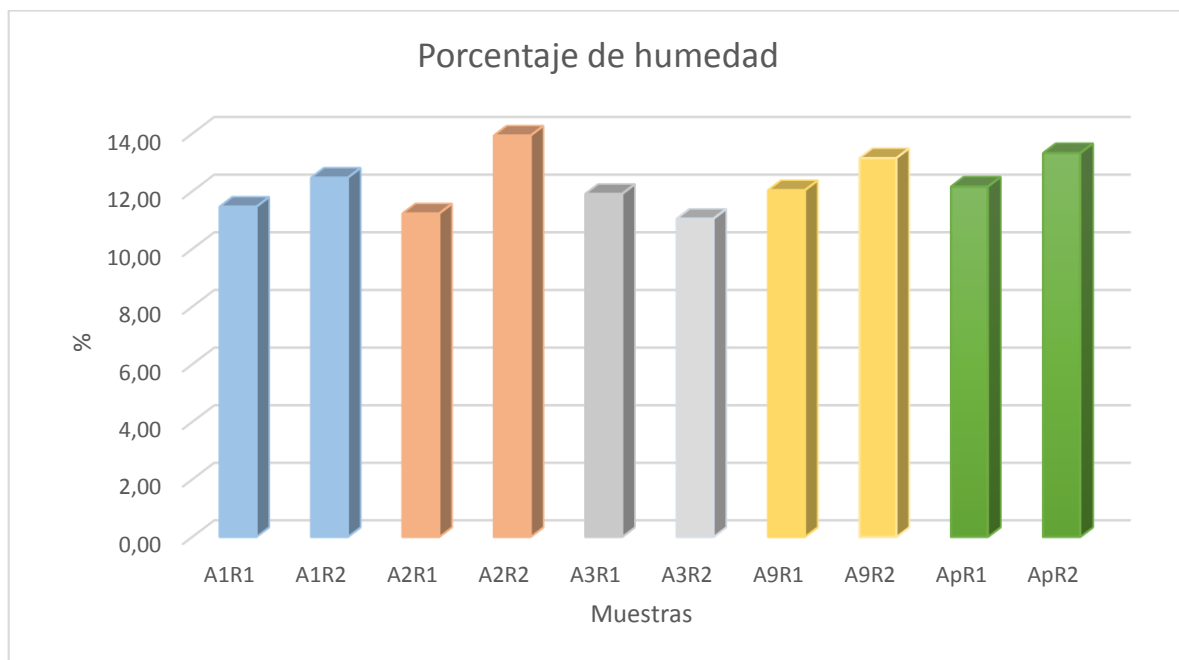
Leyenda

m_0 = masa promedio de la cápsula de porcelana
 m_1 = masa de la cápsula de porcelana más la muestra húmeda
 m_2 = masa de la cápsula de porcelana más la muestra desecada
 %H= porcentaje de humedad

Se realizó la determinación del porcentaje de humedad a las muestras de las hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) por duplicado a partir del método sacado de la AOAC 936.04.

La determinación de humedad es para la eliminación de algunas interferencias presentes como el agua en la hoja de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) ya que podría entorpecer en la determinación de cenizas totales.

Gráfica 4. 1 Porcentaje de humedad en las hojas del limón Tahití (*Citrus x latifolia*)



Fuente: Microsoft, Excel 2013

4.2 Determinación de las Cenizas Totales en las muestras de las hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) y blancos de análisis.

4.2.1 Resultados del analista A

Tabla 4. 2. Determinación de cenizas totales en las muestras analizadas de hojas limón Tahití (*Citrus x latifolia*), analista A

N° de árbol	Etiqueta del crisol	m ₀	m ₁	m ₂	%Ceniza
	B	10,8094	0	10,8093	0,00
	B	10,1090	0	10,1089	0,00
Árbol 1	A ₁ R ₁	9,9784	1,0007	10,0864	11,50
	A ₁ R ₂	9,59	1,0007	9,6943	11,10
	A ₁ R ₃	10,1879	1,0005	10,2783	9,55
Árbol 2	A ₂ R ₁	10,9848	1,0002	11,1168	13,42
	A ₂ R ₂	9,7678	1,0005	9,8979	13,50
	A ₁ R ₃	10,1679	1,0007	10,3028	14,20
Árbol 3	A ₃ R ₁	9,6123	1,0009	9,7392	13,55
	A ₃ R ₂	10,1504	1,0006	10,2728	12,85
	A ₁ R ₃	10,48	1,0002	10,6027	12,48
Árbol 9	A ₉ R ₁	10,6106	1,0002	10,7089	10,04
	A ₉ R ₂	9,8300	1,0003	9,9361	10,90
	A ₁ R ₃	9,9073	1,0003	10,0039	9,96
Árbol _{promedio}	A _p R ₁	10,3654	1,0002	10,4648	10,15
	A _p R ₂	10,4835	1,0002	10,5882	10,68
	A ₁ R ₃	17,3062	1,0001	17,4133	10,88
MCF	F1	15,4469	1,0003	15,8904	44,81
	F2	15,5967	1,0003	16,0432	45,12
	F3	16,3860	1,0004	16,8559	47,65

Leyenda

m₀= masa crisol vacío

m₁= masa muestra seca

m₂= masa crisol vacío y muestra calcinada

%C= porcentaje de cenizas totales

Las determinaciones se hicieron por analista A y B, realizando por triplicados cada muestra de árbol incluyendo las muestras controles.

Al obtener cenizas totales se elimina la materia orgánica presentes en la muestra calcinándola, en las cenizas se encuentra el analito de interés.

El método de calcinación por digestión seca se realizó para la eliminación de la materia orgánica como se indicó anteriormente para evitar la interferencia del análisis al analito de interés; resultados obtenidos por el analista A y conocer la variabilidad en los resultados en las muestras. Se obtuvieron resultados dentro de los rangos de 9% - 13% de ceniza total.

4.2.2 Resultados del analista B

Tabla 4. 3. Determinación de cenizas totales en las muestras analizadas en las hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*), analista B

N° de árbol	Etiqueta del crisol	m ₀	m ₁	m ₂	%Ceniza
	B	10,8090	0	10,8880	0,00
	B	10,1089	0	10,1087	0,00
Árbol 1	A ₁ R ₁	9,9785	1,0003	10,0864	11,09
	A ₁ R ₂	9,5907	1,0000	9,6987	10,80
	A ₁ R ₃	10,1714	1,0000	10,2783	10,69
Árbol 2	A ₂ R ₁	10,9839	1,0007	11,1068	13,06
	A ₂ R ₂	9,7681	1,0007	9,8979	13,66
	A ₁ R ₃	10,2608	1,0008	10,3897	13,71
Árbol 3	A ₃ R ₁	9,6117	1,0003	9,7392	13,04
	A ₃ R ₂	10,1505	1,0000	10,2728	12,23
	A ₁ R ₃	10,4809	1,0002	10,6027	12,39
Árbol 9	A ₉ R ₁	10,6102	1,0000	10,7089	9,87
	A ₉ R ₂	9,8295	1,0007	9,9261	10,35
	A ₁ R ₃	9,9064	0,9324	10,7251	10,05
Árbol _{promedio}	A _p R ₁	10,3657	1,0001	10,4648	10,01
	A _p R ₂	9,9306	1,0002	10,0332	10,46
	A ₁ R ₃	17,3062	1,0004	17,4133	11,40
MCF	F1	10,1208	1,0002	10,5904	47,16
	F2	10,1108	1,0502	10,0932	46,57
	F3	10,8097	1,0015	11,2559	46,24

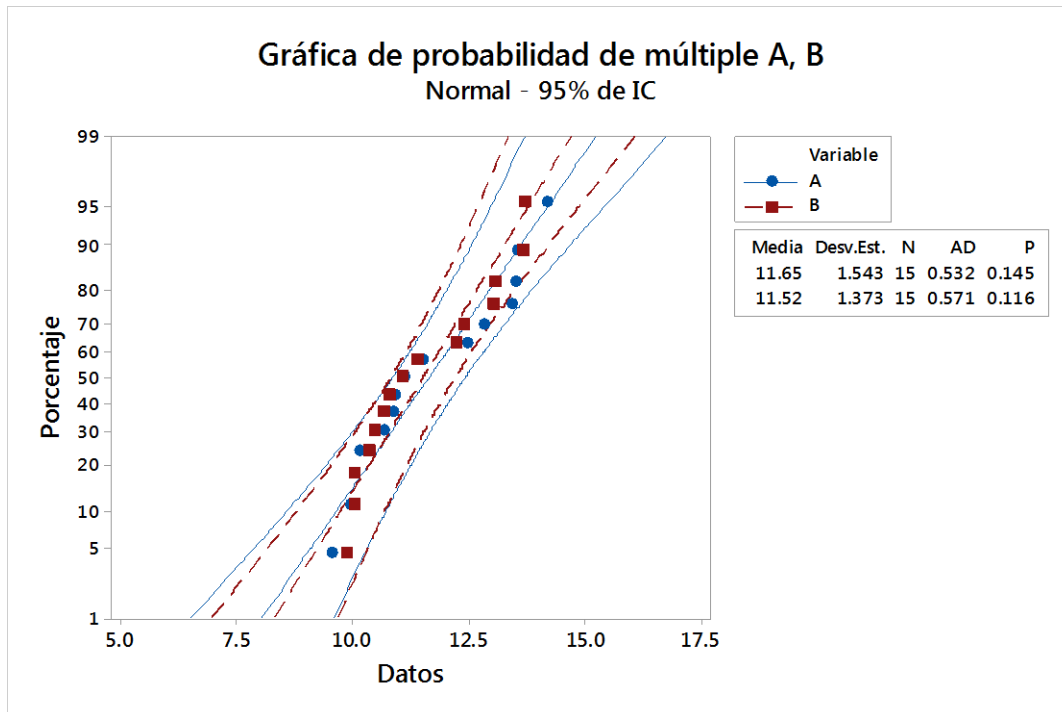
m_0 = masa crisol vacío

m_1 = masa muestra seca

m_2 = masa crisol vacío y muestra calcinada

%C= porcentaje de cenizas totales

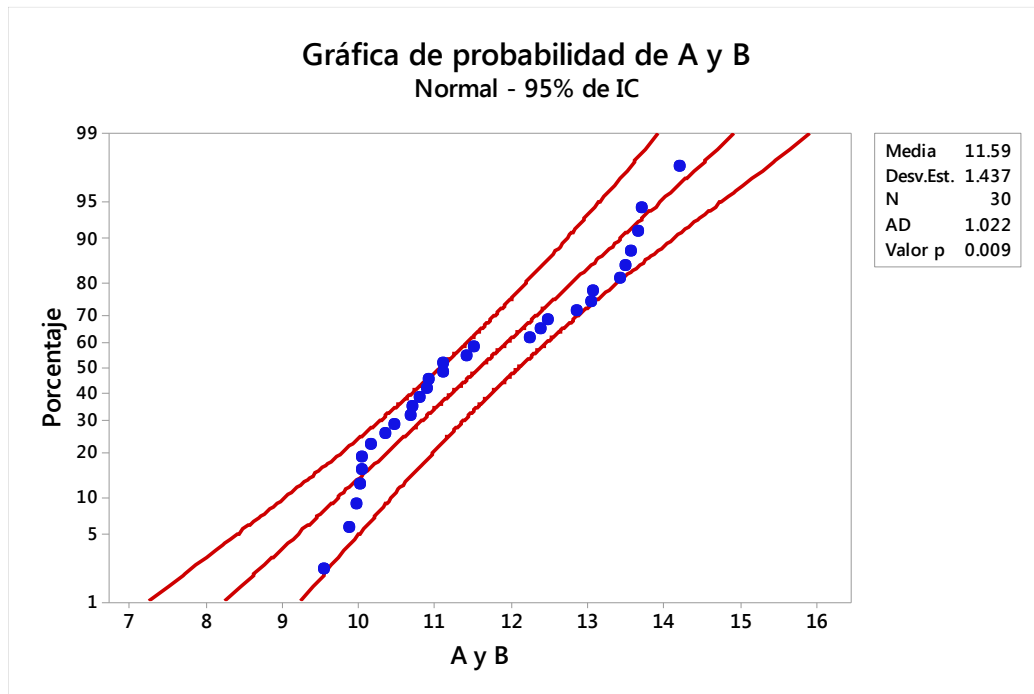
Gráfica 4. 2. Probabilidad normal múltiple de las determinaciones de los analistas A y B.



Fuente: Minitab Statistical Software

La gráfica de 4.2 probabilidad A, B para la determinación de boro total se sitúan cerca de la línea normal ajustada y dentro del intervalo de confianza. Además, el valor p (0,145; 0,116) está por encima del nivel de significancia seleccionado de 0,05, este valor sugiere aceptar la hipótesis nula (H_0) de que los datos siguen una distribución normal.

Gráfica 4. 3. Probabilidad normal de las determinaciones de los analistas A y B.



Fuente: Minitab Statistical Softwar

La gráfica 4.3 de probabilidad A y B para la determinación de boro total se sitúan cerca de la línea normal ajustada y dentro del intervalo de confianza. Además, el valor p (0,009) está por debajo del nivel de significancia seleccionado de 0,05, este valor sugiere rechazar la hipótesis nula (H_0) y aceptar la hipótesis alternativa (H_1) de que los datos no siguen una distribución normal.

4.3 Determinación de boro total por el método Azometina-H en la solución ácida digerida de las cenizas en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*), muestra control y blancos de análisis.

La cuantificación de boro total en las muestras de interés parte de la obtención de las cenizas totales que contienen dichas muestras; posteriormente comprende la disolución de las mismas con ácido clorhídrico (sección 3.3.4.7 del Apartado del Diseño Metodológico) y finalmente incluye la aplicación de método colorimétrico de la azometina-H a una alícuota proveniente del matraz volumétrico

que contiene el filtrado de la solución ácida digerida de las cenizas de las muestras para su cuantificación fotométrica en el Espectrofotómetro Agilent 8452 UV-VIS (sección 3.3.4.7 del Apartado del Diseño Metodológico, Anexo 6 figura 6.3, pág. 14).

Se utilizó como muestra control en la determinación de boro total un envase del Lote 302927C19Y (03/19-03/21) de fertilizante “Pelicano Desarrollo 18-6-18+ 2% MgO + 6% S +EM*” formulado por Químicos y Lubricantes S.A km 36,5 Autopista a Palín-Guatemala, C.A. Distribuido en Nicaragua por la compañía SAGSA-DISAGRO S.A paso a desnivel portezuelo, 300 metros al Norte, Managua, Nicaragua. La tabla de información nutricional en el empaque del envase seleccionado declara un valor porcentual de 0,014 p/p.

Esta muestra control fue incluida por triplicado en el lote de las muestras correspondientes a cada analista con el fin de apreciar el recobro en la secuencia metodológica del diseño experimental que se aplicó. Los valores experimentales para las muestras control fueron resaltados en verde en la Tabla 4.4 y 4.5 y al contrastarlos con el valor nominal declarado por Químicos y Lubricantes S.A se pueden considerar como determinaciones aceptables.

De las 15 determinaciones de cenizas totales posteriormente se realizaron las respectivas estimaciones de boro total en las muestras de las hojas de limón Tahití, por lo tanto, también se tienen un número de 15 análisis y, reuniendo los resultados del analista A y B se obtiene un total neto de 30. Los resultados de las determinaciones de boro total estiman una media aritmética 32,28 mg/kg para el analista A y 45,75 para el B respectivamente. Sin embargo, el resultado final promedio de la determinación de boro total es de 39,01 mg/kg, este valor es estimado a partir de las 30 determinaciones.

Una distribución normal es simétrica y tiene forma de campana con un solo pico en la media. La distribución normal es un concepto teórico. En realidad, casi no existen datos que sean realmente normales. Sin embargo, muchas variables están distribuidas de forma casi normal, por lo que la distribución normal es la base que sustenta muchas pruebas estadísticas. (Minitab 18)

Una gráfica de probabilidad normal determina en qué grado la distribución normal ajusta un dado número de observaciones. Al comparar la línea normal ajustada con los datos reales se puede determinar en qué grado se ajustan a la distribución normal. Si la distribución normal ajusta los datos, puede ser utilizada para estimar percentiles para la población y se deben observar las siguientes características:

- ✓ Los puntos graficados formando aproximadamente una línea recta cercana a la línea normal ajustada.
- ✓ Un estadístico de Anderson-Darling (AD) bajo y un valor P mayor que el nivel de significancia elegido. Comúnmente los niveles elegidos son 0,05 y 0,10. Se utiliza el estadístico de (AD) y el valor P de para conjuntos de datos pequeños (Minitab StatGuide, 2018).

4.3.1 Resultados del analista A

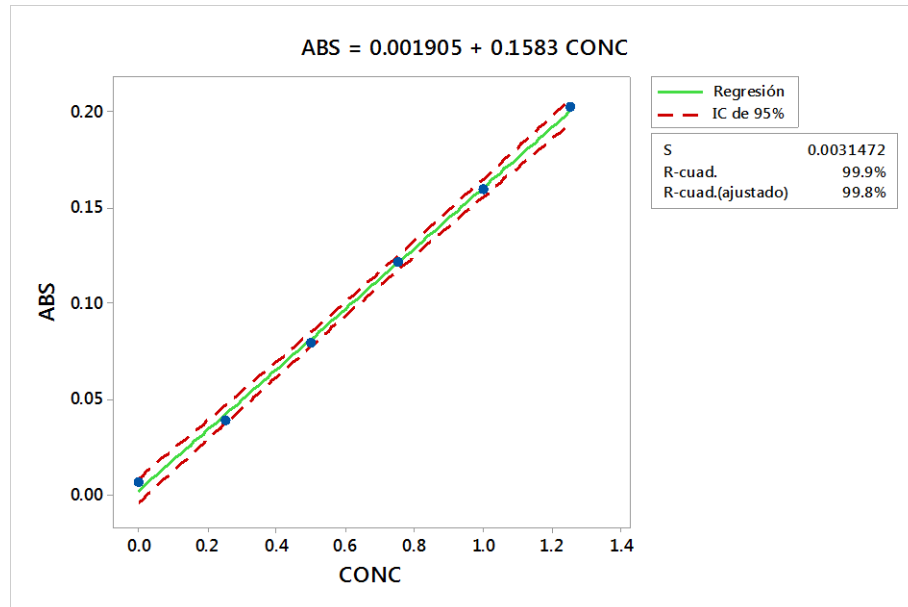
4.3.1.1 Curva de Calibración a partir de Estándares Externos de concentración conocida de Boro

Utilizando la Tabla 7.1 del anexo 7 (página 15) y el algoritmo por mínimos cuadrados de Minitab® 18. Se trazó la curva de calibración de mejor ajuste relacionando absorbancias en función de las concentraciones de boro de los estándares (Gráfico 4.4).

La tabla 7.2 del Anexo 7 (pág. 15) muestra la hoja de cálculo optimizada en Microsoft Excel 2020 donde se sintetizan los estadísticos asociados en la regresión de la curva de calibración (Gráfico 4.4)

Gráfica 4. *4. Recta de calibrado no ponderada con sus respectivos límites de confianza (nivel de confianza del 95%) en cada punto de concentración 0,0 – 1,25 ppm de B para el*

analista A.



Fuente: Minitab Statistical Softwar

4.3.2 Concentración de boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*), muestra control y blancos de análisis.

La Tabla 4.4 compila los resultados correspondientes a las secciones 3.4.2.6 de la fase experimental página 49.

Tabla 4. 4. Determinación de boro total en las muestras analizadas del árbol *Citrus latifolia*, analista A

A= absorbancia

Ac= absorbancia corregida

N° de árbol	Etiqueta del matraz	Absorbancia		m (g)	V (mL)	[B mg/L]	[B mg/kg]
		A	Ac				
	B	0,002	0,018				
	B	0,034					
Árbol 1	A ₁ R ₁	0,075	0,057	1,0007	100	0,35	35,00
	A ₁ R ₂	0,064	0,046	1,0007	100	0,28	27,68
	A ₁ R ₃	0,064	0,046	1,0005	100	0,28	27,75
Árbol 2	A ₂ R ₁	0,083	0,066	1,0002	100	0,40	40,20
	A ₂ R ₂	0,068	0,050	1,0005	100	0,30	30,40
	A ₂ R ₃	0,066	0,048	1,0007	100	0,29	29,32
Árbol 3	A ₃ R ₁	0,053	0,035	1,0009	100	0,21	20,67
	A ₃ R ₂	0,081	0,064	1,0006	100	0,39	38,92
	A ₃ R ₃	0,096	0,078	1,0002	100	0,48	47,97
Árbol 9	A ₉ R ₁	0,069	0,051	1,0002	100	0,31	31,17
	A ₉ R ₂	0,062	0,044	1,0003	100	0,27	26,55
	A ₉ R ₃	0,068	0,050	1,0003	100	0,30	30,47
Árbol promedio	A _p R ₁	0,068	0,050	1,0002	100	0,30	30,16
	A _p R ₂	0,062	0,044	1,0002	100	0,27	26,62
	A _p R ₃	0,068	0,050	1,0001	100	0,41	41,28
						[B mg/L]	B % P/P
MCF	F ₁	0,233	0,215	1,0003	100	1,35	0,013
	F ₂	0,213	0,195	1,0003	100	1,22	0,012
	F ₃	0,223	0,205	1,0004	100	1,28	0,013

B= blanco

A1R1= árbol 1 réplica 1

A2R1= árbol 2 réplica 1

A3R1= árbol 3 réplica 1

A9R1= árbol 9 réplica 1

MCF= muestra control fertilizante

4.3.3 Resultados del analista B

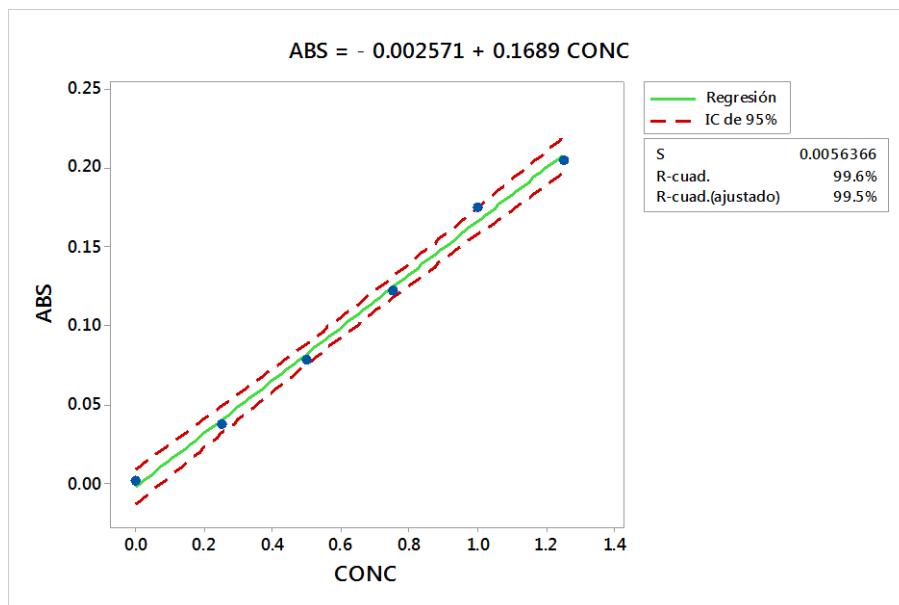
4.3.3.1 Curva de Calibración a partir de Estándares Externos de concentración conocida de Boro

Utilizando la Tabla 8.1 del anexo 8 (página 16) y el algoritmo por mínimos cuadrados de Minitab® 18. Se trazó la curva de calibración de mejor ajuste

relacionando absorbancias en función de las concentraciones de boro de los estándares (Gráfico 4.5).

La tabla 8.2 del Anexo 8 (pág. 16) muestra la hoja de cálculo optimizada en Microsoft Excel 2020 donde se sintetizan los estadísticos asociados en la regresión de la curva de calibración (Gráfico 4.5).

Gráfica 4. 5. Recta de calibrado no ponderada con sus respectivos límites de confianza (nivel de confianza del 95%) en cada punto de concentración 0,0 – 1,25 ppm de B para el analista B.



Fuente: Minitab Statistical Softwar

4.3.4 Concentración de boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*), muestra control y blancos de análisis.

Tabla 4. 5. Determinación de boro total en las muestras analizadas del árbol de limón Tahití analista B

La Tabla 4.5 compila los resultados correspondientes a las secciones 3.3.4.7 de la fase experimental página 37.

A= absorbancia

Ac= absorbancia corregida

N° de árbol	Etiqueta del matraz	Absorbancia		m (g)	V (mL)	[B mg/L]	[B mg/kg]
		A	Ac				
	B	0,0012					
	B	0,0065	0,0039				
Árbol 1	A ₁ R ₁	0,0895	0,0756	1,0003	100	0,46	46,21
	A ₁ R ₂	0,0769	0,0630	1,0000	100	0,39	38,74
	A ₁ R ₃	0,0812	0,0673	1,0000	100	0,41	41,29
Árbol 2	A ₂ R ₁	0,0961	0,0822	1,0007	100	0,50	50,12
	A ₂ R ₂	0,0979	0,0840	1,0007	100	0,51	51,19
	A ₂ R ₃	0,1016	0,0877	1,0008	100	0,53	53,38
Árbol 3	A ₃ R ₁	0,0715	0,0576	1,0003	100	0,36	35,54
	A ₃ R ₂	0,0694	0,0555	1,0000	100	0,34	34,29
	A ₃ R ₃	0,0587	0,0448	1,0002	100	0,28	27,95
Árbol 9	A ₉ R ₁	0,0801	0,0662	1,0000	100	0,41	40,63
	A ₉ R ₂	0,0700	0,0561	1,0007	100	0,35	34,65
	A ₉ R ₃	0,0913	0,0774	0,9324	100	0,47	47,27
Árbol promedio	A _p R ₁	0,0626	0,0487	1,0001	100	0,30	30,26
	A _p R ₂	0,01719	0,0032	1,0002	100	0,03	3,34
	A _p R ₃	0,0534	0,0395	1,0004	100	0,25	24,81
						[B mg/L]	B % P/P
MCF	F ₁	0,198	0,1940	1,0000	100	1,16	0,012
	F ₂	0,191	0,1870	1,0000	100	1,12	0,011
	F ₃	0,201	0,9700	1,0000	100	5,76	0,012

B= blanco

A1R1= árbol 1 replica 1

A2R1= árbol 2 replica 1

A3R1= árbol 3 replica 1

A9R1= árbol 9 replica 1

MCF= muestra control fertilizante

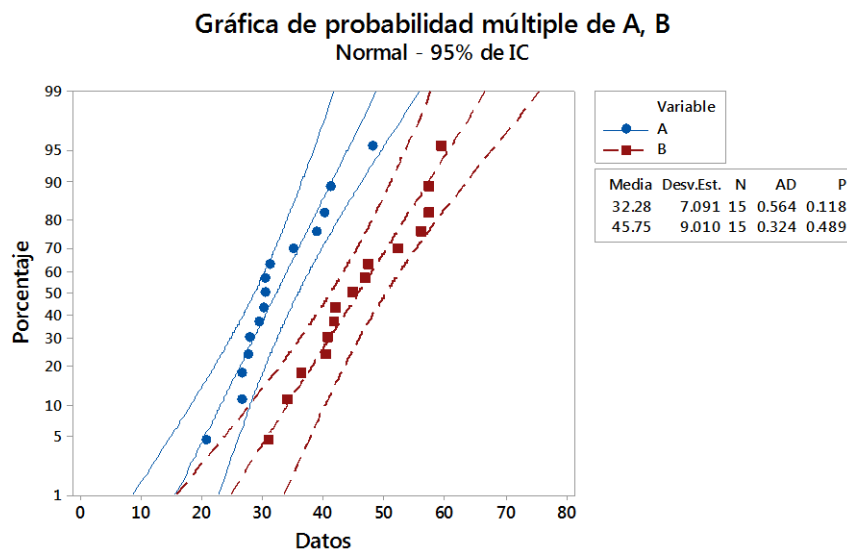
4.4 Cuantificación de boro total en hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*), muestra control y blancos de análisis.

4.4.1 Prueba de distribución normal múltiple de los datos experimentales de las concentraciones de boro total de las muestras de las hojas de limón Tahití

El gráfico 4.6 muestra que los puntos de las concentraciones de boro total se sitúan cerca de la línea normal ajustada y dentro de los intervalos de confianza al 95%. La línea azul corresponde a los datos del analista A, el estadístico de Anderson-Darling (AD=0,564) y el valor P=0,118, mayor que P=0,05, sugieren que los datos de concentración de boro se ajustan adecuadamente a la gráfica de probabilidad normal. Los datos de color rojo corresponden a las determinaciones del analista B, el estadístico de Anderson-Darling (AD=0,324) y el valor P=0,489, mayor que P=0,05, el procedimiento ya fue explicado anteriormente.

Gráfica 4.6 Salida de Minitab® para la Gráfica de probabilidad múltiple de las concentraciones de boro total de las muestras de hojas de limón Tahití analizadas.

Gráfica 4. 6. Probabilidad múltiple de A, B



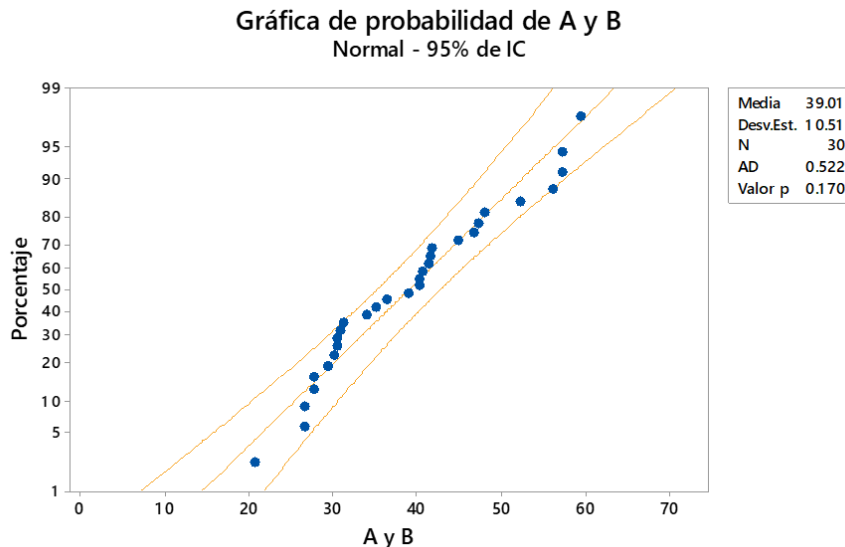
Fuente: Minitab Statistical Software

4.4.2 Prueba de distribución normal de los datos experimentales de las dos determinaciones de boro total de las muestras de las hojas de limón Tahití

El procedimiento ya fue explicado anteriormente. El Gráfico 4.7 muestra claramente que la distribución normal ajusta los datos experimentales de las concentraciones de boro total de las muestras de hojas de limón Tahití. El valor del estadístico de Anderson-Darling ($AD=0,522$) es relativamente pequeño y el valor P estimado, 0,170, es 3.4 veces superior a la probabilidad correspondiente al nivel de confianza seleccionado.

Grafica 4.7 Salida de Minitab® para la Gráfica de probabilidad normal de las concentraciones de boro total de las muestras de hojas de limón Tahití analizadas

Gráfica 4. 7. Distribución normal de los datos experimentales



Fuente: Minitab Statistical Software

Al respecto, cabe recalcar que en principio no se puede contrastar el resultado final promedio obtenido en este estudio con el valor conseguido por Sana Sungur & Razaman Okur, puesto que se desconocen el método de pre tratamiento y, la determinación de boro se realizó en frutas y jugos de frutas, los resultados fueron reportados en mg/1000 g y no especifica la variedad del limón analizado.

En adición a lo anterior, la distribución de los minerales en una planta depende de las condiciones climáticas y edáficas que forman parte del ecosistema de esta. La evaluación de las condiciones climáticas y edáficas bajo las cuales se encontraban los cuatro árboles en estudio.

Con el fin de poder corroborar los resultados obtenidos y saber cuál es el nivel de concentración del boro total. Al verificar los datos conseguidos con los valores reportados por el CENTA (anexo 11, tabla 11.1), el valor final promedio de 43,89 mg/kg se encuentra dentro de los niveles óptimos, se muestra el comportamiento del mensurando. Sin embargo, se encuentra cerca del nivel bajo.

Diagrama 4. 1. Nivel de concentración de boro en el limón Tahití.

	Resultado	Deficiente	Bajo	Óptimo	Alto	Excesivo
B mg/kg	43,89	21	21-30	31-100	101-260	260

Fuente: Microsoft Excel 2013

4.5 Estimación de la incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de las concentraciones de boro total de las muestras analizadas por el método de Kragten según la guía QUAM 2012.

Las incertidumbres estándares estimadas pueden ser reflejadas en un diagrama causa-efecto también conocido como diagrama Ishikawa o espina de pescado.

En el diagrama se muestra el análisis causa-efecto de las variables involucradas en el proceso de la técnica colorimétrica.

Diagrama 4. 2. Causa-efecto, diagrama Ishikawa

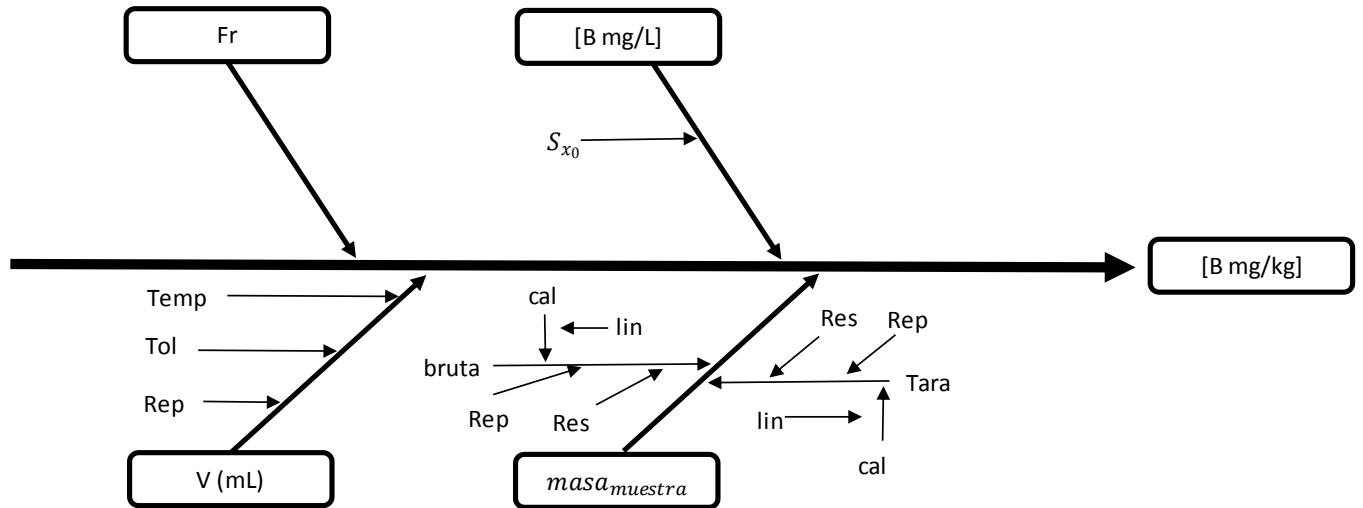


Tabla 4. 6. Hoja de cálculo Microsoft Excel, método de Kragten

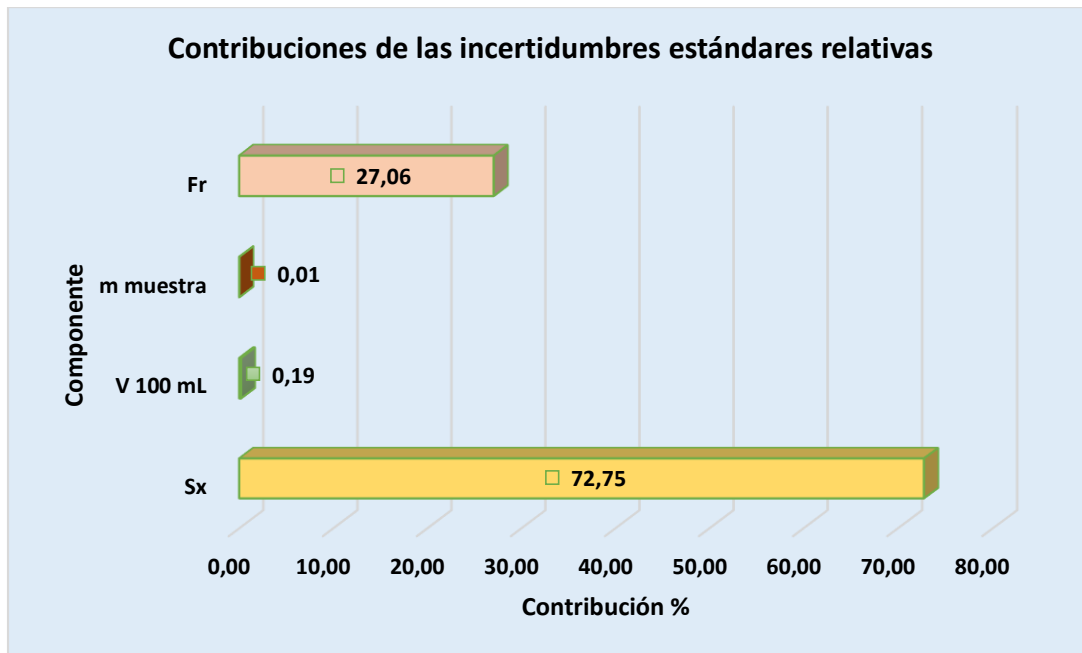
Método de Kragten	Sx	V 100 mL	m muestra	Fr	
Valor	0,44	99,9	0,9981	1,0000	
u(xi)	0,010	0,1210	0,0002	0,0146	
Sx	0,44	0,45	0,44	0,44	
V 100 mL	99,9	99,9	100,0	99,9	
m muestra	0,9981	0,9981	0,9981	0,9983	
Fr	1	1	1	1,0146	
[B]	43,80	44,85	43,85	43,79	44,44
u(y, xi)*		1,05	0,05	-0,01	0,64
u(y)2	1,51	1,10	0,0028	0,0001	0,4097
Contribución %		72,75	0,19	0,01	27,06
Componente		Sx	V 100 mL	m muestra	Fr
uc [B]	1,23				
U[B]	2,46				

Fuente: Microsoft excel 2013

Las contribuciones representadas en la gráfica 4.8 muestran que el mayor aporte de incertidumbre estándar combinada en la cuantificación de boro total en las muestras analizadas lo proporciona S_x de la técnica analítica con 72,75 %, esto se debe a que las muestras de los árboles no son homogéneas, en todo caso si se hubiese calculado esta contribución mediante un solo árbol “n” veces por ejemplo 30, lo más probable es que la desviación estándar sea menor y por consiguiente disminuya el porcentaje de contribución de la repetibilidad.

- La masa de la muestra contribuye un 0,01 %,
- V de aforo contribuye un 0,19 %,
- F_r contribuye un 27,06 %

Gráfica 4. 8. Contribuciones de las incertidumbres estándares relativas en el cálculo de la incertidumbre expandida para la determinación de Boro total.



Fuente: Microsoft Excel 2013



CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que la determinación de boro total en las hojas de limón Tahití. Por espectrofotometría ultravioleta/visible realizada en el presente estudio ha alcanzado los objetivos propuestos y en base al análisis de los resultados obtenidos se pueden formular las siguientes conclusiones:

1. El contenido de humedad promedio de las muestras de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) fue de 12,27% lo que implica que el restante pertenece al residuo seco.
2. El alto contenido de materia orgánica con 11,25 % presente en las hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) hace tediosa la determinación de las cenizas totales empleando el método de pre-tratamiento por combustión seca. No obstante, basándonos en los resultados obtenidos para ambos analistas se puede concluir que el método es preciso.
3. El método colorimétrico de la azometina-H es apropiado para la cuantificación de boro total en las hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*) por espectroscopía UV/Vis, pues una vez eliminado el contenido de materia orgánica, se cuantificó 43,89 mg/kg de boro, ubicándose en el nivel óptimo para la planta. Por lo que queda confirmada la hipótesis planteada.
4. La incertidumbre expandida asociada al resultado final promedio de las concentraciones de boro total en las hojas de citrus x latifolia es una buena estimación el valor de la verdadero se encuentra 41.43 mg/kg – 46.35 mg/kg.

5.2 RECOMENDACIONES

De acuerdo con las conclusiones obtenidas en esta investigación se proponen las siguientes recomendaciones:

1. Se recomienda el método colorimétrico para la determinación de boro total en las hojas de las plantas obteniendo los niveles de concentración en las que se encuentra.
2. Para la aplicación del método es conveniente trabajar con espectrofotómetro UV/VIS que cuente un certificado de calibración, por un laboratorio de calibración acreditado bajo la norma ISO 17025:2017.
3. Realizar un análisis más detallado de las fuentes de incertidumbres en la técnica colorimétrica.
4. Que las cubetas de muestra estén limpias y libres de marcas y huellas digitales. Esto debe hacerse cada uso.

5.3 BIBLIOGRAFÍA

- (s.f.). 2003, 11-13. Alemania: Agilent Technologies Deutschland GmbH. Recuperado el 17 de Octubre de 2019
- AQUISE, E. G. (2016). *evaluación físico química de los parametros para metales pesados boro (b) y manganeso (mn) del. arequipa.*
- CERVANTES, J. I. (1973). *Repositorio* . Obtenido de Universidad de guadalajara: http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1767/Chavez_Cervantes_J_Isabel.pdf?sequence=1
- Christian, G. D. (2009). *Química Analítica*. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S. A. DE C. V.
- D.Christian, G. (s.f.). *Quimica Analítica*. Recuperado el 17 de Octubre de 2019
- García, G. N. (2003). Boro en planta y suelo. En G. N. Simón Navarro Blaya, *Quimica Agrícola* (pág. 23). Madrid: aedos.s.a .
- Garcia, J. M. (2015). *Universita Miguel Hernandez*. Obtenido de Universita Miguel Hernandez: <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/2624/1/TD%20Sim%C3%B3n%20Grao%2C%20Silvia.pdf>
- Harris, D. C. (s.f.). *Quantitative Chemical Analysis* (Vol. Octava Edición). California: W. H. Freeman and Company. Recuperado el 17 de Octubre de 2019
- Harvey, D. (2009). *Analytical Chemistry 2.0*. McGraw-Hill Companies. Recuperado el 17 de Octubre de 2019
- Hernández, S., Fernández, C., & Baptista, L. (2006). *Metodología de la Investigación*. McGraw-Hill Interamericana.

J.W.H., S., Elferink, O., Driehuis, F., Gottschal, J. C., & Spoelstra, S. F. (s.f.). *Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/X8486S/x8486s04.htm>

Kennedy, S. (20 de Noviembre de 2017). *eHow en español*. Recuperado el 20 de Octubre de 2019, de Partes del limonero: https://www.ehowenespanol.com/partes-del-limonero-lista_384291/

Kochkodan, V., Hilal, N., & Darwish, N. B. (junio de 2015). The chemistry of boron in water .

Mohammed, Y. I. (Ed.). (Abril de 2014). Analytical Determination of Boron in Irrigation Water Using. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 7(1), 5. Recuperado el 31 de Marzo de 2020

Piura López, J. (2008). *Metodología de la Investigación Científica*. Managua: Xerox.

Plank, D. C. (1992). *PLANT ANALYSIS REFERENCE PROCEDURES FOR THE SOUTHERN REGION OF THE UNITED STATES*. Obtenido de <http://www.cropsoil.uga.edu/~oplank/sera368.pdf>

Skoogf, D. A., & A., J. H. (s.f.). *principios de analisis instrumental* (Vol. Quinta edición). (C. F. Mdrd, Ed.) España: Harcourt Brace & Company. Recuperado el 17 de Octubre de 2019

Zaijun, L., Zhu, Z. Z., Jan, T., Hsu, C.-G., & Jiaomai, P. (25 de Julio de 1999). 4-methoxy-azomethine-Has a reagent for the spectrophotometricdtermination in plants and soil . *ethoxy-azomethine-Has a reagent for the spectrophotometricdtermination in plants and soil* . shanghai. Recuperado el 16 de Octubre de 2019



ANEXO

Anexo 1. Ubicación de la zona de muestreo

Objetivo del muestreo

Recolectar muestra de los árboles *Citrus latifolia* para el análisis en la cuantificación de boro total.

Razón del muestreo

La muestra se recolecto en la finca para obtener los datos de la concentraciones de boro total en las hojas de limón Tahití (*Citrus x latifolia*).

Punto de muestreo

Masatepe, Finca Alemán Martínez área de muestreo. Alcanzando una temperatura entre los 25° a 31° adecuada para el máximo índice de crecimiento asociado a presentar crecimiento y floraciones frecuentes.

Figura 1. 1. Ubicación vía satélite del lugar de muestreo Finca Alemán Martínez



Fuente: sacado de la aplicación Google Earth.

Número de muestras

Se obtuvieron 4 muestras de las masas que se mezclaron para obtener una muestra representativa del área

Instrucciones para la toma de muestras

Se preparó la ficha de identificación de las muestras a recolectar la cual se presenta en la tabla.

Nombre de la finca: Alemán Martínez		Nombre de los Muestreadores: Adriana Aguilar Caroline Del Castillo		
código	Coordenadas			
A1 (A: árbol)	0594023	1314626	486 m SNM	
A2	0594023	1314626	486 m SNM	
A3	0594027	1314629	485 m SNM	
A9	0594066	13146227	482 m SNM	
A _{promedio}	*	*	*	

Los puntos fueron elegidos cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión, por lo tanto solo 4 árboles cumplieron con los criterios obstando por muestreo a conveniencia.

Figura 1. 2, Árboles que se tomaron de muestra para el análisis.



Fuente: sacado de la aplicación Google Earth.

Anexo 2. Preservación y transporte de la muestra

Las muestras se recolectaron en bolsas de papel kraft, y se transportaron en bolsas de plásticos.

Muestreo



Figura 2. 2. Toma de coordenadas del lugar de muestreo



Figura 2. 1. Selección de la muestras de inclusión del diseño metodológico

Figura 2. 3. Toma de muestra de acuerdo a los criterios de inclusión



Anexo 3. Preparación de la muestra



Figura 3. 1. Lavado de las muestras con HCl



Figura 3. 2. Secado de la muestra luego del lavado.



Figura 3. 3. Secado de la muestra antes del secado en el horno.



Figura 3. 4. Secado de la muestra en el horno a 60°.



Figura 3. 5. Trituración de la muestra en el molino.

Anexo 4. Determinación del porcentaje de humedad

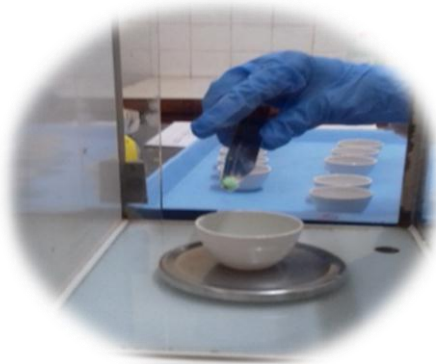


Figura 4. 1. Primer peso de la muestra fresca.



Figura 4. 2. Se colocaron las muestras en el horno para la toma del segundo peso.

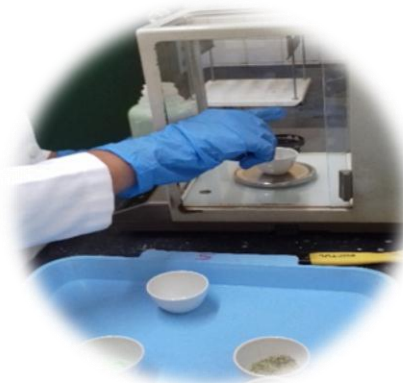


Figura 4. 3. Segundo peso de la muestra seca.

De la ecuación 3.1 del inciso 3.3.4.3 de la determinación de humedad:

$$\%H = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

Árbol A₁R₁

$$\%H = \frac{(20,0303 - 19,4896)}{(20,0303 - 15,0303)} \times 100 = 12,13\%$$

Los resultados obtenidos se presentan en el capítulo IV ítem 4.1 tabla 4.1.

Anexo 5. Determinación de cenizas totales



Figura 5. 1. Se toma 1 g de la muestra seca para proceder a calcinar a 500°C



Figura 5. 2. Muestra calcinada



Figura 5. 3. Peso de las cenizas calcinadas para el cálculo de %CT

De la ecuación 3.2 del inciso 3.3.4.4 de la determinación de cenizas totales para la cuantificación de boro a partir de las cenizas:

Árbol A₁R₂ - analista A

$$\%Ceniza = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \times 100$$

$$\%Ceniza = \frac{9.8979 - 9.7678}{1.0005} \times 100 = 13\%$$

Árbol A₁R₂ - analista B

$$\%Ceniza = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \times 100$$

$$\%Ceniza = \frac{9.8979 - 9.7681}{1.0007} \times 100 = 12\%$$

Anexo 6. Calibración del equipo Ultravioleta/Visible

6.1. Preparación de soluciones

- a. **Solución de H_2SO_4 5×10^{-3} M.** Agregar 0.13 mL de H_2SO_{4conc} aforando en un balón de 500 mL. Para 1 L- 0.26 mL
- b. **Solución 1 de $K_2Cr_2O_7$ al 0.005%.** pesar 0.005 g de $K_2Cr_2O_7$ en un balón de 100 mL diluyendo con la **solución a)** hasta el aforo.
- c. **Solución 2 de $K_2Cr_2O_7$ al 0.01%.** pesar 0.01 g de $K_2Cr_2O_7$ en un balón de 100 mL diluyendo con la **solución a)** hasta el aforo.
- d. **Solución de H_2SO_4 al 1%.** Agregar 10 mL de H_2SO_{4conc} en un balón de 1000 mL aforar.
- e. **Solución de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (patrón primario) al 2%.** Pesar 2 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ diluyendo en un balón de 100 mL aforando con la **solución d).**
- f. **Solución stock de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (patrón primario) al 0.1 M.** pesar 6.242 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ diluyendo en un balón de 250 mL aforando con la **solución d).**
- g. **Set de estándares de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10).** prepare seis estándares de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, midiendo alícuotas de la **solución f)** y afore a 50 mL utilizando la **solución d).**

Tabla 6. 1. Set de estándares de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

Nº	Volumen del stock	Volumen del Blanco	Concentración del Estándar
1	0 mL	50 mL	0,00 M
2	10 mL	40 mL	0,02 M
3	20 mL	30 mL	0,04 M
4	30 mL	20 mL	0,06 M
5	40 mL	10 mL	0,08 M
6	50 mL	0 mL	0,10 M

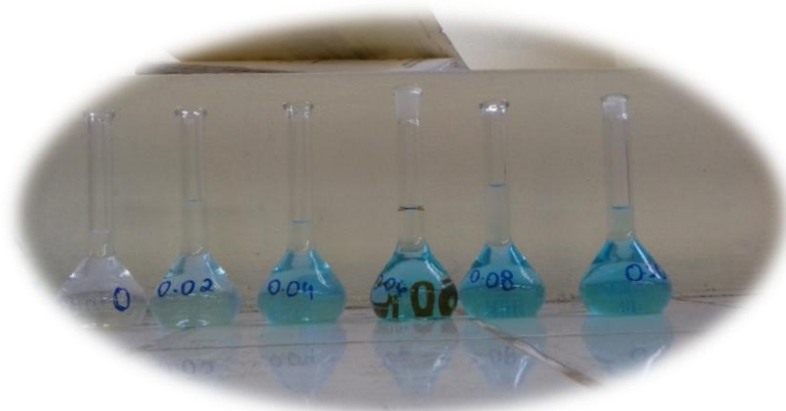


Figura 6. 1. Set de estándar para la calibración del equipo Ultravioleta/visible

6.2 Procedimiento

6.2.1 Exactitud de la escala fotométrica (absorbancias) en la región espectral UV.

- a. Configurar el instrumento para realizar un barrido en la región UV del espectro electromagnético de 400 a 200 nm.
- b. Utilizando como referencia la solución a) de 6.1, ajustar la línea base del espectrofotómetro. Endulzando las celdas de cuarzo (referencia y muestra) con la solución a) y ajustar a cero la línea base del equipo.
- c. Para verificar el rango de absorbancia de 0.2 – 0.7 utilizar la Solución 1 de $K_2Cr_2O_7$. Tomar la celda de la muestra, vaciando su contenido en el beaker de residuos. Endulzar la celda con agua grado HPLC al menos tres veces, proceda de igual forma con la Solución 1 de $K_2Cr_2O_7$, la cuarta vez llenar cuidadosamente la celda (de modo que no queden burbujas de aire en el seno de la solución). Limpiar las paredes exteriores de la celda utilizando papel Kleenex y colocar la celda en el porta celda de la muestra. Cerrar el paso de luz hacia las celdas.
- d. Utilizando el espectro obtenido por el espectrofotómetro, evaluar la precisión de la escala de absorbancia de 0.2 – 0.7. (Tabla 6.2)
- f. Para verificar el rango de absorbancia de 0.4 – 1.4 utilizar la Solución 2 de $K_2Cr_2O_7$ Proceda de la misma forma descrita en el enunciado 3. De este acápite.
- g. Utilizando el espectro obtenido por el espectrofotómetro, evaluar la exactitud de la escala de absorbancia de 0.4 – 1.4. (Tabla 6.2)
- h. Según la Guía Técnica las diferencias porcentuales (error relativo porcentual) deben ser menores del 2% para considerar como aceptables los resultados obtenidos.

Tabla 6. 2. Valores de referencia de absorbancias para $K_2Cr_2O_7$ en 5×10^{-3} M H_2SO_4

Longitud de onda (nm)	Absorbancia Solución 1 (Guía técnica)	Absorbancia Solución 2 (Guía técnica)	Absorbancia experimental solución 1	Absorbancia experimental solución 2	Error relativo% solución 1	Error relativo% solución 2
235 (min)	0,626; 236 nm	1,251; 234 nm	0,594	1,156	2,715	3,197
257 (max)	0,727, 258 nm	1,454; 260 nm	0,690	1,335	3,438	2,475
313 (min)	0,244; 314 nm	0,488; 314 nm	0,236	0,455	2,868	2,663
350 (max)	0,536; 350 nm	1,071; 350 nm	0,512	0,986	2,290	2,614

6.2.2 Exactitud de la escala fotométrica en la región espectral Visible

a. Configurar el instrumento para realizar un barrido en la región Vis del espectro electromagnético de 800 a 500 nm.

b. Utilizar como referencia la solución d), ajustar la línea base del espectrofotómetro. Endulzar las celdas de cuarzo (referencia y muestra) con la solución d) del ítem 6.1 y ajustar a cero la línea base del equipo.

c. Para verificar la exactitud de la escala fotométrica utilizar la Solución de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ al 2%. Tomar la celda de la muestra, vaciando su contenido en el beaker de residuos. Endulzar la celda con agua grado HPLC al menos tres veces, proceda de la misma forma...descrita en el enunciado 3. Del acápite anterior.

d. Utilizando el espectro obtenido por el espectrofotómetro, evaluar la precisión de la escala de absorbancia en la región visible. (Tabla 6.3)

e. Según la Guía Técnica las diferencias porcentuales (error relativo porcentual) deben ser menores del 2% para considerar como aceptables los resultados obtenidos.

Tabla 6. 3. Valores de referencia de absorbancia para $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (2%) en 1% H_2SO_4

Longitud de onda (nm)	Absorbancia (Guía técnica)	Absorbancia experimental	Error relativo%
600	0,068	0,063	0
650	0,224	0,207	0,446
700	0,527	0,478	0,572
750	0,817	0,756	1,328

6.2.3 Prueba de Linealidad en la región espectral Visible

Soluciones de sulfato de cobre de diferentes concentraciones pueden utilizarse para comprobar la linealidad de la escala de absorbancia. El uso de las absorbancias a 600 nm y 650 nm es particularmente útil para examinar el borde inferior de la escala de absorbancia.

- Configurar el instrumento para realizar la lectura fotométrica del Set de Estándares de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10) M a longitud de onda variable (multiwavelength). Establezca como primera longitud de onda $\lambda 1 = 600 \text{ nm}$ y como segunda longitud de onda $\lambda 2 = 650 \text{ nm}$. Asegúrese de configurar el instrumento para que lea cinco veces cada estándar.
- Utilizar como referencia la solución d), ajustar la línea base del espectrofotómetro. Endulce las celdas de cuarzo (referencia y muestra) con la solución d) y ajustar a cero la línea base del equipo.
- El espectrofotómetro estimará e imprimirá una curva de calibración promedio a estas longitudes de onda, sin embargo se deberá comprobar el ajuste lineal de dicha curva ingresando los datos en una hoja de cálculo (Excel, Gnumeric, Minitab, etc...).
- Construya la curva de calibración promedio graficando en el eje la concentración de los estándares de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ versus el eje expresando las absorbancias a $\lambda 2 - \lambda 1$ (Tabla 6.3).

Gráfica 6. 1. Región espectral visible

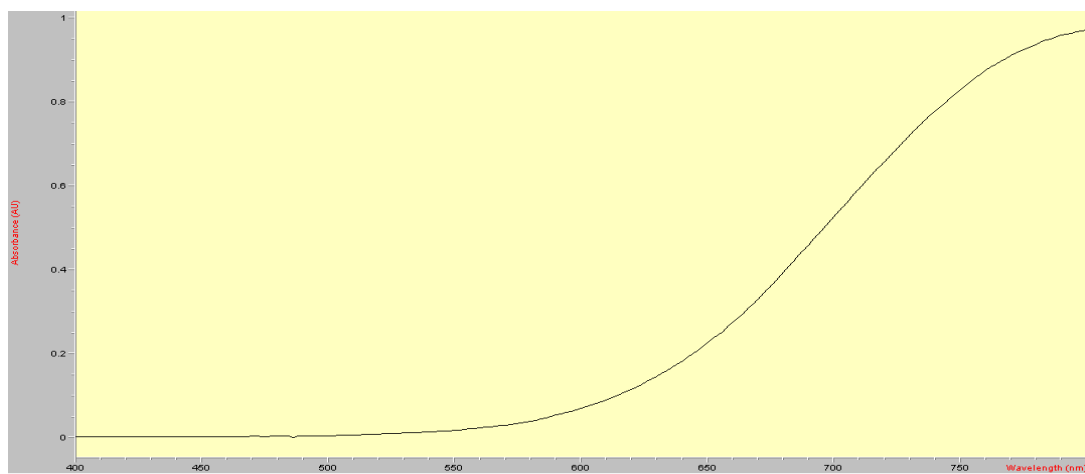
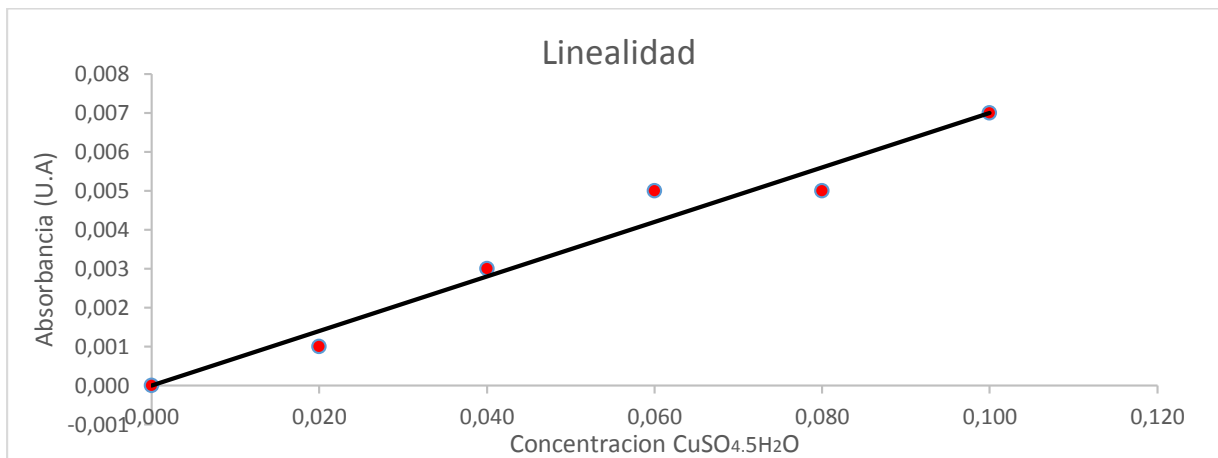


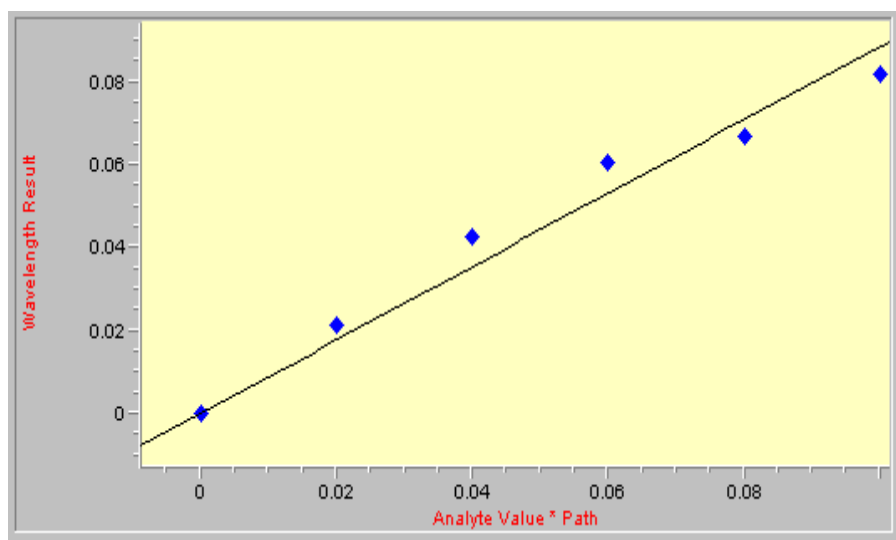
Tabla 6. 4. Absorbancia del set de Estándares de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Nº	Concentración del Estándar	Absorbancias $\lambda = 600 \text{ nm}$	Absorbancias $\lambda = 650 \text{ nm}$	Absorbancias a $\lambda_2 - \lambda_1$
1	0,00 M	0,000	0,000	0,00
2	0,02 M	0,001	0,006	0,01
3	0,04 M	0,003	0,129	0,13
4	0,06 M	0,005	0,178	0,17
5	0,08 M	0,005	0,194	0,19
6	0,10 M	0,007	0,245	0,24

Curva de calibración 600 nm

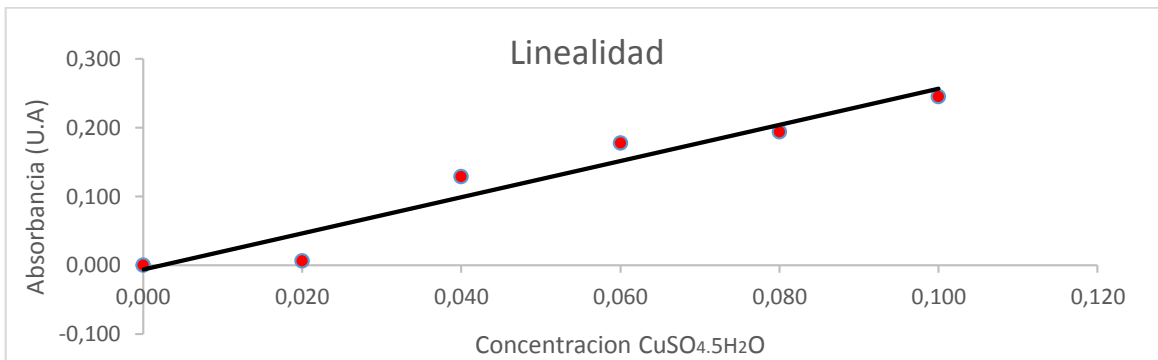


Gráfica 6. 2. Curva de calibración equipo UV/VIS 600 nm

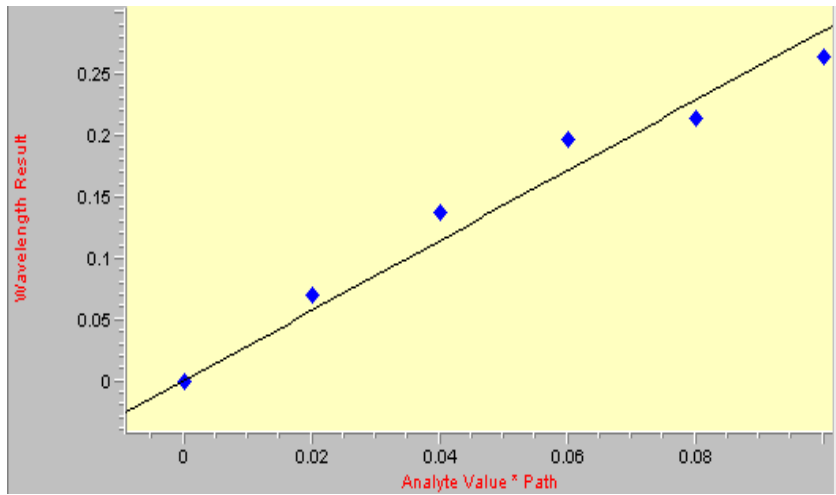


Gráfica 6. 3. Curva de calibración UV/VIS 600 nm

Curva de calibración 650 nm



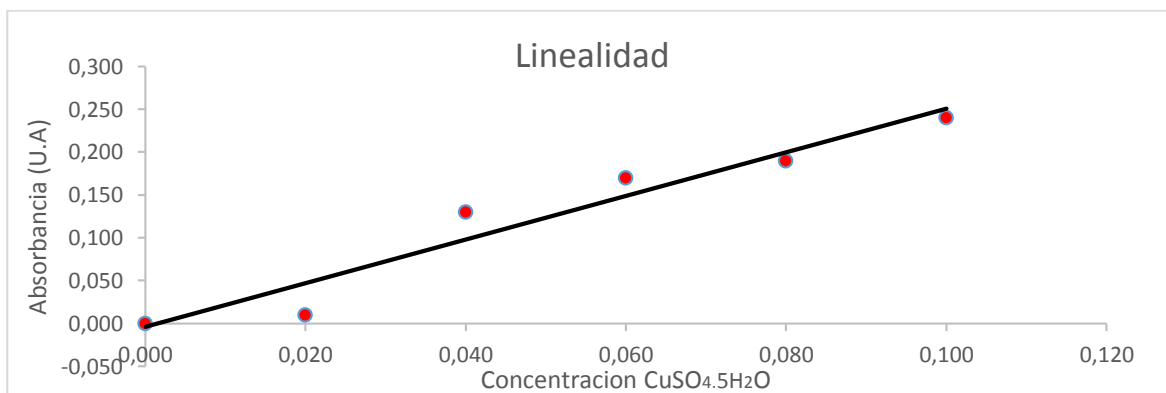
Gráfica 6. 4. Curva de calibración UV/VIS 650 nm



Gráfica

6. 5. Curva de calibración 650

nm



Gráfica 6. 6. Curva de calibración 600-650 nm



Figura 6. 2. Soluciones para la calibración del UV/VIS



Figura 6. 3. Calibración del equipo UV/VIS

Anexo 7. Estándares de calibración del analista A para determinación de boro total.

Tabla 7. 1. Set de estándares del analista A para la curva de calibración para la determinación de Boro total.

Analista A	Curva 1	
Estándar	Concentración	Absorbancia
STD 1	0,00	0,0000
STD 2	0,25	0,0337
STD 3	0,50	0,0900
STD 4	0,75	0,1142
STD 5	1,00	0,1538
STD 6	1,25	0,2062

Tabla 7. 2. Estadísticos de regresión de la determinación del analista A

Estadísticos	Magnitud	Estadísticos	Magnitud
Coeficiente de correlación (r)	0,999	Límite de detección (LOD)	0,0113
Coeficiente de determinación (R^2)	0,999	Límite de cuantificación (LOQ)	0,0334
Pendiente (b)	0,1583	Concentración mínima detectable	0,0596
Desviación estándar de la pendiente (S_b)	0,0030	Concentración mínima cuantificable	0,1988
Límite de confianza para la pendiente	0,0083		
Ordenada al origen (a)	0,00190		
Desviación estándar de la ordenada (S_a)	0,0022		
Límite de confianza para la ordenada	0,0063		
Errores aleatorios en el eje y ($S_{y/x}$)	0,003147		

Anexo 8. Estándares de calibración del analista B para la determinación de boro total

Tabla 8. 1. Estándar de la curva de calibración del analista B para la determinación de Boro.

Analista B	Curva 1	
Estándar	Concentración	Absorbancia
STD 1	0,00	0,0001
STD 2	0,25	0,0613
STD 3	0,50	0,0985
STD 4	0,75	0,1426
STD 5	1,00	0,1719
STD 6	1,25	0,2146

Tabla 8. 2. Estadísticos de regresión para la determinación de boro total.

Estadísticos	Magnitud	Estadísticos	Magnitud
Coefficiente de correlación (<i>r</i>)	0,998	Límite de detección (LOD)	0,0143
Coefficiente de determinación (R^2)	0,996	Límite de cuantificación (LOQ)	0,0538
Pendiente (<i>b</i>)	0,1689	Concentración mínima detectable	0,1001
Desviación estándar de la pendiente (S_b)	0,0053	Concentración mínima cuantificable	0,3337
Límite de confianza para la pendiente	0,0149		
Ordenada al origen (<i>a</i>)	-0,00257		
Desviación estándar de la ordenada (S_a)	0,0040		
Límite de confianza para la ordenada	0,0113		
Errores aleatorios en el eje y ($S_{y/x}$)	0,0056366		

Anexo 9. Cuantificación de boro a partir de las cenizas de la hoja de limón Tahití (*Citrus x latifolia*).



Figura 9. 2. Preparación de la solución azometina-H con ácido ascórbico al 1%.



Figura 9. 1. Solución buffer con acetato de amonio, EDTA, agua HPLC y ácido acético.

De acuerdo al ítem 3.3.4.4 y 3.3.4.5 pág 35 y 36 respectivamente del diseño metodológico para la lectura de la concentración de boro en el equipo de ultravioleta/visible se procede lo siguiente:



Figura 9. 3. Se agregaron 10 mL de ácido clorhídrico a 2 M en los crisoles que contiene las cenizas.



Figura 9. 4. Se calentó en un plato calefactor hasta ebullición.



Figura 9. 5. Se filtró el contenido del crisol a través de un papel de filtro, recibiendo el filtrado en un matraz volumétrico de 100 mL

Acorde al ítem 3.3.4.5 del diseño metodológico inciso a y b de la preparación de las soluciones de boro para la preparación según el ítem 3.3.4.6 del set de estándar para la curva de calibración a continuación:

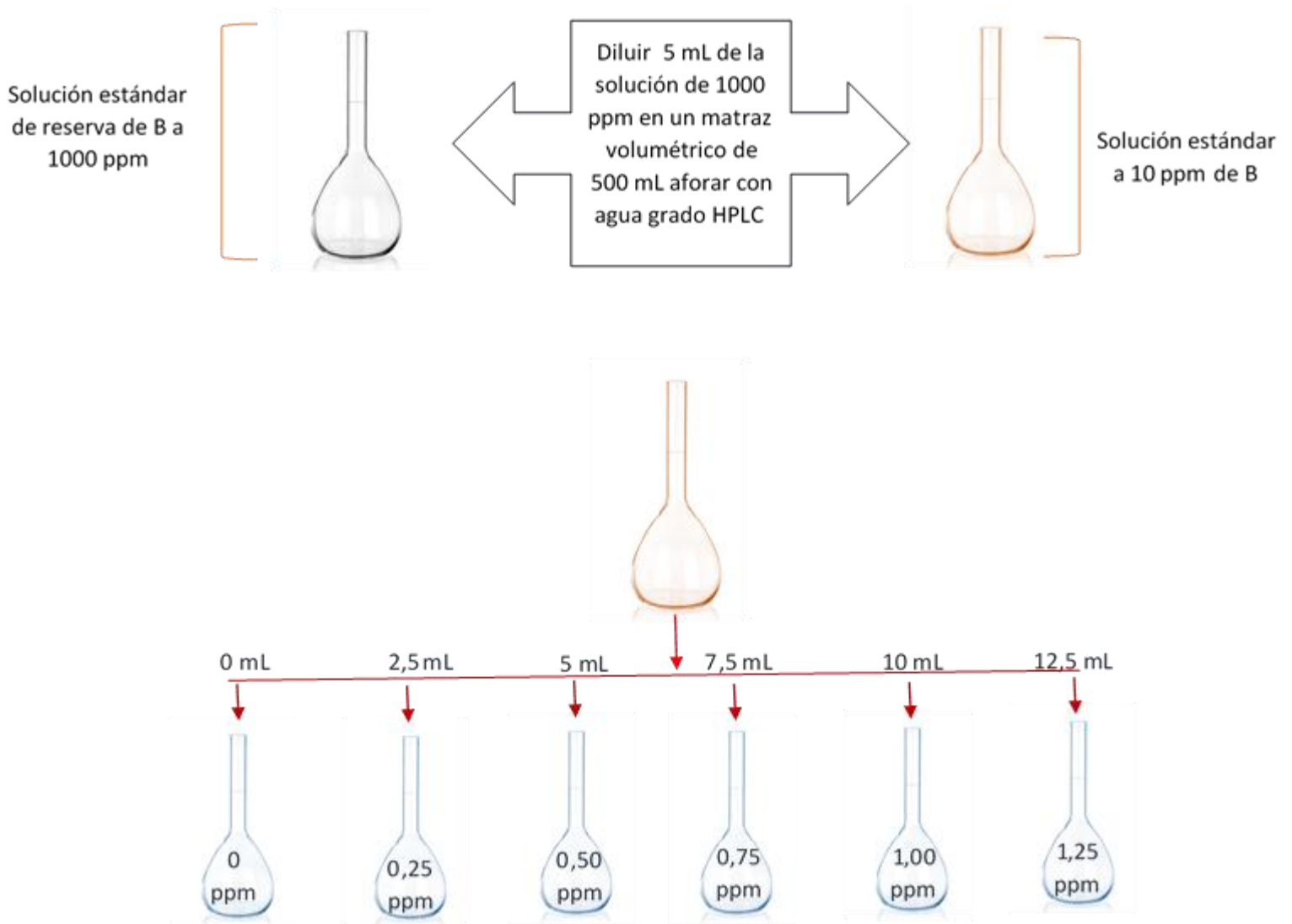
A partir de la solución estándar de 100 ppm de B se diluyó 25 mL de la solución en un matraz volumétrico de 500 mL se aforo con agua grado HPLC y guardo en un frasco de polietileno.

Figura 9. 6. Se prepararon 6 estándares, en el que se miden alícuotas de la solución estándar de trabajo de B 10 ppm según la tabla 3.5 se transfieren a matraces volumétricos clase A de 100 mL y se almacenaron en un frasco de polietileno

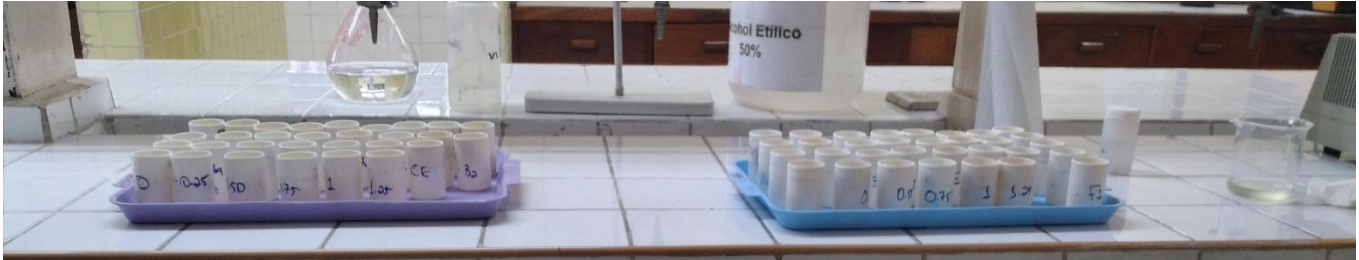


Representación esquemática de la metodología experimental de la elaboración de la curva de calibrado.

Esquema 9. 1. Preparación del set de estándar de B.



De acuerdo al ítem 3.3.4.7 del diseño metodológico para la determinación de boro a partir del filtrado de las cenizas de la muestra de análisis.



Anexo 10. Incertidumbre de la concentración de Boro de la hoja de limón Tahití (*Citrus x latifolia*).

10.1 Incertidumbre de la masa de la muestra

a. Linealidad

La certificación de la balanza analítica LACOMET 01470317 reporta una linealidad de 0.000062 g en todo el intervalo de la medición, por consiguiente, se estima como una incertidumbre de tipo B, rectangular simétrico:

$$\mu_{(lin)} = \frac{L}{\sqrt{3}}$$

$$\mu_{(lin)} = \frac{0.0003}{\sqrt{3}} = 0.00015 \text{ g}$$

Esta contribución tiene que ser tomada en cuenta dos veces, una vez por la tara y otra por la masa bruta, porque cada una es una observación independiente y los efectos de linealidad no están correlacionados. Por lo tanto:

$$\mu_{(lin)} = \sqrt{2 \times (0.00015)^2} = 0.00021 \text{ g}$$

b. Resolución

La certificación de la balanza analítica Kern ABJ-NM/ABS-N reporta una resolución de 0.0001 g. la incertidumbre por resolución se estima asumiendo una distribución rectangular asimétrica. Al igual que la distribución por linealidad, distribución por resolución tiene que ser estimada dos veces, por consiguiente:

$$\mu_{(res)} = \frac{res}{2\sqrt{3}}$$

$$\mu_{(res)} = \frac{0.0001}{2 \times \sqrt{3}} = 0.00003 \text{ g}$$

$$\mu_{(res)} = \sqrt{2 \times (0.00003)^2} = 0.00004 \text{ g}$$

Con el fin de calcular la incertidumbre combinada correspondiente a la porción de muestra medida se aplica la regla 1 por consiguiente la incertidumbre estándar combinada para $\mu(m_{muestra})$ no es más que:

$$\mu(m_{muestra}) = \sqrt{\mu(Lin)^2 + \mu(Res)^2}$$

$$\mu(m_{muestra}) = \sqrt{(0.00021)^2 + (0.00004)^2} = 0.00024 \text{ g}$$

10.2 Incertidumbre del volumen

a. Repetibilidad

$$\mu(rep) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$\mu(rep) = \frac{0,30165}{\sqrt{20}} = 0,06745$$

b. Tolerancia

$$\mu_{(Tol)} = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

$$\mu_{(Tol)} = \frac{0,12}{\sqrt{3}} = 0,06928$$

c. Temperatura

$$\mu_T = \frac{V \times T^{\circ}C/H_2O \times \Delta T}{\sqrt{3}}$$

$$\mu_T = \frac{100 \text{ mL} \times 0,00021 \times (26 - 20)}{\sqrt{3}} = 0,07275$$

$$\mu_V = \sqrt{(rep)^2 + (Tol)^2 + (T)^2}$$

$$\mu_V = \sqrt{(0,06745)^2 + (0,06928)^2 + (0,07275)^2} = 0,1210$$

10.3 Estimación de la incertidumbre correspondiente a $\mu(f_r)$ la repetibilidad de la técnica colorimétrica

La técnica muestra una repetibilidad por la determinación de 0,0188 (como desviación estándar relativa). Este valor puede utilizarse directamente para el cálculo de la incertidumbre estándar combinada asociada a los diferentes términos de repetibilidad.

$$\mu(fr) = \frac{s}{\sqrt{30}}$$

$$\mu(fr) = \frac{0,1030}{\sqrt{30}} = 0,0188$$

10.4 Incertidumbre estándar asociada al resultado promedio de las concentraciones de boro diluidas en las muestras analizadas.

Para estimar la incertidumbre estándar asociada a $[B]$ deben ser calculadas las incertidumbres estándar asociadas a cada concentración de boro diluida en la solución ácida digeridas en las cenizas por muestra. El estadístico S_{x_0} es un estimador de la incertidumbre como una desviación estándar para cada $[B]$ por muestra.

Por cada muestra se realizó una lectura fotométrica por cada muestra, el residuo de los resultados proviene de la curva de calibración y se toman del anexo 7, 8. Para la solución ácida dirigidas de las cenizas proveniente de la hoja de limón Tahití (*Citrus x latifolia*), ($y_0 = 0,064$) promedio de las absorbancias obtenidas de la lectura de las muestras, \bar{y} = promedio de las absorbancias de las muestras.

Tabla 10. 1. Hoja de cálculo optimizada con los estadísticos asociados en la regresión de la curva de calibración.

STD	CONC	ABS	$(y_i - \bar{y})^2$	x_i^2	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	\hat{y}	$y_i - \hat{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$
1	0,00	0,006	0,000040	0	-0,6250	0,3906	-0,0959	0,0092	0,0599	-0,0003	0,0063	0,0105
2	0,00	0,001	0,000002	0,0000	-0,6250	0,3906	-0,1009	0,0102	0,0631	-0,0003	0,0013	0,0105
3	0,25	0,038	0,000007	0,0625	-0,3750	0,1406	-0,0639	0,0041	0,0240	0,0406	-0,0026	0,0038
4	0,25	0,037	0,000013	0,0625	-0,3750	0,1406	-0,0649	0,0042	0,0243	0,0406	-0,0036	0,0038
5	0,50	0,079	0,000006	0,2500	-0,1250	0,0156	-0,0229	0,0005	0,0029	0,0815	-0,0025	0,0004
6	0,50	0,078	0,000012	0,2500	-0,1250	0,0156	-0,0239	0,0006	0,0030	0,0815	-0,0035	0,0004
7	0,75	0,121	0,000002	0,5625	0,7500	0,5625	0,1210	0,0146	0,0908	0,1224	-0,0014	0,0150
8	0,75	0,122	0,000000	0,5625	0,7500	0,5625	0,1220	0,0149	0,0915	0,1224	-0,0004	0,0150
9	1,00	0,159	0,000018	1,0000	1,0000	1,0000	0,1590	0,0253	0,1590	0,1633	-0,0043	0,0267
10	1,00	0,175	0,000138	1,0000	1,0000	1,0000	0,1750	0,0306	0,1750	0,1633	0,0117	0,0267
11	1,25	0,202	0,000005	1,5625	1,2500	1,5625	0,2020	0,0408	0,2525	0,2042	-0,0022	0,0417
12	1,25	0,205	0,000001	1,5625	1,2500	1,5625	0,2050	0,0420	0,2563	0,2042	0,0008	0,0417
ΣSuma	7,50	1,223	0,00024	6,8750	3,7500	7,3438	0,6115	0,1970	1,2022	1,2230	0,0000	0,1959
Promedio	0,63	0,10191667	0,00002	0,5729	-0,3750	0,1823	-0,0621	0,0048	0,0295	0,0406	-0,0007	0,0049

Estadísticos	Magnitud	Estadísticos	Magnitud
Coefficiente de correlación (r)	0,998	Límite de detección (LOD)	0,0144
Coefficiente de determinación (R ²)	0,996	Límite de cuantificación (LOQ)	0,0489
Pendiente (b)	0,1636	Concentración mínima detectable	0,0903
Desviación estándar de la pendiente (S _b)	0,0018	Concentración mínima cuantificable	0,3010
Límite de confianza para la pendiente	0,0040		
Ordenada al origen (a)	-0,000333		
Desviación estándar de la ordenada (S _a)	0,0014		
Límite de confianza para la ordenada	0,0031		
Errores aleatorios en el eje y (S _{y/x})	0,004925		

A partir de los datos obtenidos de los estadísticos de regresión se calcula S_{xo}:

$$S_{xo} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_{xo} = \frac{0,004925}{0,1636} \sqrt{\frac{1}{30} + \frac{1}{12} + \frac{(0,071 - 0,102)^2}{(0,0267)^2 \times 7,3438}}$$

$$S_{x_0} = 0,031 \times \sqrt{\frac{1}{30} + \frac{1}{12} + \frac{0,000961}{0,0049}}$$

2.0009 42.0267

$$S_{x_0} = 0,0301 \times \sqrt{0,1214}$$

$$S_{x_0} = 0,0301 \times 0,3484$$

$$S_{x_0} = 0,0105$$

10.5 Cálculo de la incertidumbre estándar combinada asociada a la determinación de boro total por la técnica espectroscópica de la muestra de la hoja de limón Tahití (*Citrus x latifolia*).

Se han logrado expresar todas las variables que sobrellevan fuente de incertidumbre las cuales al ser combinadas aportan una incertidumbre estándar asociada al mensurando para la técnica colorimétrica.

$$[B \text{ mg/kg}] = \frac{y - a}{b} \times Fd \times Frep$$

$$[B \text{ mg/kg}] = S_{x_0} \times Fd \times Fr$$

[B mg/kg] = concentración

Fr =factor de repetibilidad

a = intercepto

b = pendiente

Se le aplica la segunda regla de la QUAM para modelos matemáticos que involucran multiplicación y división, por lo tanto la ecuación para la estimación de la incertidumbre combinada queda expresada la siguiente manera:

$$\frac{\mu[B \text{ mg/kg}]}{[B \text{ mg/kg}]} = \frac{S_{xo}}{Xo} \times \frac{\mu V}{V} \times \frac{\mu m}{m} \times \frac{Fr}{1}$$

$$\mu c[B \text{ mg/kg}] = [B \text{ mg/kg}] \times \sqrt{\left(\frac{S_{xo}}{Xo}\right)^2 + \left(\frac{\mu V}{V}\right)^2 + \left(\frac{\mu m}{m}\right)^2 + \left(\frac{Fr}{1}\right)^2}$$

$$\mu c[B \text{ mg/kg}] = [B \text{ mg/kg}] \times \sqrt{\left(\frac{0,0105}{0,44}\right)^2 + \left(\frac{0,1210}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,0002}{1,0000}\right)^2 + \left(\frac{0,0188}{1}\right)^2}$$

$$\mu c[B \text{ mg/kg}] = 1,23$$

10.6 Cálculo de la incertidumbre expandida para la técnica espectrofotométrica

Una vez que se conoce la incertidumbre combinada, se prosigue a calcular la incertidumbre expandida U_{ex} , que se consigue multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura que permite establecer un intervalo de concentraciones en el que se encuentre de forma razonable el mensurando.

$$U_{ex} = \mu c[B \text{ mg/kg}] \times k$$

$$U_{ex} = 1,23 \times 2 = \pm 2.46$$

Anexo 11. Límites de cantidad de nutrientes en cítricos.

Tabla 7. 3. Límite de la cantidad de nutrientes en cítricos.

Elementos (%)	Deficiente (menor que)	Bajo	Niveles Óptimos	Alto	Excesivo (mayor que)
N	2.2	2.2-2.3	2.4-2.6	2.7-2.8	2.8
P	0.09	0.09-0.11	0.12-0.16	0.17-0.29	0.30
K	0.40	0.40-0.69	0.70-1.09	1.10-2.00	2.30
Ca	1.6	1.6-2.9	3.0-5.5	5.6-6.9	7.0
Mg	0.16	0.16-0.25	0.26-0.6	0.7-1.1	1-2
S	0.14	0.14-0.19	0.2-0.3	0.4-0.5	0.6
B (ppm)	21	21-30	31-100	101-260	260.
Cl%			0.3	0.4-0.6	0.7
Cu (ppm)	3.6	3.6-4.9	5.1-10	10-15	15
Fe	36	36-59	60-120	130-200	250
Mn	16	16-24	25-200	300-500	1000
Mo	0.06	0.06-0.09	0.10-0.29	0.3-0.4	-
Zn	16	16-24	25-100	110-200	300

Fuente: CENTA, cultivo del limón Tahití, 2002.

Anexo 12. Fertilizante.



Figura 12. 1. Portada de envase del fertilizante utilizado como muestra control.

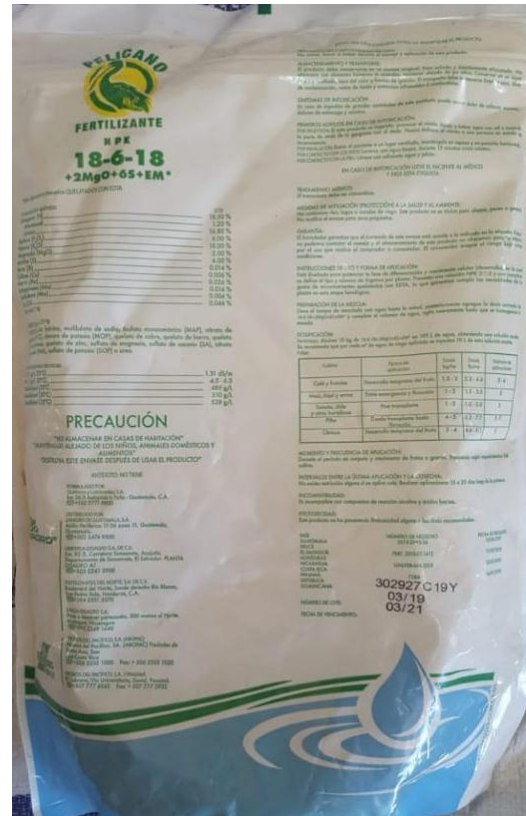


Figura 12. 2. Tabla nutricional del envase del fertilizante utilizado como muestra control.

Azufre	6 %
Boro	0.014 %
Hierro	0.0025 %
Manganeso	0.014 %
Zn	0.046 %
Cu	0.006 %
Potasio	28 %

Anexo 13. Método de yema de los dedos



La práctica con la yema de los dedos se utiliza para conocer la madurez de la hoja, la hoja debe de ser un poco más dura, ya que la hoja joven es más blanda; frotando la yema en la hoja y de igual forma identificar el color de la hoja.

Figura 13. 1. Práctica yema de los dedos para conocer la estructura de la hoja.

GLOSARIO

CENTA: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

Necrosis: Degeneración de un tejido por muerte de sus células.

Clorosis: Amarilleo de las partes verdes de una planta debido a la falta de actividad de sus cloroplastos.

Cloroplastos: Orgánulo de las células vegetales en el que tiene lugar la fotosíntesis.

Follaje: Conjunto de hojas y ramas de árboles y plantas.

Fenología: Estudio de los fenómenos biológicos en relación con el clima, particularmente en los cambios estacionales.

Translocación: Mutación genética que consiste en el cambio de posición de dos o más nucleótidos en la secuencia del ADN.

Fisiología: Ciencia que tiene por objeto el estudio de las funciones de los seres orgánicos

Entrenudo: Parte del tallo de algunas plantas comprendida entre dos nudos.

Lanceolado, da: Dicho de una hoja o de sus lóbulos: De forma semejante al hierro de la lanza.

Pecíolos: Pezón que sostiene la hoja.

Ápice: Extremo superior o punta de algo.

Dicotiledón: Dicho de un vegetal: Que tiene un embrión con dos cotiledones

Rutácea: Dicho de una planta: Del grupo de las angiospermas dicotiledóneas, con hojas alternas u opuestas, simples o compuestas

Floema: Tejido vivo de las plantas vasculares que transporta sustancias orgánicas e inorgánicas de una parte a otra de estos organismos.

Translocación: Mutación genética que consiste en el cambio de posición de dos o más nucleótidos en la secuencia del ADN.

Simplástica: El compartimento intracelular de una planta, conformado por el citoplasma

Apoplasto: Es un espacio extracelular periférico al plasmalema de las células vegetales por el que fluyen agua y otras sustancias.

Minitab: es un programa de computadora diseñado para ejecutar funciones estadísticas básicas y avanzadas.

Anderson-Darling (AD): Mide el área entre la línea ajustada (basada en la distribución normal) y la función de distribución empírica (que se basa en los puntos de los datos).

El valor p es: una probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula.