



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

***IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA EL  
ESTUDIO QUÍMICO DE CATIONES Y BICARBONATOS EN  
MANANTIALES DE BAHÍA CONCEPCIÓN  
(BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO)***

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA  
GIOVANNA MERCHAND REYES**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*“Solo una cosa convierte en imposible un sueño:*

*el miedo a fracasar”*

*Paulo Coelho*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, aquél que nunca falla y me fortalece a cada instante. Por su amor y bendiciones. Sin Él no estaría en donde estoy.

A mis papás, gracias por creer en mí y estar conmigo siempre, por soportar mis malos ratos con amor, mis desveladas y ausencias, los quiero. A mis hermanas Erika y Mirelle, las quiero un montón.

Familia, en las buenas y en las malas, sé que siempre están ahí para mí. Espero que se haga cada día más grande. Abue, desde donde estés, espero que nos recuerdes con amor como nosotros lo hacemos, te quiero.

Adrián, sabes que no existen palabras, gracias por recordarme quien soy, por todo. Hermanito, por crecer conmigo, aceptarme como soy y quererme sin condiciones. Mau, eres único, te quiero un montón amigo.

A mis hermanitos de la Facultad (Edgar, Jes, Jenny, Javier, Rodrigo, Vic, Chuy, Maya, Sandy y Lázaro); gracias por acompañarme estos cinco años y espero que lo hagan por muchos más, con las locuras que han caracterizado siempre nuestra amistad.

Ruth, gracias por tu gran apoyo durante estos dos años, con tus enseñanzas me has hecho crecer y aprender cada día más. Gracias por ser mi profesora, mi tutora, pero sobre todo, una gran amiga. Te quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio de cromatografía del Edificio 8 del Instituto de Ingeniería y Geofísica. Al programa PAPIIT IN11809 *Modelación geoquímica aplicada a sistemas hidrotermales y su aplicación al sistema de información geográfico de agua de la UNAM*, por su apoyo durante la realización de este trabajo

A mis hermanos de la Escuela de Pastoral, por sus interminables oraciones durante este último año.

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO II.</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>5</b>
	2.1 Fundamentos de las técnicas.....	6
	2.1.1 Volumetría: ácido – base y complejos.....	6
	2.1.2 Cromatografía iónica.....	11
	2.1.3 Fotometría.....	16
	2.2 Desarrollo analítico.....	18
	2.2.1 Introducción.....	18
	2.2.2 Diseño experimental de 3 factores.....	19
	2.3 Validación.....	21
	2.3.1 Importancia de la validación de sistemas analíticos.....	21
	2.3.2 Definición de parámetros.....	24
	2.4 Características de las descargas calientes de Bahía Concepción, Baja California Sur.....	27
	2.5 Características de Bahía Concepción, Baja California Sur, México.....	31
<b>CAPÍTULO III.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
	3.1 Cuantificación de bicarbonato en muestras de agua hidrotermal.....	35

**Implementación de una metodología para el estudio químico de cationes y bicarbonatos en manantiales de Bahía Concepción (Baja California Sur, México)**

3.1.1	Volumetría directa: Descripción del sistema...	35
3.1.1.1	Desarrollo de la metodología: diseño experimental de tres factores.....	37
3.1.2	Volumetría por retroceso: Descripción del sistema.....	41
3.1.2.1	Desarrollo del método.....	42
3.1.3	Validación de los dos sistemas de cuantificación de bicarbonato.....	43
3.1.4	Comparación entre metodologías.....	47
3.2	Cuantificación de cationes por cromatografía iónica...	47
3.2.1	Desarrollo del método: elección de variables	49
3.2.2	Calibración y validación del sistema.....	54
3.3	Muestreo y lectura de muestras.....	59
3.3.1	Obtención y conservación de las muestras....	59
3.3.2	Determinación de parámetros físico – químicos.....	60
3.3.3	Determinación de bicarbonato.....	61
3.3.4	Cuantificación de cationes por cromatografía iónica.....	61
3.3.5	Cuantificación de cationes por otras metodologías (volumetría de complejos y fotometría).....	62

<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>66</b>
4.1 Cuantificación de bicarbonato.....	67
4.1.1 Desarrollo de las metodologías.....	67
4.1.1.1 Volumetría directa.....	68
4.1.1.2 Volumetría por retroceso.....	72
4.1.2 Validación de los dos sistemas.....	73
4.1.3 Equivalencia de las metodologías para la cuantificación de bicarbonato.....	79
4.2 Cuantificación de cationes.....	81
4.2.1 Establecimiento del método de cromatografía iónica.....	81
4.2.2 Calibración y validación del sistema.....	94
4.3 Resultados de las muestras.....	106
4.3.1 Identificación de las muestras.....	106
4.3.2 Parámetros físico – químicos.....	107
4.3.3 Determinación de bicarbonato.....	108
4.3.4 Determinación de cationes.....	110
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>121</b>
<b>CAPÍTULO VII. APÉNDICES.....</b>	<b>126</b>
7.1 Calibración de material.....	127

7.2	Preparación de reactivos.....	130
7.3	Pruebas estadísticas empleadas.....	137
7.4	Cálculo de incertidumbre.....	141
7.5	Pérdida al secado de bicarbonato de sodio.....	143

### **Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b>	Algunos indicadores ácido - base.....	8
<b>Tabla 2.</b>	Longitud de onda a la que emiten los metales alcalinos y alcalinotérreos.....	18
<b>Tabla 3.</b>	Representación de los experimentos realizados en un diseño $2^3$	20
<b>Tabla 4.</b>	Descripción de algunas manifestaciones hidrotermales submarinas someras localizadas en mares mexicanos.....	29
<b>Tabla 5.</b>	Variación de especies en una titulación volumétrica del ión bicarbonato con un ácido fuerte (HCl).....	36
<b>Tabla 6.</b>	Asignación de niveles para las variables experimentales para el desarrollo analítico.....	39
<b>Tabla 7.</b>	Diluciones realizadas para la linealidad del sistema.....	44
<b>Tabla 8.</b>	Condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de cationes por una metodología establecida con anterioridad (Merchand, 2008).....	48
<b>Tabla 9.</b>	Concentraciones de algunos iones encontrados para diferentes sitios de descargas hidrotermales en el área de Bahía Concepción, durante el muestreo del 2004 .....	53

<b>Tabla 10.</b>	Concentraciones empleadas para los multiestándares en mg*L <sup>-1</sup>	55
<b>Tabla 11.</b>	Estándares preparados para la cuantificación por fotometría.....	63
<b>Tabla 12.</b>	Parámetros obtenidos mediante el diseño experimental.....	68
<b>Tabla 13.</b>	Análisis de varianza para el diseño experimental con un total de 8 experimentos realizados por triplicado (N = 24).....	69
<b>Tabla 14.</b>	Resultados de la prueba de precisión para las dos metodologías de cuantificación de bicarbonato.....	71
<b>Tabla 15.</b>	Volumen promedio utilizado de una disolución de ácido clorhídrico empleado para distintos estándares de bicarbonato en los métodos de cuantificación directo y por retroceso.....	72
<b>Tabla 16.</b>	Características de las regresiones lineales establecidas para los métodos de cuantificación de bicarbonato utilizando el método de mínimos cuadrados.....	73
<b>Tabla 17.</b>	Resultados de exactitud y repetibilidad para los métodos de cuantificación de bicarbonato.....	76
<b>Tabla 18.</b>	Datos promedio obtenidos para la linealidad de la cuantificación de bicarbonato por dos metodologías diferentes.....	76
<b>Tabla 19.</b>	Características de las regresiones lineales establecidas para la linealidad del método.....	77
<b>Tabla 20.</b>	Resultados de precisión intermedia para la cuantificación de bicarbonato por dos metodologías diferentes.....	78
<b>Tabla 21.</b>	Límites de detección y cuantificación para la determinación de bicarbonato por los métodos de volumetría directa y volumetría por retroceso.....	78

<b>Tabla 22.</b>	Condiciones obtenidas para diferentes fases móviles.....	84
<b>Tabla 23.</b>	Parámetros cromatográfico con diferentes fases móviles en la fase 1 de desarrollo .....	85
<b>Tabla 24.</b>	Parámetros cromatográfico con diferentes fases móviles en la fase 1 de desarrollo .....	86
<b>Tabla 24.</b>	Condiciones instrumentales obtenidos para cada experimento en la fase 2 del desarrollo de la metodología de cromatografía iónica para la cuantificación de cationes.....	89
<b>Tabla 25.</b>	Parámetros cromatográficos determinados para diferentes fases móviles durante la fase 2 del desarrollo.....	89
<b>Tabla 26.</b>	Parámetros cromatográficos determinados para diferentes fases móviles durante la fase 2 del desarrollo.....	90
<b>Tabla 27.</b>	Parámetros cromatográficos determinados para diferentes fases móviles durante la fase 2 del desarrollo.....	91
<b>Tabla 28.</b>	Condiciones instrumentales para la fase tres del desarrollo del método de cromatografía iónica para la cuantificación de cationes.....	93
<b>Tabla 29.</b>	Parámetros cromatográficos para las fases probadas durante la fase tres del desarrollo.....	93
<b>Tabla 30.</b>	Ecuaciones obtenidas para las curvas de calibración de cada ión analizado por cromatografía.....	95
<b>Tabla 31.</b>	Resultados de precisión para el método de cromatografía iónica.....	96
<b>Tabla 32.</b>	Resultados obtenidos para el ajuste del sistema.....	97

<b>Tabla 33.</b>	Resultados de linealidad del sistema para los cationes medidos por cromatografía iónica.....	97
<b>Tabla 34.</b>	Resultados de linealidad del sistema para los cationes medidos por cromatografía iónica.....	98
<b>Tabla 35.</b>	Resultados obtenidos para la muestras adicionada (A) y no adicionada (B) para la prueba de especificidad.....	99
<b>Tabla 36.</b>	Resultados de la prueba de t realizada para la especificidad del sistema.....	99
<b>Tabla 37.</b>	Resultados de exactitud para una muestra de agua hidrotermal por cromatografía iónica.....	100
<b>Tabla 38.</b>	Porcentaje de recobro para tres diferentes niveles de concentración para los iones determinados por cromatografía iónica.....	101
<b>Tabla 39.</b>	Características de las regresiones lineales obtenidas a partir de la linealidad del método.....	102
<b>Tabla 40.</b>	Resultados obtenidos para la cuantificación de los iones por dos analistas.....	104
<b>Tabla 41.</b>	Límites de detección y cuantificación para el análisis de cationes por cromatografía iónica.....	105
<b>Tabla 42.</b>	Ubicación de las muestras obtenidas durante el muestreo en Bahía Concepción, en enero del 2009.....	107
<b>Tabla 43.</b>	Determinación de los parámetros fisicoquímicos para las muestras en campo.....	108

<b>Tabla 44.</b>	Resultados obtenidos para el bicarbonato presente en las muestras.....	109
<b>Tabla 45.</b>	Concentraciones determinadas para los cationes analizados.....	110
<b>Tabla 46.</b>	Concentraciones obtenidas por flamometría y volumetría por complejos.....	111
<b>Tabla 47.</b>	Tabla que presenta las incertidumbres al 95 % de confianza, asociadas a las buretas y pipetas mostrando el valor al 100, 50 y 10 % de capacidad de cada instrumento.....	128
<b>Tabla 46.</b>	Incertidumbres expandidas obtenidas mediante el método gravimétrico para pipetas y matraces volumétricos.....	129

### **Índice de figuras**

<b>Figura 1.</b>	Diagrama de distribución de especies $H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$ a 25 °C en función del pH.....	9
<b>Figura 2.</b>	Estructura del EDTA.....	10
<b>Figura 3.</b>	Composición general de un cromatógrafo de iones.....	13
<b>Figura 4.</b>	Partes constitutivas de un flamómetro (tomado del manual de uso del equipo, Jenway, 2008).....	17
<b>Figura 5.</b>	Diagrama de flujo que ilustra el proceso de validación de un sistema analítico, mostrando las etapas críticas (tomado de Feinberg, 2007).....	23
<b>Figura 6.</b>	Distribución mundial de los sistemas hidrotermales submarinos someros (<200 mbnm) (Tomado de Canet y Prol-Ledesma, 2006).....	28

<b>Figura 7.</b>	Ilustración de un sistema hidrotermal (modificado de German y Von Damm, 2004).....	30
<b>Figura 8.</b>	Mapa del territorio de Baja California Sur, México, con la localización aproximada de Bahía Concepción (Imagen tomada de Google earth).....	32
<b>Figura 9.</b>	Curva de titulación de bicarbonato con ácido clorhídrico.....	37
<b>Figura 10.</b>	Aparatos utilizados para el desarrollo experimental de un método de cuantificación de bicarbonato por volumetría directa.	39
<b>Figura 11.</b>	Comparación entre salinidad y balance iónica en un análisis anterior en la zona de muestreo.....	48
<b>Figura 12.</b>	Equipo de cromatografía iónica en el laboratorio de cromatografía del Edificio 8 del Instituto de Ingeniería.....	49
<b>Figura 13.</b>	Equipo desionizador de agua potable.....	51
<b>Figura 14.</b>	Muestreo realizado en descargas hidrotermales costeras de Bahía Concepción.....	60
<b>Figura 15.</b>	Multiparámetro HACH modelo sensION1 durante el trabajo de campo.....	61
<b>Figura 16</b>	Flamómetro marca Jenway del laboratorio 3D de la Facultad de Química, UNAM.....	63
<b>Figura 17.</b>	Gráfica obtenida para el diseño experimental.....	69
<b>Figura 18.</b>	Gráficas de porcentaje de recobro contra la concentración de HCl.....	70

<b>Figura 19.</b>	Gráficas obtenidas para la linealidad del sistema de A) volumetría directa y B) volumetría por retroceso para la cuantificación de bicarbonato.....	74
<b>Figura 20.</b>	Gráficas de linealidad del método de cuantificación de bicarbonato.....	77
<b>Figura 21.</b>	Cromatogramas obtenidos para diferentes fases móviles durante la fase 1 de desarrollo.....	82
<b>Figura 22.</b>	Cromatogramas obtenidos para diferentes fases móviles durante la fase 1 de desarrollo.....	83
<b>Figura 23.</b>	Cromatogramas obtenidos para diferentes fases móviles durante la fase 1 de desarrollo.....	84
<b>Figura 24.</b>	Cromatogramas obtenidos durante la segunda fase del desarrollo.....	87
<b>Figura 25.</b>	Cromatogramas obtenidos durante la segunda fase del desarrollo.....	88
<b>Figura 26.</b>	Cromatogramas obtenidos durante la fase tres del desarrollo analítico, variando la concentración de etanol en la fase móvil...	92
<b>Figura 27.</b>	Gráficas obtenidas para la linealidad del sistema de cromatografía iónica.....	98
<b>Figura 28.</b>	Gráficas para la linealidad del método de cromatografía iónica	102
<b>Figura 29.</b>	Linealidad del método para litio, potasio y magnesio.....	103
<b>Figura 30.</b>	Mapas que representan las áreas de muestreo de las descargas hidrotermales costeras A), y muestras de agua dulce.....	106

<b>Figura 31.</b>	Gráficas de comparación de metodologías para la cuantificación de cationes.....	112
<b>Figura 32.</b>	Curva de calibración experimental obtenida al titular una disolución de HCl aproximadamente $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , utilizando carbonato de sodio como patron primario.....	131
<b>Figura 33.</b>	Gráficas de A) la primera derivada y B) la segunda derivada para HCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	132

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

El análisis químico cuantitativo da lugar a la obtención de datos químicos de una muestra problema, como son las concentraciones de algunos analitos de interés. Para realizar un análisis cuantitativo confiable, se deben tomar en cuenta las características de la muestra, así como la concentración esperada para los analitos. Esto permite el desarrollo de metodologías específicas, empleando diferentes técnicas analíticas.

El desarrollo de metodologías para la cuantificación de especies químicas presentes, como por ejemplo especies iónicas, requieren de equipo con la sensibilidad adecuada para su detección, así como la estandarización del mismo y su validación, lo que refleja la veracidad de los datos y la estabilidad del sistema.

Para la validación de un sistema analítico, es necesario tomar en cuenta sus características, los fundamentos en los que se basa y las características de la muestra para el que fue desarrollado. Por ello, organizaciones internacionales (Feinberg, 2007) han establecido una serie de lineamientos a seguir para llevar a cabo el proceso de validación, considerando aquellos casos que, como el presente, sólo se realiza el análisis en un laboratorio específico.

Una de las aplicaciones de este tipo de análisis, es la cuantificación de especies mayores de descargas hidrotermales en el área de la geoquímica.

Los trabajos realizados sobre el estudio de sistemas hidrotermales han tenido varios matices, tales como: 1) fuentes alternas de energía (Lund et al., 2005), 2) depositación de minerales en el fondo del mar tales como óxidos, sulfuros y metales preciosos (Pichler y Veizer, 1999; Herzig y Hannington, 2000; Prol-Ledesma et al., 2002; Canet et al., 2005a, b), y 3) Estudio de comunidades biológicas adaptadas a vivir en condiciones extremas de temperatura y oxígeno (Tunnicliffe, 1992; Cardigos et al., 2005; Tarasov, et al., 2005). Todos estos mecanismos anteriormente citados son controlados por la variabilidad química de los fluidos. Por tal motivo es imprescindible conocer la composición química de los

fluidos descargados que se descargan en estos sistemas hidrotermales (German y Von Damm, 2004).

La caracterización adecuada de las especies químicas apoya al entendimiento de procesos geoquímicos y geomicrobiológicos tan complejos como los que suceden en los sistemas hidrotermales. Las descargas hidrotermales ocurren en zonas submarinas e intermareales, como es el caso del presente estudio, tienen una fuerte componente de agua de mar. La composición química del agua de mar es primordialmente iones sodio y cloruros (Libes, 2009) en mayor proporción que los otros cationes principales en el agua de mar (calcio, magnesio, potasio). Por lo que las interferencias de sodio son muy grandes e imposibilita una determinación precisa de los otros cationes.

El objetivo de este trabajo es el *desarrollo y validación de metodologías adecuadas para el análisis de los iones: Bicarbonato, Litio, Sodio, Potasio, Magnesio y Calcio*, de los sistemas hidrotermales de Bahía Concepción, Baja California Sur, tomando como base las siguientes técnicas:

- Cromatografía iónica para la determinación de cationes (calcio, litio, potasio, magnesio y sodio), modificando la metodología ya existente para mejorar la cuantificación con la mejor exactitud y precisión posibles. Para ello, se modifican aquellos factores que influyen en la técnica, eligiendo las mejores condiciones.
- Volumetría para la determinación de bicarbonato en campo, tratando de minimizar el volumen de la muestra a analizar y la cantidad de reactivo utilizado, mediante una titulación directa y titulación por retroceso.

Para lograr esto, se toman en cuenta las características de la muestra, las ventajas y desventajas de los métodos elegidos, estableciendo las metodologías desde la toma de muestra, adecuación, calibración para el caso de cromatografía iónica y la validación de cada sistema.

Para hacer una mejor verificación en el caso de la cromatografía iónica, se utilizan técnicas alternativas para respaldar los estándares empleados para la calibración, así como la cuantificación de los cationes en las muestras. Para este fin se emplean las técnicas de volumetría por complejos para la cuantificación de calcio y magnesio, así como la flamometría o fotometría de flama para litio, sodio, potasio y calcio.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

En el presente capítulo se presenta una revisión breve de los fundamentos químicos de las metodologías utilizadas (volumetría ácido-base, cromatografía iónica y fotometría). En la parte de volumetría se anexa una explicación del sistema de carbonato/bicarbonato/ácido carbónico, especies analizadas en el sistema de estudio. Se presenta una descripción detallada de lo que es desarrollo experimental, proceso estadístico empleado para evaluar los parámetros importantes en el establecimiento de la metodología de la determinación de carbonato/bicarbonato en campo. Asimismo, se anexa una explicación general sobre la validación y conceptos relacionados con el tema, la cual consta de herramientas estadísticas que servirán para sustentar los resultados de los análisis químicos de las muestras. Finalmente se describe brevemente lo que es un sistema hidrotermal para entender las características de las muestras analizadas.

## **2.1 Fundamentos de las técnicas.**

### **2.1.1 Volumetría: ácido – base y complejos**

Un análisis volumétrico “es un proceso por medio del cual se realiza la determinación cuantitativa de una especie en disolución, mediante la adición sucesiva de cantidades conocidas de titulante, capaces de intervenir juntos en una reacción completa, definida y rápida” (Villanueva G., 2006). Al hablar de análisis volumétrico, implica entender el concepto de punto de equivalencia y punto final de una titulación. El punto de equivalencia hace referencia a una reacción completa entre el titulante y el analito (Harris, 2007), mientras que el punto final se presenta cuando existe un ligero exceso del titulante y se presenta un cambio en las propiedades fisicoquímicas de la disolución (cambio de pH, conductividad o color). Regularmente, se utiliza un indicador para la detección del punto final (Vogel, 1978). La diferencia entre el punto de equivalencia y el punto final se

conoce como error de titulación y puede corregirse mediante el empleo de un blanco (Harris, 2007).

El éxito de una titulación depende de varios factores, entre ellos el conocimiento de la concentración del agente titulante con la mayor exactitud y precisión posible. El titulante puede prepararse mediante dos procesos: mediante pesada directa del compuesto seco, o por una medición aproximada (Villanueva G, 2006). En el segundo caso, es necesario llevar a cabo una normalización mediante el empleo de un patrón primario, que presenta estabilidad a las condiciones de trabajo, así como una alta pureza (Harris, 2007). De esta manera, puede establecerse su concentración con su incertidumbre asociada (Anexo 7.4).

Existen varios tipos de valoraciones: de neutralización (ácido – base), complejométricas, de precipitación y de óxido reducción. A continuación se explicarán los dos tipos de valoraciones empleadas en este trabajo.

#### *Reacciones de neutralización (titulaciones ácido – base)*

Una titulación basada en reacciones de neutralización, busca el volumen de ácido (o base) necesario para neutralizar al analito básico o ácido, como se muestra en la siguiente ecuación:



Cuando los ácidos y bases implicados en la valoración son electrolitos fuertes, entonces la titulación da como resultado un pH neutro a la equivalencia; pero cuando se trata de electrolitos débiles, la disolución resultante tendrá un pH básico o ácido (Harris, 2007). Esto puede establecerse teóricamente mediante las constantes de disolución o de hidrólisis, lo que da lugar a un pH a la equivalencia. La determinación teórica de este pH puede dar lugar a la elección correcta del indicador ácido base para una titulación específica (Harris, 2007). El punto final de

una titulación ácido – base, puede detectarse con indicadores coloridos, que son ácidos o bases débiles orgánicos, cuyas distintas formas cambian de color dependiendo del pH (Tabla 1).

**Tabla 1.** Algunos indicadores ácido - base. El intervalo de pH indicado es aquél en el que el compuesto sufre un cambio de coloración dependiendo de su estado.

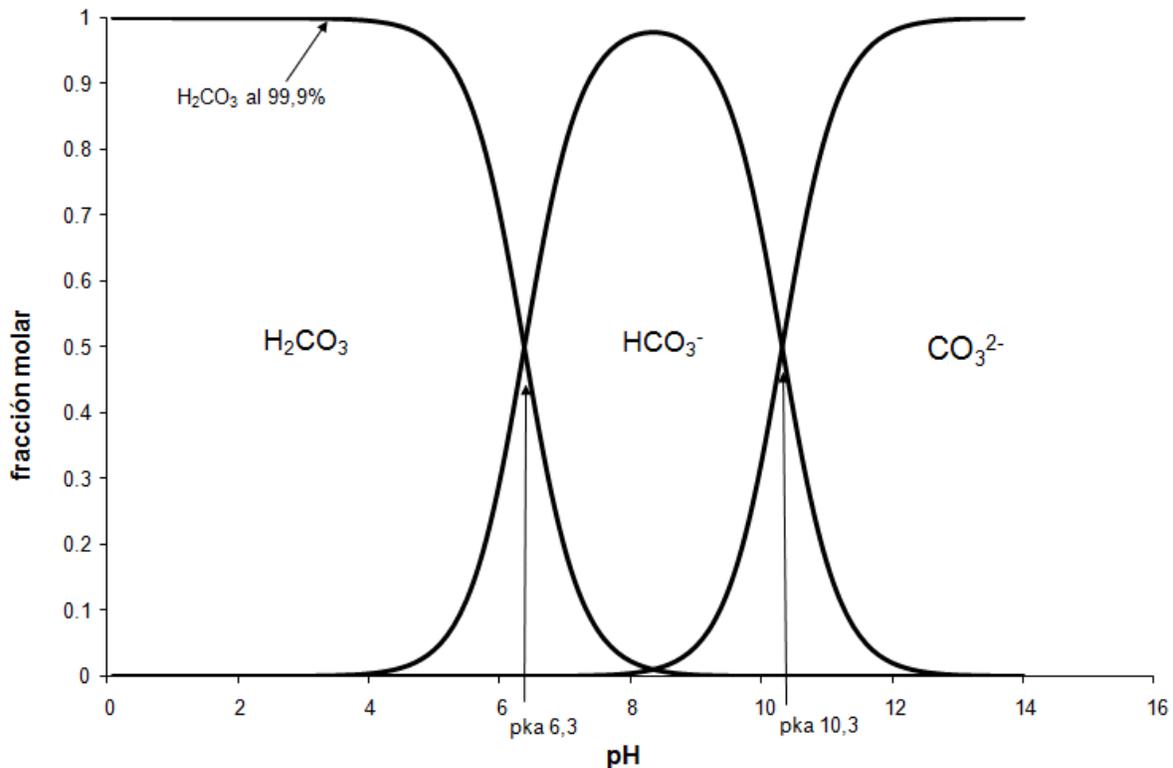
Indicador	pH de vire	Color a pH ácido	Color a pH básico
Anaranjado de metilo	3,1 – 4,4	Rojo	Amarillo
Rojo congo	3,0 – 5,0	Azul	Rojo
Rojo de metilo	4,2 – 6,2	Rojo	Amarillo
Verde de bromocresol	3,8 – 5,4	Amarillo	Azul
Rojo de fenol	6,8 – 8,0	Amarillo	Rojo
Fenolftaleína	8,0 – 9,6	Incoloro	Rosa
Azul de timol	8,0 – 9,6	Amarillo	Azul
Timolftaleína	8,3 – 10,5	Incoloro	Azul

Además del uso de indicadores, el punto de equivalencia puede buscarse mediante el empleo de medidores de pH, el cual sufre un cambio súbito cuando pasa a través del punto de equivalencia. El cambio de pH depende de las características de los ácidos y bases involucrados, como es su fuerza relativa, además de las constantes de ionización (ácidos monopróticos o polipróticos).

#### *Sistema $H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$*

Los carbonatos son especies químicas importantes para caracterizar un sistema hidrotermal, por lo cual se explicará brevemente la determinación de estas especies químicas. El sistema  $H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$  presenta tres especies y dos constantes de acidez: el  $H_2CO_3$  se comporta como un ácido débil, el  $CO_3^{2-}$  como una base débil, mientras que el  $HCO_3^-$  tiene la propiedad de ser un anfótero, es decir, puede comportarse como un ácido o una base.

En el caso de la titulación volumétrica para el ión bicarbonato, se lleva a cabo una reacción de tipo ácido base entre una base débil y un ácido fuerte. El comportamiento de la curva de titulación va a depender de la fuerza del ácido y de las bases involucradas (Harris, 2007). Existen cuatro regiones diferentes que se muestran en el diagrama de distribución de especies (Fig. 1).



**Figura 1.** Diagrama de distribución de especies  $H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$  a 25 °C en función del pH. Para trazar el diagrama se tomaron en cuenta las fracciones molares a lo largo del rango de pH; nótese que para las especies de carbonato se presentan dos pKa diferentes: el primero (6,3), corresponde a una igualdad de concentraciones entre las especies  $HCO_3^-/H_2CO_3$ , mientras que para el segundo (10,3) la igualdad de concentración se da entre  $CO_3^{2-}/HCO_3^-$ .

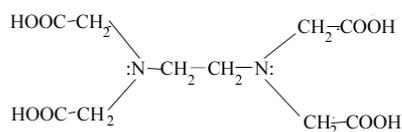
A partir de dicho diagrama, y mediante la determinación del pH presente en la muestra a analizar, pueden conocerse teóricamente las concentraciones de dichas especies. Esto es importante para determinar el equilibrio que predomina para la elaboración de la metodología específica a emplear sobre las muestras, ya que de eso depende el tipo y la concentración del titulante y el indicador, así como la cantidad de muestra a emplear durante el análisis.

*Titulación complejométrica: EDTA.*

Una reacción complejométrica con un ión involucra el desplazamiento de una o más moléculas de disolvente coordinadas por otros agentes nucleofílicos (Harris, 2007). La estabilidad de dichos complejos depende de la habilidad para formar complejos del ión metálico, así como las características físico – químicas del ligando (Vogel, 1978).



El EDTA, o ácido etilendiaminotetraacético (Fig.2), es un compuesto capaz de producir complejos en proporción uno a uno con la mayoría de los iones metálicos (Vogel, 1978). Como su nombre lo indica, el EDTA presenta propiedades ácido base, comportándose como un sistema hexaprótico, en el cual seis de sus átomos se presentan como donadores. La sal disódica, denotada como  $Na_2H_2Y$ , da lugar a la especie soluble  $H_2Y^{2-}$ , la cual es la responsable de dar complejos en proporción 1:1 en disolución (Harris, 2007).



**Figura 2.** Estructura del EDTA.

El EDTA presenta diferentes constantes de estabilidad en cuanto a complejos con diferentes iones metálicos (Harris, 2007), lo que es de utilidad al momento de realizar la cuantificación de un ión en presencia de otro. A su vez, dichas constantes de ven modificadas por la variación del pH de la disolución debido a las características ácido – base del ligando, la presencia de otro agente quelante y las constantes de solubilidad de los iones metálicos (Harris, 2007).

Las titulaciones con EDTA pueden realizarse de modos diferentes (Harris, 2007):

- Titulación directa: la disolución es ajustada a un pH óptimo, para luego agregar EDTA como agente titulante.
- Titulación indirecta: es aquella en la que el agente quelante es agregado en exceso, después se ajusta el pH y se titula el exceso con otro ión metálico (en el caso de EDTA se utiliza generalmente una disolución de zinc).
- Por reemplazo o sustitución: ésta se aplica cuando el ion reacciona insatisfactoriamente con el ligando. En tal caso un complejo metálico es reemplazado por uno más estable.
- Alcalinométrica: en este caso los iones hidronio liberados por la formación de complejos metálicos pueden ser valorados con soluciones alcalinas (Harris, 2007).

Las titulaciones complejométricas se cuantifican mediante la detección del punto final por indicadores ión metálicos, los cuales pueden reaccionar de manera selectiva y, al igual que los empleados para titulaciones ácido – base, deben presentar una buena estabilidad y un cambio de color apreciable.

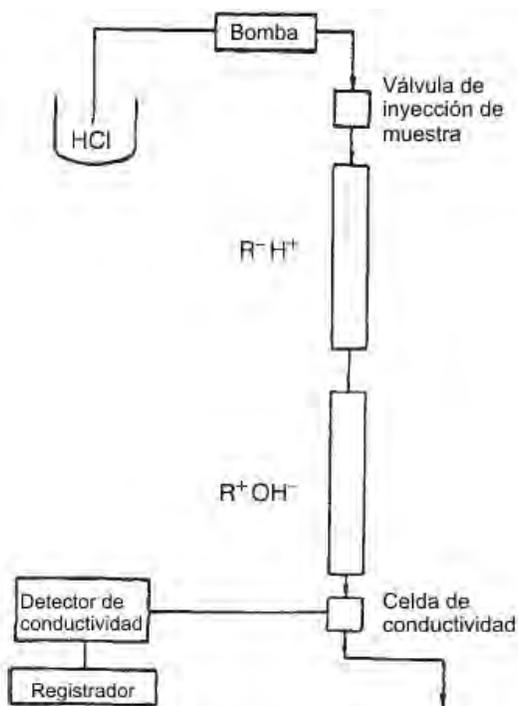
### **2.1.2 Cromatografía iónica**

La cromatografía es un “proceso físico- químico de separación” (Rouessac, 2003), que permite la determinación y cuantificación analitos presentes en una muestra. El sistema cuenta con dos fases: una fase móvil, la cual arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria, en donde se lleva a cabo la separación de los analitos. La composición de ambas fases depende de las características de los analitos que se desean separar así como la concentración esperada. La naturaleza tanto de las fases como de los analitos y su interacción determinan el tiempo de retención en la fase estacionaria. La cromatografía puede clasificarse

dependiendo de las características de la fase móvil y la estacionaria, dando lugar a una gran variedad de tipos y aplicaciones (Rouessac, 2003).

La cromatografía iónica es una variante de la cromatografía de líquidos de alta resolución, en donde los analitos iónicos son separados por sitios aniónicos o catiónicos de la fase sólida (Fritz, 2009), lo que permite la cuantificación simultánea de aniones o cationes. La retención se basa en la afinidad de los analitos iónicos por los sitios de intercambio de baja capacidad de la columna y puede ser alterado por el pH y la fuerza iónica de la fase móvil. Por ejemplo, cuando se utiliza un pH ácido para la cuantificación de cationes, la detección se realiza de forma indirecta, ya que la conductividad total decrece cuando el analito pasa por el detector (Rouessac, 2003). Se conocen dos diferentes tipos de cromatografía iónica: la que maneja un sistema supresor, y la que no lo utiliza (Papadoyannis, 2005).

De forma similar a la cromatografía de líquidos, la cromatografía iónica sin supresión se compone de: un sistema de inyección de muestra, desde el cual ésta es arrastrada por la fase móvil a través del cromatógrafo; un sistema de bombeo, que regula la presión y el flujo de la fase móvil, lo cual puede considerarse como un factor mecánico de separación de analitos; un horno para la columna (fase estacionaria), en donde la misma se encuentra conectada al sistema para que fluya la fase móvil y se controla la temperatura y, por último, un sistema detector, que puede basarse en la conductividad (Fig. 3).



**Figura 3.** Composición general de un cromatógrafo de iones. La fase estacionaria es un intercambiador iónico de baja capacidad, y su carga depende del análisis (cationes o aniones). Tomado y traducido del Fritz, 2009. La fase móvil se mueve a través del sistema pasando por una bomba que regula la presión y la velocidad; pasa por la válvula de inyección y arrastra la muestra hacia la fase estacionaria, donde se lleva a cabo un intercambio iónico débil para retener a los iones. Posteriormente avanza hacia la celda y sale del sistema; el detector de conductividad obtiene una señal que pasa finalmente al registrador.

El detector de conductividad se utiliza para la cuantificación de especies ionizadas, tanto inorgánicas como orgánicas. Se emplean acompañados de columnas de intercambio iónico de baja capacidad.

Los métodos cromatográficos, incluyendo la cromatografía iónica, son definidos por una serie de parámetros que establecen el grado de adecuación del sistema para la cuantificación de analitos. Algunos de ellos son:

- Número de platos teóricos: éste parámetro es auxiliar para estimar la eficacia de una columna. Este depende del soluto elegido y de las condiciones de operación (Rouessac, 2003) y se calcula como sigue:

$$N = 16 \frac{t_R^2}{w^2} \quad [1]$$

$t_R$  = tiempo de retención

$w$  = anchura de la base del pico

- Altura del plato: la altura equivalente a un plato teórico (H), se calcula para compuestos de referencia y permite comparar las eficiencias de diferentes columnas (Rouessac, 2003):

$$H = \frac{L}{N} \quad [2]$$

L = longitud de la columna

N = número de platos teóricos

- Tiempo de retención: representa el tiempo ( $t_R$ ) que transcurre desde el momento de la inyección hasta que el pico en el cromatograma alcanza su punto máximo (Rouessac, 2003).
- Tiempo muerto: tiempo que tarda un analito no retenido por la fase móvil en llegar al detector y emitir una señal ( $t_M$ ). En el caso de cromatografía iónica, pueden tratarse de los iones de la fase móvil (Rouessac, 2003).
- Factor de retención o factor de capacidad ( $k$ ): cuando el analito se pone en contacto con la fase estacionaria, una parte queda en la fase móvil y otra se adhiere a la fase estacionaria; estas cantidades permanecen constantes y su coeficiente puede calcularse experimentalmente por:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad [3]$$

$t_M$  = tiempo muerto

$t_R$  = tiempo de retención

Este parámetro es uno de los más importantes para definir el comportamiento de una columna, ya que define su capacidad de retención de la columna por el analito (Rouessac, 2003).

- Factor de separación o selectividad entre dos analitos ( $\alpha$ ): precisa las posiciones relativas entre dos compuestos, brindando una visión acerca del empalme entre los picos cromatográficos (Harris, 2007):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad [4]$$

$k_1, k_2$  = factor de capacidad

- Factor de resolución entre dos picos ( $R$ ): este factor define si una separación entre dos picos es más o menos buena (Harris, 2007):

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \quad [5]$$

$t_{R2}, t_{R1}$  = Tiempo de retención

$w_1, w_2$  = ancho de la base del pico

Cuando se desarrolla un método analítico, los parámetros más importantes a considerar son la resolución y el tiempo de elución (Rouessac, 2003), ya que un método bien elaborado debe permitir una buena cuantificación de los analitos en un periodo mínimo de tiempo.

La cuantificación de un analito en cromatografía puede realizarse de varias formas. En el método de estándar externo, el equipo se calibra con anterioridad obteniendo una relación entre la concentración del analito y la respuesta del equipo. El método por adición estándar, implica la adición de concentraciones conocidas del analito a la muestra para obtener la concentración del analito de la muestra por diferencia (Harris, 2007). La elección del método dependerá tanto de las concentraciones del analito en la muestra, del tipo de matriz, así como de la comodidad del mismo.

Para la calibración del equipo, es necesario establecer una curva concentración respuesta utilizando como un mínimo cinco niveles diferentes de concentración dentro del intervalo deseado. Cuando un equipo es calibrado con anticipación, un programa específico para el equipo puede guardar la información acerca de las curvas de calibración para que sean empleadas en determinaciones posteriores. La relación entre las concentraciones y las respuestas del equipo generalmente son de tipo lineal (Harris, 2007), y la ecuación que la describe es del tipo:

$$y = mx + b \quad [6]$$

y = respuesta analítica

m = pendiente

b = ordenada al origen

x = concentración

A partir de dicha relación, es posible la cuantificación de una muestra problema, siempre y cuando se encuentre dentro del intervalo determinado, en donde la relación entre la concentración y la respuesta está verificada, ya que si el valor sale del intervalo, no hay forma de conocer si la relación sigue siendo lineal y conserva la pendiente (Harris, 2007)

### **2.1.3 Fotometría**

La espectroscopía de emisión de flama, o fotometría de flama, se basa en la excitación de un átomo en estado libre hacia un nivel mayor de energía mediante el aumento de la temperatura, la cual es emitida como radiación cuando el átomo regresa a su estado basal. Los estados de energía potencial se encuentran definidos de forma específica para cada átomo y dependen de su configuración electrónica (Jenway, 2008). Dichas emisiones se encuentran en un intervalo reducido de longitud de onda.

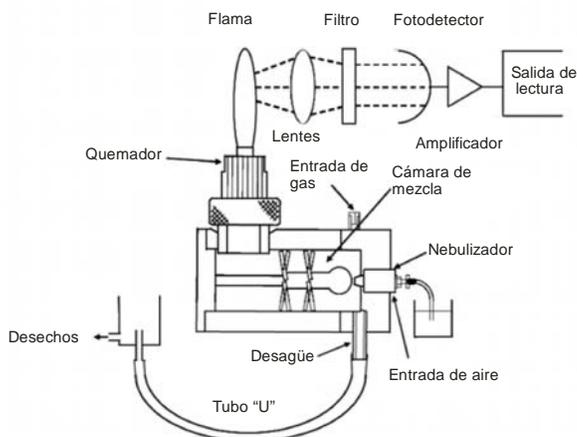
Cuando un átomo metálico es puesto en contacto con una flama, ocurren los siguientes pasos (Vogel, 1978):

1. Evaporación del solvente.
2. Vaporización del sólido con la consecuente disociación de sus átomos en estado basal.
3. Algunos átomos se excitan por la energía térmica de la flama a mayores niveles de energía, la cual pueden emitir radiación electromagnética.

La fotometría de flama se emplea para aquellos casos en los que la longitud de onda de emisión se asocia a niveles mayores de energía, que es emitida a una longitud de onda específica.

Un fotómetro de flama simple, como el equipo PFP7 de la marca Jenway utilizado en el presente trabajo se compone de las siguientes partes principales (Jenway, 2008, Fig. 4):

- Un quemador, en donde la flama puede permanecer a una temperatura y forma constantes,
- una cámara de nebulización y mezcla,
- filtros de un solo color para evitar interferencias, y
- un fotodetector.



**Figura 4.** Partes constitutivas de un flamómetro (tomado del manual de uso del equipo, Jenway, 2008).

En cuanto a la cuantificación de los elementos, los equipos utilizados están diseñados para manejar concentraciones a cuya intensidad de emisión presenta una respuesta proporcional. La técnica de fotometría de flama presenta dos principales ventajas para la cuantificación de metales alcalinos y alcalinotérreos (Jenway, 2008); sus átomos son excitados a una temperatura relativamente baja y sus longitudes de onda de emisión pueden ser fácilmente aisladas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Longitud de onda a la que emiten los metales alcalinos y alcalinotérreos. En el caso del calcio, se mide la longitud de onda considerando la banda de emisión del hidróxido de calcio, ya que la emisión atómica del calcio ocurre a los 423 nm (tabla tomada del manual de uso del PFP7, 2008).

Elemento	Onda de emisión (nm)	Color de flama
Sodio (Na)	589	Amarillo
Potasio (K)	766	Violeta
Bario (Ba)	554	Verde lima
Calcio (Ca)	622	Naranja
Litio (Li)	670	Rojo

Dentro de un intervalo de concentración, el número de átomos excitados es proporcional a la intensidad de la emisión. Por tanto, este método puede emplearse alternativamente para la cuantificación de algunos iones, brindando un respaldo hacia los métodos aquí establecidos.

## **2.2 Desarrollo analítico**

### **2.2.1 Introducción**

Un método analítico es la descripción de los pasos a seguir para llevar a cabo el análisis de una muestra en específico, e incluye tanto los materiales, el equipo y los parámetros a emplear durante el mismo (Navidi, 2006). De acuerdo a las

características de la muestra a analizar, así como la concentración esperada de los analitos, debe escogerse el instrumento más adecuado para realizar la medición. Un método debe de asegurar un análisis confiable para la muestra, además de mostrar especificidad para el analito, evitando las interferencias que puedan llegar a presentarse.

El desarrollo de un método analítico puede involucrar la adaptación de un método existente a una nueva aplicación (CENAM, 2005); a su vez, puede establecerse a través de procesos de ensayo y error basados en el conocimiento del analista tanto de la matriz como del sistema analítico (Rodríguez, 2009). Una de las herramientas empleadas para el desarrollo de métodos, es el establecimiento de un modelo estadístico que tome en cuenta aquellas variables que se consideren críticas para la obtención del resultado, permitiendo el establecimiento de las condiciones de una manera más rápida y sencilla.

Tanto el número como el tipo de variables dependerán del método analítico a emplear, además de que deben tomarse a consideración las condiciones de trabajo rutinario en el laboratorio (aquellas que no pueden llegar a modificarse), así como la capacidad de combinar dichas variables de manera sencilla. Dependiendo del número de variables tomadas, se elige el diseño factorial, que aporta una ecuación para la descripción del comportamiento del sistema considerando únicamente las variables establecidas. El diseño factorial no toma en cuenta variables no controlables, lo que puede llegar a traducirse en errores aleatorios.

### **2.2.2 Diseño experimental de 3 factores.**

Un experimento factorial es aquél que presenta un diseño y da lugar a condiciones adecuadas para la metodología, considerando la respuesta deseada.

El experimento puede constar de tantos factores como sean necesarios. Para el caso del presente trabajo se empleó un diseño de 3 factores, utilizando dos niveles, uno bajo y uno alto, descrito como  $2^3$  (Navidi, 2006). De acuerdo a dichos niveles, se establecen diferentes experimentos tomando en cuenta los tres factores (A, B, C), así como la interacción entre ellos, estableciendo el nivel alto como positivo (+1) y el nivel bajo como negativo (-1), y se puede presentar una tabla como la siguiente:

**Tabla 3.** Representación de los experimentos realizados en un diseño  $2^3$ . Obsérvese que una vez establecidos los niveles de los factores A, B, C, como altos (+) o bajos (-), se obtienen los niveles de las interacciones de los mismos para cada caso.

	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	-	-	+	-
3	+	-	+	-	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-	+
5	+	+	-	+	-	-	-
6	-	+	-	-	+	-	+
7	+	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	+	+	+	-

En cada uno de los experimentos es posible describir el grado de relevancia de cada factor, así como sus interacciones mediante un análisis de varianza. Al obtener una respuesta específica para cada experimento, puede obtenerse una ecuación la cual describe el comportamiento general de dichos factores sobre el sistema investigado (Rodríguez, 2006).

Una vez obtenida la ecuación correspondiente (Apéndice 7.3), es posible manipular los valores de los factores para obtener la respuesta deseada. Por ejemplo, el factor A puede establecerse en su valor mínimo mientras que el factor

B puede fijarse en su valor máximo; al sustituir estos valores en la ecuación obtenida, puede tenerse una idea aproximada del valor para la respuesta.

La ventaja de este tipo de desarrollo, es que las variables se manejan en una relación matemática, lo que reduce las pruebas de ensayo y error, en donde cada ensayo arroja un resultado independiente. El establecimiento de los intervalos de trabajo dependerá de la complejidad del sistema analítico, el cual incluye al método y las características particulares de la muestra.

## **2.3 Validación**

### **2.3.1 Importancia de la validación de sistemas analíticos.**

Cuando se hace referencia a la validación de un método analítico, el objetivo a cumplir es obtener resultados confiables; es decir, que se puede tener la certeza que el resultado se encuentra próximo al valor real y por tanto, en el caso particular de este estudio, llevar a conclusiones certeras en cuanto al estudio de una muestra específica. De acuerdo a la IUPAC (García et al., 2002), no sólo se realiza la validación de un método, si no de un sistema analítico, ya que se evalúa el intervalo de estudio (concentraciones) y el tipo de material a evaluar, además del protocolo de la metodología. Estas características se miden mediante la determinación de varios parámetros establecidos para la validación del sistema específico, además de que presentan un rango específico de aceptación.

Antes de hablar de la validación de un sistema, es importante establecer las diferencias que existen entre una calibración y una validación:

- Calibración: procedimiento durante el cual se establecen las relaciones entre la respuesta analítica del método o sistema y la concentración del analito (Harris, 2007).

- Validación: procedimiento por el cual se establece el ajuste de un método o sistema para un análisis específico de acuerdo a parámetros establecidos anteriormente (García, et al., 2002).

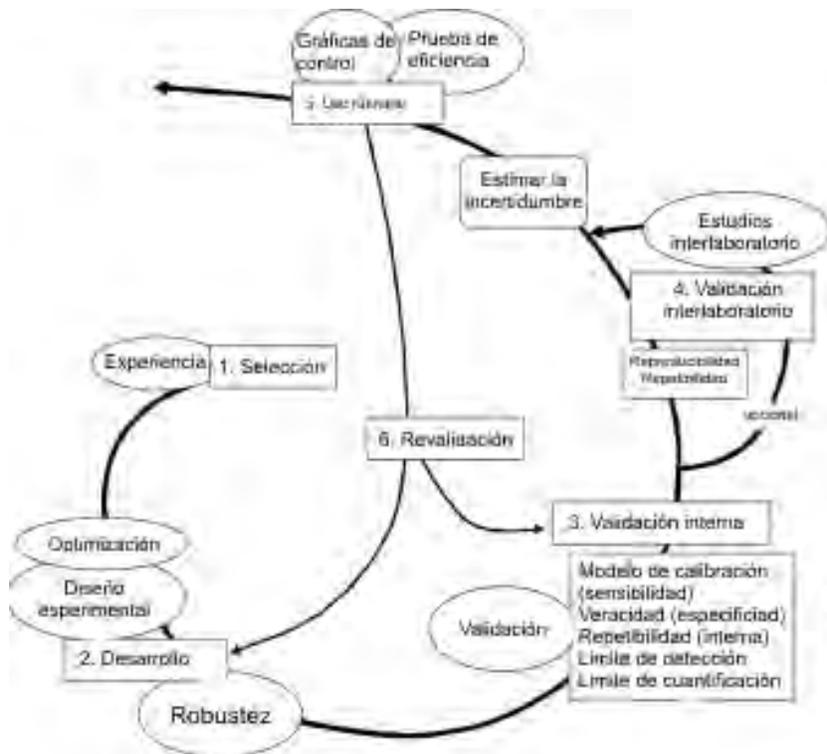
La validación del sistema debe realizarse de manera constante, y cada que el sistema presente un cambio en las condiciones, ya sea por mantenimiento de los equipos, cambio de instrumentos, así como el cambio de lotes para los materiales control o una nueva calibración. Para tener un seguimiento en la validez de los resultados es importante llevar a cabo un control de calidad mediante el empleo de materiales con concentraciones conocidas con cada análisis realizado (material control).

Cuando los resultados del material control no correspondan a lo esperado debe realizarse una nueva evaluación del sistema. Por tanto, debe seguirse un protocolo específico que indique las condiciones del sistema, así como el tratamiento de las muestras previo al análisis y el coeficiente de variación aceptados.

El control del método mediante un protocolo así como la validación del sistema permite que el método sea empleado por cualquier analista capacitado, además de que puede ser reproducido por otro laboratorio que desee llevar a cabo un análisis similar al presentado aquí, tomando en cuenta que los errores sistemáticos pueden diferir por el tipo de equipo empleado, y que los aleatorios dependen tanto de las condiciones normales y no controlables de trabajo (Fritz, 2009).

La validación de un sistema analítico se compone de varios pasos consecutivos que llevan a la cuantificación adecuada de los analitos en las muestras. Dichos pasos se definen como un ciclo de vida del método de acuerdo a la ISO 17025 y que fue plasmado por Feinberg (2007). En la Fig. 5 se observa el esquema

establecido por el autor, señalando las diferentes etapas de la validación de un sistema. Por tanto, debe considerarse a la validación como un proceso dinámico que debe realizarse de manera continua dentro de un laboratorio de análisis.



**Figura 5.** Diagrama de flujo que ilustra el proceso de validación de un sistema analítico, mostrando las etapas críticas (tomado de Feinberg, 2007).

A su vez, un laboratorio debe tomar en cuenta que cada sistema en específico cuenta con diferentes parámetros y diferentes pruebas para validarlo. La Guía de validación (García, et al., 2002), presenta dos tipos de sistemas basados en la naturaleza de la respuesta analítica:

- Métodos fisicoquímicos.
- Métodos biológicos.

Los sistemas empleados aquí incluyen métodos físico – químicos, además, implican la cuantificación el analito. En la bibliografía consultada, la validación hace referencia a la industria farmacéutica, cuyos parámetros de validación deben ser más estrictos debido a las características de la muestra. A pesar de que en el

presente trabajo los sistemas estén destinados al análisis de muestras ambientales, se utilizan los criterios de aceptación de la Guía de validación (García, et al., 2002).

### **2.3.2 Definición de parámetros.**

De manera general, pueden establecerse los siguientes parámetros a analizar durante la validación. Para comprender algunos de ellos, la matriz se refiere a la disolución en la cual se cuantifica el analito; en el caso de muestras de agua ambientales, es importante tomar su efecto, debido a que en ella se encuentran disueltos varios componentes que pueden intervenir en la cuantificación del analito de interés.

#### *a) Linealidad:*

La linealidad mide el grado en que la respuesta analítica a una concentración dada del analito se ajusta a una función lineal. Es decir, la linealidad asegura una proporcionalidad entre la respuesta del sistema y la concentración del analito de interés (CENAM, 2005). La linealidad puede evaluarse tanto para el sistema como para el método (García, et al., 2002).

- Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se mide a través de estándares de concentración conocida, evaluadas dentro de un rango que incluya las concentraciones del analito esperadas en las muestras. En este caso, la linealidad evalúa la concordancia de la concentración con la respuesta analítica, sin tomar en cuenta la matriz de la muestra.

- Linealidad del método.

La linealidad del método se evalúa midiendo el grado de concordancia de la respuesta cuando se encuentra presente la matriz. Para el caso de aquellas muestras en donde la matriz sea compleja, se añaden concentraciones conocidas del analito a una muestra homogénea y se obtiene una función matemática que

describa adecuadamente el comportamiento del sistema. Una vez obtenidas las respuestas, se analiza tanto la linealidad como la cantidad de analito recuperada.

***b) Especificidad:***

La especificidad de un sistema analítico se refiere a su capacidad para obtener una respuesta debida únicamente al analito de importancia. Este parámetro da la certeza de que ningún otro componente en la matriz es capaz de dar una respuesta con el método analítico empleado. Puede evaluarse añadiendo a la matriz una cantidad determinada del compuesto que pueda presentar alguna interferencia (respuesta) y determinar si su presencia afecta la cuantificación del analito de interés.

***c) Precisión:***

La precisión define la concordancia entre los valores obtenidos mediante diferentes ensayos. Esto se da mediante la determinación de la reproducibilidad y la repetibilidad (Merchand, 2008).

- Reproducibilidad: define la relación entre los resultados obtenidos independientemente por distintos laboratorios o analistas. Tiene la característica de que, cuando se introducen variables que modifiquen las condiciones del análisis, se introduce un error aleatorio diferente que asegura la validez del sistema al corroborar que el resultado no es debido al error impuesto en las mismas condiciones.

- Repetibilidad: este parámetro describe el grado de correspondencia entre los valores obtenidos en un mismo laboratorio con un mismo analista, utilizando el mismo método y equipo y con intervalos cortos entre cada medición.

La reproducibilidad se evalúa a través de la precisión intermedia, cuya finalidad es determinar la concordancia entre los valores obtenidos bajo las mismas condiciones por diferentes analistas.

*d) Límite de detección.*

El límite de detección hace referencia a la cantidad mínima del analito que es “significativamente” distinto del blanco (García et al., 2002). Sin embargo, el límite de detección no hace referencia a la concentración que se puede cuantificar. Se dice que para que la cantidad presente una diferencia con el blanco, debe ser tres veces mayor a aquella señal obtenida mediante un blanco (García, et al., 2002).

*e) Límite de cuantificación.*

Al contrario del límite de detección, el límite de cuantificación hace referencia a aquella cantidad del analito que puede ser cuantificable con respecto al blanco, siendo “suficientemente más intensa para medirse con exactitud” (García et al., 2002). A su vez, se define a una señal diez veces mayor a aquella obtenida en el blanco.

Tanto el límite de detección como el de cuantificación se pueden obtener mediante la desviación de la curva de calibración, pero es importante llevar a cabo la comprobación de este límite midiéndola señal de ruido dada por la inyección de varios blancos consecutivos.

*f) Exactitud.*

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor medido experimentalmente y el valor real (CENAM, 2005). De acuerdo a Harris(2007), se puede demostrar de diferentes maneras:

1. Mediante un estándar de referencia, el cual presente una matriz semejante a la encontrada en las muestras. Así, el método deberá definir la concentración certificada del estándar dentro de los límites de incertidumbre del mismo.
2. Comparar métodos analíticos diferentes coincidiendo con una precisión dada.

3. Analizar una muestra de blanco que contenga una cantidad conocida del analito dentro de la misma matriz de las muestras.
4. Por adición estándar de la muestra, obteniendo el porcentaje de recobro del analito.

*g) Robustez.*

La robustez de un método mide su capacidad del sistema para mantener pequeñas variaciones entre las lecturas realizadas deliberadamente para evaluar la confiabilidad en el uso de la metodología de forma rutinaria (Harris, 2007). Estas condiciones deben de ser aquellas que se consideren como críticas para el análisis, como por ejemplo temperatura o volumen de inyección para cromatografía. A su vez, Feinberg (2007), menciona que durante el desarrollo del sistema se mide su grado de robustez, ya que durante éste se prueban los factores que presentan una posible influencia en el desempeño del método.

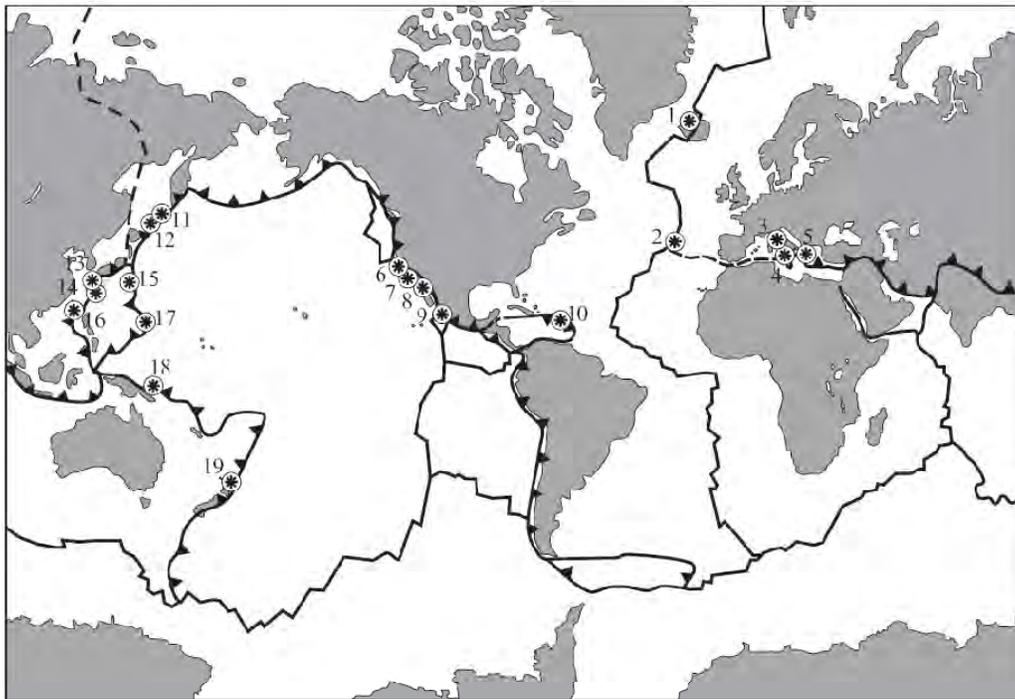
## **2.4 Características de las descargas calientes de Bahía Concepción, Baja California Sur.**

La culminación del estudio de los sistemas hidrotermales comenzó en 1979 cuando se descubrieron descargas de agua caliente en el fondo del mar a una temperatura de hasta 400°C. Estos sistemas hidrotermales se localizan en la Dorsal Rivera, segmento del sistema de dorsales del Pacífico Oriental (EPR, por sus siglas en inglés), frente a las costas de Nayarit a una profundidad de 2500 m (Speiss et al., 1989). En estos sistemas habían depósitos de sulfuros polimetalicos (ricos en Fe, Zn y Cu) y estaban colonizados por comunidades biológicas sujetos a procesos quimiosintéticos.

Además de estas descargas hidrotermales de gran temperatura y profundidad, están las descargas hidrotermales someras. Se define una manifestación somera

como aquella emplazada a 200 m o menos de profundidad (Prol-Ledesma et al., 2005).

En México se hallan manifestaciones hidrotermales someras relacionadas con procesos de la tectónica extensional causante de la apertura del Golfo de California en (Fig. 6): Punta Banda (Vidal y Vidal, 1981) y Bahía Concepción (Prol-Ledesma et al., 2004) en la península de Baja California, y en Punta Mita en el estado de Nayarit (Prol-Ledesma et al., 2002).



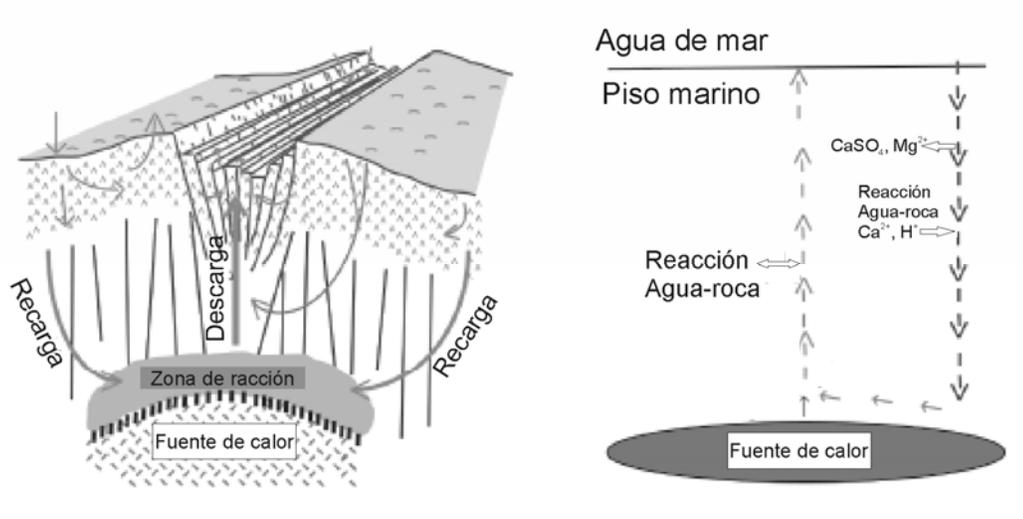
**Figura 6.** Distribución mundial de los sistemas hidrotermales submarinos someros (<200 m de profundidad) (Tomado de Canet y Prol-Ledesma, 2006). (1) Kolbeinsey, Islandia, (2) Las Azores, Portugal, (3) Cabos Palinuro y Messino, mar Tirreno, Italia, (4) Isla Vulcano, islas Eolias, Italia, (5) Islas Santorini y Milos, mar Egeo, Grecia, (6) White Point, California, EUA, (7) Punta Banda, Baja California, (8) Bahía Concepción, Baja California Sur, (9) Punta Mita, Nayarit, (10) Isla Dominica, (11) Rada de Kraternaya, (12) Isla Kunashir, islas Kuriles, Rusia, (13) Bahía de Kagoshima, (14) Islas Tokora e Iwo, (15) Isla Nishino, Japón, (16) Isla Kueishantao, Taiwán, (17) Volcán Esmeralda Bank, Islas Marianas, (18) Puerto de Matupi e islas de Ambitle y Lihir, Papua Nueva Guinea, (19) Bahía Plenty, Nueva Zelanda.

El fluido descargado en las manifestaciones hidrotermales submarinas someras es de tipo gasohidrotermal (Tarasov et al., 2005), porque está compuesto de agua y gas. Generalmente la fase gaseosa está constituida en su mayor parte de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y nitrógeno (N<sub>2</sub>), aunque algunas veces se encuentra en menor proporción metano (CH<sub>4</sub>) y ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Descripción de algunas manifestaciones hidrotermales submarinas someras localizadas en mares mexicanos.

Localidad	Profundidad (m)	Temperatura de descarga (°C)	Descripción del fluido hidrotermal
Punta Banda, México (Vidal y Vidal, 1981)	40	105	Los gases están compuestos de igual proporción de N <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> . El fluido hidrotermal es rico en SiO <sub>2</sub> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Ca, K, Li, B, Ba, Rb, Fe, Mn, As y Zn.
Bahía Concepción, Baja California Sur, México (Prol-Ledesma et al., 2004)	5-15	85	El agua termal está enriquecido en Ca, Mn, Si, Ba, B, As, Hg, I, Fe, Li, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y Sr. La fase gaseosa está enriquecida en CO <sub>2</sub> y N <sub>2</sub> con trazas de CH <sub>4</sub>
Punta Mita, Nayarit, (Prol-Ledesma et al., 2002)	10	85	Los gases presentes en mayor proporción son: N <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> . El fluido está enriquecido en Ca, I, Mn, Cs, Ba y Si.

Un sistema hidrotermal (Fig. 7) representa la circulación de alguna recarga local (agua meteórica o agua de mar), la cual está sujeta a un gradiente geotérmico (en promedio 30°C/km) y reacciona con las rocas con las que tiene contacto, cambiando así las propiedades químicas del fluido original. Por medio de fallas o fracturas el fluido asciende a la superficie, mezclándose con agua superficial y precipitando minerales.



**Figura 7.** Ilustración de un sistema hidrotermal (modificado de German y Von Damm, 2004). Durante la recarga los fluidos son calentados progresivamente. Aproximadamente a los 130°C, la anhidrita ( $\text{CaSO}_4$ ) precipita como resultado de la reacción de la roca con el agua: el calcio proviene de lixiviar el agua con la roca y el sulfato es de origen marino. Por otro lado el magnesio disuelto es adicionado a la roca y se liberan protones.

Los sistemas hidrotermales de poca profundidad llegan a tener temperaturas entre los 10° y los 119° C, con una temperatura para el sedimento arriba de los 95,8° C (Tarasov, 2005) y, dependiendo de factores como la actividad tectónica, su profundidad de filtración y la temperatura, varían en sus características químicas. Generalmente la cantidad de sales en las descargas hidrotermales varían del 3 al 50% (w/w) (Villanueva E., 2008), considerándose como especies químicas principales los iones de calcio, potasio, magnesio, sodio y bicarbonato, (Villanueva E., 2007), cuyas concentraciones dependen de las interacciones agua – roca (Villanueva E., 2008).

Es importante determinar el contenido de iones disueltos en las descargas hidrotermales para poder inferir el tipo de agua que se descarga (neutra clorurada, bicarbonatada-sódica, ácida sulfatada, ricas en sulfatos y cloruros). Además se utiliza su concentración para poder estimar la temperatura del reservorio de un sistema hidrotermal usando geotermómetros catiónicos (Na, K, Ca, Mg y Li).

Adicionalmente el litio, junto con el boro, se utiliza para caracterizar aguas de una fuente común. El calcio nos da información de la saturación de carbonato de calcio en el fluido, así como la temperatura, ya que la calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) presenta solubilidad retrógrada. Por el contrario, el fluido hidrotermal carece de magnesio porque se precipita a mayor temperatura, además de que con la concentración de magnesio se puede estimar la concentración del fluido antes de mezclarse con agua de mar (en el reservorio).

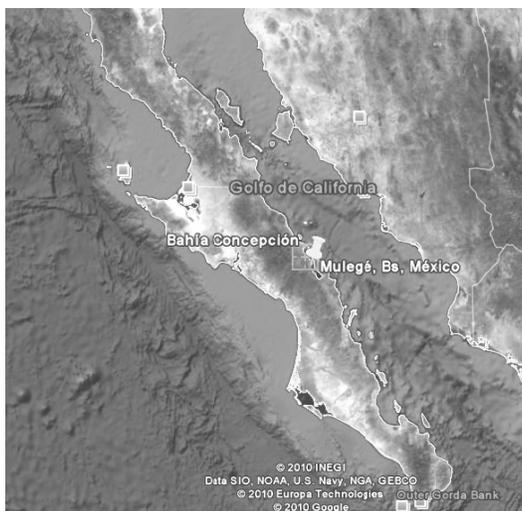
A su vez, determinar la concentración de bicarbonato en sistemas naturales es importante porque en muchos casos es el ion dominante. Por ejemplo el contenido de bicarbonatos se determina en ríos, aguas meteóricas, sistemas hidrotermales, y da una idea de la interacción del fluido con la roca. En el caso del bicarbonato, éste se origina por la disolución de calcitayplagioclasa en rocas expuestas al intemperismo químico en continentes (Faure, 1991). Toda esta información sirve de base para el estudio de los procesos geoquímicas que se llevan a cabo en los sistemas hidrotermales.

## **2.5 Características de Bahía Concepción, Baja California Sur, México.**

Bahía Concepción, es una bahía semicerrada localizada en la costa este de la península de Baja California Sur (Fig.8). Se encuentra situada en las coordenadas  $26^{\circ}55'$  y  $26^{\circ}30'$  latitud Norte y  $112^{\circ}00'$  y  $111^{\circ}40'$  longitud oeste con una extensión de 40 km de largo (Blanco, 2007). Bahía Concepción pertenece al municipio de Mulegé, el cual cubre el 42,8 % de la superficie territorial del Estado, dentro de la zona conocida como la Sierra de la Giganta, una de las subprovincias fisiográficas de Baja California.

El territorio de Baja California Sur cuenta con un 10% de humedad como promedio anual (Rodríguez A., 2009), lo que da lugar a un clima muy seco la mayoría del año, con una temperatura media anual de 18 a  $22^{\circ}$  C(Blanco, 2007), registrándose

temperaturas máximas en los meses de julio y agosto, mientras que las más bajas se presentan en el mes de enero. Las lluvias se presentan de forma estacional, generalmente entre junio y octubre (Rodríguez A., 2009), y la precipitación anual promedio es menor a 200 mm.



**Figura 8.** Mapa del territorio de Baja California Sur, México, con la localización aproximada de Bahía Concepción (Imagen tomada de Google earth).

La zona presenta una vegetación propia de las zonas áridas, además de matorrales, así como una gran variedad de aves y reptiles, además de mamíferos como conejos, borrego cimarrón, venados, entre otros.

En cuanto al suelo, la región se encuentra constituida en su mayoría por rocas de origen volcánico. Las descargas hidrotermales de la costa presentan una temperatura entre 40 y 87 °C (Villanueva E., 2008), los cuales se encuentran en el borde occidental de la Bahía, debidas principalmente a zonas de subducción, donde los movimientos de las placas tectónicas por convección provocan una abertura en las capas, lo que propicia las descargas de fluidos de alta temperatura (Villanueva E., 2007).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

Para cumplir con el objetivo planteado en el Capítulo I, fue necesario seguir una secuencia ordenada, ya que los resultados de la primera etapa del trabajo (desarrollo del método), son de vital importancia para llevar a cabo la culminación del mismo (emisión de resultados). Por ello, se llevó a cabo la siguiente secuencia:

1. Obtener las condiciones óptimas de trabajo en las técnicas empleadas (volumetría y cromatografía iónica), para establecer las características de cada una para que el sistema analítico seleccionado sea el más adecuado para los analitos a cuantificar y, que dicha cuantificación sea la mejor posible.
2. Realizar la validación de los sistemas analíticos obtenidos, estableciendo los criterios adecuados a cada técnica conforme a lo establecido y aclarando aquellos parámetros que difieran de ello. Aunque no se han encontrado referencias en cuanto a la validación de los métodos para las muestras a analizar aquí, se considera que los criterios encontrados pueden aplicarse de forma general (García et al., 2002), cuando se considera a la cromatografía de líquidos y volumetría.
3. Analizar las muestras de interés, indicando la incertidumbre de cada uno de los resultados obtenidos, para conocer el grado de confiabilidad que se obtuvo por medio de los métodos desarrollados, respaldando lo obtenido a través de la validación del sistema.
4. Discutir los resultados obtenidos para las muestras de acuerdo a su origen, y así poder establecer diferencias entre ellas que permitan llegar a la meta de su análisis.

En este trabajo se especifican los pasos seguidos para los diferentes análisis realizados, desde el fundamento de la técnica hasta la validación, pasando por el tratamiento de la muestra antes de la cuantificación, así como los resultados finales.

### **3.1 Cuantificación de bicarbonato en muestras de agua hidrotermal**

#### **3.1.1 Volumetría directa: Descripción del sistema**

Para conocer la concentración de bicarbonato presente en la matriz a analizar, primero se determinó el pH de la muestra para estimar la especie química que predomina; de acuerdo a datos anteriores (Villanueva E., 2007), el pH de las muestras se espera entre valores de 6,5 y 8,1, lo cual indica que los carbonatos se encuentran predominantemente en forma de bicarbonato (Fig. 1), con porcentajes del 57 al 98 % de prevalencia aproximadamente. A su vez, se ha demostrado que la prueba de presencia de carbonato con fenolftaleína (NMX, 2001) en este tipo de muestras resulta negativa, por lo que la presencia del ión  $\text{CO}_3^{2-}$  puede ser despreciada (Villanueva E., 2007).

Por tanto, la cuantificación de bicarbonato puede realizarse seleccionando como agente titulante un ácido fuerte (ácido clorhídrico) para llevar la especie de bicarbonato a ácido carbónico, asimismo el indicador a utilizar en la titulación debe tener un cambio de vire cuando la reacción se lleve a cabo de forma cuantitativa (99.9%), aproximadamente a un pH de 3,3. La reacción de titulación se lleva a cabo de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 5.

De acuerdo a esta ecuación, y, considerando la ecuación de Charlot, con la se puede calcular pH para ácidos y bases tanto para débiles como fuertes y soluciones amortiguadoras, basada en el equilibrio entre ácidos y bases (Sandoval, 2008) puede trazarse una curva de titulación como la presentada en la Figura 9.

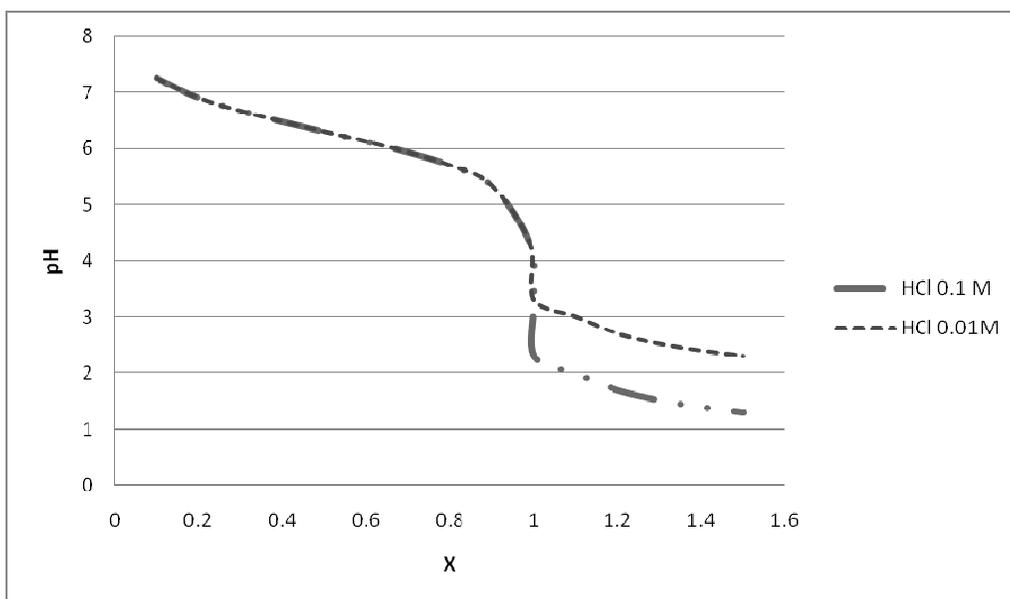
**Tabla 5.** Variación de especies en una titulación volumétrica del ión bicarbonato con un ácido fuerte (HCl). Se muestran las especies predominantes en una reacción de titulación conforme avanza la reacción.

$\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$				
Inicio	Co			Antes de que el ácido sea añadido. Sólo existe la base débil, que también es un anfolito  $\text{pH} = \frac{1}{2}(\text{pka}_1 + \text{pka}_2). \quad [7]$
Antes del punto de equivalencia	Co (1-x)	$\epsilon\text{Co}$	xCo	Existe una mezcla entre la base débil y su ácido conjugado.  $\text{pH} = \text{pka}_1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \quad [8]$
En el punto de equivalencia	$\epsilon\text{Co}$	$\epsilon\text{Co}$	Co	La base débil se ha convertido a su ácido conjugado, por lo tanto, el punto de equivalencia presenta un pH ácido.  $\text{pH} = \frac{1}{2}(\text{pka}_1 - \log\text{Co}) \quad [9]$
Después del punto de equivalencia	$\epsilon\text{Co}$	Co (x-1)	Co	El ácido fuerte es el que determina al pH, por lo que el ácido débil puede ser despreciado.  $\text{pH} = -\log[H^+] \quad [10]$

Co representa la concentración

x representa una cantidad adicionada de titulante.

$\epsilon$  representa una cantidad muy pequeña



**Figura 9.** Curva de titulación de bicarbonato con ácido clorhídrico. La concentración considerada para el ácido se encuentra indicada; x representa la fracción de ácido agregado al analito.

Por tanto, se observa que el pH al punto de equivalencia se encuentra entre valores de 3 y 5, lo cual es tomado en cuenta para la elección del indicador.

### **3.1.1.1 Desarrollo de la metodología: diseño experimental de 3 factores.**

Para realizar el método de titulación, pueden emplearse varios instrumentos, entre los que se encuentran las buretas convencionales de vidrio y las buretas digitales (Harris, 2007), así como diferentes metodologías (titulación directa, por retroceso o por producto). Debe definirse aquella que se apege de una mejor forma al comportamiento teórico de la titulación, así como la obtención de un porcentaje de la reacción mayor al 99,0% para que la cuantificación pueda ser significativa. Por ello, mediante la aplicación del desarrollo analítico, se trabajaron con las variables más importantes para encontrar las mejores condiciones de titulación. Para establecerlas, se toma en cuenta que la determinación se hará al momento de la obtención de la muestra (*in situ*), para evitar la influencia del CO<sub>2</sub> presente en el ambiente, que en un momento dado puede proporcionar una cuantificación errónea del analito (Villanieva E., 2007).

*Variable A: concentración del ácido.*

Como se mencionó anteriormente, el proceso de titulación se realiza mediante un ácido fuerte (ácido clorhídrico), cuya concentración debe guardar una relación con la cantidad esperada en la muestra a fin de ajustar la cuantitatividad del procedimiento. De acuerdo a la bibliografía consultada, la relación de las concentraciones entre el agente titulante y el analito deben ser equivalentes (Harris, 2007). De acuerdo a esto, debe establecerse una concentración del ácido en un valor máximo y un valor mínimo de acuerdo con el diseño especificado, establecidos en concentraciones de  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivamente, ya que el intervalo de concentraciones reportadas de  $\text{HCO}_3^-$  se esperan entre  $0.002$  y  $0.0057 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  aproximadamente, equivalentes a  $122,02$  y  $347,76 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

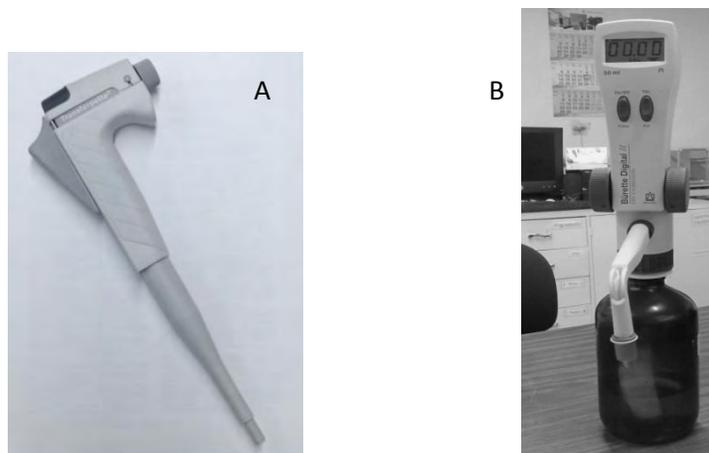
#### *Variable B. Cambio de aparato*

Para la determinación *in situ* de la concentración de bicarbonatos, debe tomarse en cuenta que los aparatos deben presentar resistencia al transporte debido a su empleo en campo, además de la sensibilidad del mismo. Por tanto, se han buscado dos alternativas, como es el uso de una bureta digital de 50 mL, así como el uso de micropipetas de volumen variable de 0,2 mL (Fig. 10). El uso de buretas de vidrio convencionales se ve restringida tanto por la sensibilidad y el transporte, lo cual será discutido más adelante. De acuerdo a la concentración de bicarbonato presente en las muestras (Villanueva E, 2007), la cantidad de ácido que se gastaría partiendo de una muestra de 5,0 mL de manera teórica sería entre 0,07 y 1,23 mL, considerando como concentraciones de HCl  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

#### *Variable C. Cambio de indicador.*

De acuerdo a la reacción teórica analizada anteriormente, el pH del punto de equivalencia se encuentra en  $\text{pH}=3,3$ ; en este punto, el bicarbonato se consume

un 99,9%, por lo cual, se elige el indicador con un valor  $\pm 1$  pH de equivalencia. El anaranjado de metilo tiene un pH de vire que va de 3,1 a 4,4, mientras que el rojo de metilo presenta un cambio de coloración a pH de 4,8 a 6,0 (Tabla 1). Para todos los casos los volúmenes gastados se corrigen mediante la realización de un blanco con agua desionizada.



**Figura 10.** Aparatos utilizados para el desarrollo experimental de un método de cuantificación de bicarbonato por volumetría directa, donde la micropipeta A) es el nivel bajo y B) la bureta digital es el nivel alto.

Por tanto, considerando el método de desarrollo experimental de 3 factores a 2 niveles (Navidi, 2006), se asignan los valores a cada una de las variables de la siguiente manera (Tabla 6):

**Tabla 6.** Asignación de niveles para las variables experimentales para el desarrollo analítico.

Valor	Variable A (concentración del HCl)	Variable B (aparato)	Variable C (indicador)
Alto (+1)	0,1 mmol*L <sup>-1</sup>	Bureta digital 50,0 mL	Anaranjado de metilo
Bajo (-1)	0,01 mmol*L <sup>-1</sup>	Micropipeta 0,2 mL	Rojo de metilo

A partir de ello, se realizaron ocho diferentes experimentos, combinando las tres variables:

Experimento 1. HCl 0,1 mol\*L<sup>-1</sup>, bureta automática, anaranjado de metilo.

Experimento 2. HCl 0,01 mol\*L<sup>-1</sup>, bureta automática, anaranjado de metilo.

Experimento 3. HCl 0,1 mol\*L<sup>-1</sup>, pipeta automática, anaranjado de metilo.

Experimento 4. HCl 0,01 mol\*L<sup>-1</sup>, pipeta automática, anaranjado de metilo.

Experimento 5. HCl 0,1 mol\*L<sup>-1</sup>, bureta automática, rojo de metilo.

Experimento 6. HCl 0,01 mol\*L<sup>-1</sup>, bureta automática, rojo de metilo.

Experimento 7. HCl 0,1 mol\*L<sup>-1</sup>, pipeta automática, rojo de metilo.

Experimento 8. HCl 0,01 mol\*L<sup>-1</sup>, pipeta automática, rojo de metilo.

Para obtener la respuesta, lo que se evaluó fue el porcentaje de recobro, lo cual se obtuvo de la siguiente manera:

$$\% \text{recobro} = \frac{\text{Vol(mL)}_{\text{gastados}} \times \text{Con(mmol/mL)}_{\text{ácido}}}{\frac{\text{Vol(mL)}_{\text{alícuota}}}{\text{Conc estándar real(mol/L)}}} \quad [11]$$

Para realizar los experimentos se fijó una concentración estándar de bicarbonato de 120 mg\*L<sup>-1</sup>, preparando una disolución con bicarbonato de sodio con pureza al 100,1% y cuya pérdida al secado fue calculada anteriormente (0.1 %), ya que el proceso de secado del bicarbonato de sodio implica un periodo de más de cuatro horas(ver anexo 7.5). Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado para confirmar su repetibilidad.

Se llevó a cabo el análisis de datos utilizando el modelo mostrado en el apartado 2.2.2, determinando la ecuación que determina el comportamiento de la respuesta de acuerdo al valor de los factores; se realizó un análisis de varianza para observar cuál de las tres variables o qué interacción muestra una influencia

significativa en la respuesta, mediante un valor de F al 95,0 % de confianza, bajo la premisa siguiente:

H<sub>0</sub>, hipótesis nula: la variable no presente una influencia significativa en la respuesta.

H<sub>i</sub>, hipótesis alternativa: la variable influye significativamente en la respuesta.

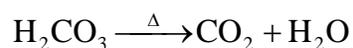
Con lo que se concluye que si el valor determinado de F es menor al valor de tablas, se acepta la hipótesis H<sub>0</sub>.

Al encontrar aquellos factores determinantes, se busca aquella combinación que ofrezca una cuantitatividad del 98,0 al 102,0 %. Una vez obtenidas las condiciones, se procede a la validación del método.

### **3.1.2 Volumetría por retroceso. Descripción del sistema**

En la técnica de volumetría por retroceso, es necesario agregar un reactivo en exceso a la muestra para llevar al analito de interés a una especie en su totalidad, permitiendo la cuantificación del reactivo en exceso por una segunda especie (Villanueva G., 2006). Este método de volumetría puede utilizarse en caso de que se quiera aumentar la cuantitatividad o se tengan otras reacciones además de la de interés (Harris, 2007).

Las especies de carbonato brindan la posibilidad de realizar una valoración por retroceso agregando un exceso de ácido clorhídrico. Al calentar la muestra, puede liberarse el ácido carbónico en forma de dióxido de carbono:



El perder el ácido carbónico, el pH de la muestra se modifica debido a la reducción en la concentración de los iones hidronio, la cual se cuantifica mediante la adición de hidróxido. La diferencia entre las concentraciones agregadas inicial y final, después de la pérdida del ácido carbónico da lugar a la concentración de bicarbonato, considerando que ambas especies,  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{HCO}_3^-$ , se llevan a  $\text{H}_2\text{CO}_3$  (ver reacción 1). Las reacciones que se llevan a cabo son:



El punto de equivalencia para la reacción por retroceso (3), se tiene comúnmente a pH 7 (Harris, 2007). La detección del punto final se realiza con fenolftaleína; para las valoraciones en retroceso, es indispensable la cuantificación de un blanco que contenga la misma cantidad que las muestras del reactivo en exceso, así como la cuantificación del volumen de hidróxido necesario para la completa neutralización. Los cálculos se realizan de acuerdo a lo siguiente:

$$\frac{\text{Vol(mL)OH}^-_{\text{bnco}} - \text{Vol(mL)OH}^-_{\text{mtra}}}{\text{Vol(mL)}_{\text{mtra}}} \times \frac{\text{molOH}^-}{1000\text{mlOH}^-} \times \frac{1\text{molH}^+}{1\text{molOH}^-} = \frac{\text{molH}^+}{\text{mL}} \quad [15]$$

$$\frac{\text{molH}^+}{\text{mL}} \times \frac{1\text{molHCO}_3^-}{1\text{molH}^+} \times \frac{61,01\text{gHCO}_3^-}{1\text{mol HCO}_3^-} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \times \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} = \text{mg/L HCO}_3^- \quad [16]$$

Bnco se refiere al blanco

Mtra se refiere a la muestra

### **3.1.2.1 Desarrollo del método.**

Ya que este método se emplea de forma alternativa al descrito para la cuantificación de bicarbonato por volumetría directa, se empleó la concentración

del ácido clorhídrico establecida en dicho método, ajustando la concentración de hidróxido de sodio al mismo valor; de forma análogo, se tomó el aparato elegido. A diferencia del método de volumetría directa, se utilizó como indicador fenolftaleína, que indica el punto final en la neutralización del ácido con la base. A su vez, considerando la concentración más alta de bicarbonato establecida en la validación del método anterior, se establece un volumen de ácido clorhídrico que permita tener un exceso del mismo para ser cuantificado con el agente titulante. Éste depende de la concentración establecida, por lo que será descrito en los resultados.

### **3.1.3 Validación de los dos sistemas de cuantificación de bicarbonato.**

Una vez establecida las metodologías a emplear, es de vital importancia llevar a cabo la validación del sistema, para asegurar que es adecuada al propósito establecido. Debido a que el laboratorio no cuenta con un estándar certificado, se prepara una disolución madre de  $3000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{HCO}_3^-$ , elaborada diariamente para evitar la transformación del bicarbonato a otras especies, introduciendo errores en la cuantificación. La disolución se realizó de acuerdo al cálculo de la siguiente fórmula:

$$\frac{3000 \text{ mg HCO}_3^-}{1\text{L}} \times \frac{84,01\text{mgNaHCO}_3}{61,01\text{mgHCO}_3^-} \times \frac{100\%_{\text{reactivo}}}{100,1\%_{\text{pureza}}} \times \frac{100\%_{\text{húmedo}}}{99,9\%_{\text{seco}}} \times 0.1\text{L} \quad [12]$$

Con dicha disolución, así como agua de mar (cuando fue necesario), se llevaron a cabo las evaluaciones correspondientes a la validación del método, cuyos experimentos se ilustran a detalle a continuación. La muestra de agua de mar empleada se obtuvo de la zona del Istmo de Tehuantepec y fue proporcionada por el Instituto de Limnología y Ciencias del Mar de la UNAM (dicha muestra fue utilizada para la validación de los otros métodos establecidos aquí). Tanto la

metodología como los criterios de aceptación fueron tomados de García et al. (2002).

1. Precisión: Se analizó por sextuplicado la muestra de agua de mar, bajo las mismas condiciones experimentales. De acuerdo a los resultados, se obtiene que, cuando el coeficiente de variación es menor al 1,5%, el método es preciso. La muestra de agua de mar fue homogeneizada, realizando la metodología establecida. Se calcularon la concentración, la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación.

2. Linealidad del sistema: Se prepararon por triplicado varios niveles de concentración, obtenidas por dilución a partir de la solución madre la cual, a su vez, fue preparada por triplicado. Las diluciones realizadas fueron las siguientes:

**Tabla 7.** Diluciones realizadas para la linealidad del sistema.

Disolución inicial (mg*L <sup>-1</sup> )	Volumen tomado (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (mg*L <sup>-1</sup> )
3000	10,0	50,0	600
3000	10,0	100,0	300
3000	5,0	100,0	150
3000	2,0	50,0	120
3000	2,0	100,0	60
300	10,0	100,0	30
Blanco	0	5,0	0

Se tomaron alícuotas de 5,0 mL y fueron valoradas con la metodología establecida. Posteriormente se obtuvieron las concentraciones experimentales y se realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados (apéndice 7.3); para que el método sea lineal, debe de tener un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor o igual a 0,98; además, el intervalo de confianza para la pendiente no debe incluir el cero.

3. Especificidad: la especificidad toma en cuenta aquellas sustancias que puedan interferir en la cuantificación del analito. Para la volumetría, se establece mediante las pruebas de exactitud y linealidad del sistema. A su vez, se buscó la presencia de carbonato mediante la prueba de fenolftaleína mencionada con anterioridad.

4. Exactitud y repetibilidad del método: a partir de la prueba de precisión, se determinó la concentración del bicarbonato en la misma, con lo cual se prepararon 6 muestras adicionadas, a las cuales se adicionaron 2,0 mL de muestra. También se adicionó el volumen necesario de disolución de referencia  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para llegar a la cantidad de bicarbonato contenida en 5,0 mL de muestra, equivalentes al 100 %. Se llevó a cabo la cuantificación y se calculó la cantidad recuperada del analito, la cual debe ser entre el 98,0 y el 102,0% para los métodos volumétricos.

5. Linealidad del método: Para comprobar la linealidad del método, se emplearon tres niveles de concentración, utilizando 2,0 mL de muestra de agua de mar, a la cual se le agregaron 1,0, 1,45 y 2,0 mL del estándar  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , preparando por triplicado a cada nivel de concentración. Se realizó la valoración, estableciendo una relación entre la cantidad esperada y la cantidad recuperada, definida por una regresión lineal, obteniendo el intervalo de confianza, el coeficiente de correlación, así como el coeficiente de variación para la regresión. Los criterios de aceptación son; un coeficiente de determinación mayor o igual a 0,98, el intervalo de confianza debe incluir el 100,0 % del porcentaje de recobro (98,0 – 102,0 %); el intervalo de confianza de la ordenada debe incluir el cero, mientras que el de la pendiente debe incluir la unidad, así como un coeficiente de variación (tanto para la regresión como para el porcentaje de recobro) menor o igual a 2,0 %.

6. Precisión intermedia: para analizar la precisión intermedia, se analizaron los diferentes estándares establecidos por la linealidad del sistema, ya que la incertidumbre se encuentra asociada al volumen real del titulante agregado y el número de veces que el instrumento elegido es empleado (Harris, 2007). Las

disoluciones estándar fueron preparadas en tres días diferentes por tres analistas distintos, para asegurar la reproducibilidad. Para que un método sea preciso entre analistas, se establece que debe tener un coeficiente de variación menor o igual al 2,0%.

7. Límite de detección (basados en la desviación estándar de la regresión): a partir de los datos obtenidos en la linealidad del sistema, puede obtenerse el límite de detección, ya que los niveles de concentración fueron preparados por triplicado, además de que para este método no se realiza curva de calibración. Se calcula el valor de la pendiente como la ordenada al origen, y se acepta un coeficiente de determinación igual o mayor a 0,98 y un intervalo de confianza de la ordenada al origen el cual no pasa por el cero. A partir de estos datos, se calculó el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3,3xS_b}{b_1} \quad [13]$$

$S_b$  = desviación estándar de la pendiente (Navidi, 2006)

$b_1$  = ordenada al origen de la regresión lineal.

8. Límite de cuantificación (basada en la desviación estándar de la regresión): al igual que en el caso de límite de detección, se utilizan los resultados obtenidos para la linealidad del sistema. Sin embargo, se emplea una ecuación diferente:

$$LC = \frac{10xS_b}{b_1} \quad [14]$$

$S_b$  = desviación estándar de la pendiente (Navidi, 2006)

$b_1$  = ordenada al origen de la regresión lineal.

9. Estabilidad analítica de la muestra: Para el caso de la cuantificación de bicarbonato, se sabe con anterioridad que la actividad bacteriana y la interacción con el  $\text{CO}_2$  ambiental alteran la concentración de bicarbonato y carbonato en el sistema (Nicholson, 2003). Debido a esto la cuantificación debe ser

inmediatamente después de obtenida la muestra; por tanto esta prueba no se realizó.

### **3.1.4 Comparación entre ambas metodologías.**

Para saber si las metodologías validadas para la cuantificación de bicarbonatos en muestras de descargas hidrotermales pueden ser utilizadas indistintamente, se llevaron a cabo pruebas estadísticas, analizando los datos de algunas de las pruebas realizadas durante la validación. Las pruebas fueron tomadas de la Guía de Validación (García et al., 2002)

1. Exactitud y repetibilidad. Se obtiene una relación entre las varianzas y las medias obtenidas para la concentración de la muestra de agua de mar, determinando el intervalo de confianza para ambas diferencias. Ninguno de ellos debe incluir la unidad.

2. Repetibilidad entre linealidad del método. Esta prueba evalúa la diferencia entre la cantidad recuperada de los dos métodos a lo largo de un rango de concentraciones. Para este caso, se determinan los intervalos de confianza: entre pendientes; entre ordenadas al origen; entre varianzas; y entre medias. Al igual que el parámetro anterior, ningún intervalo debe contener el cero.

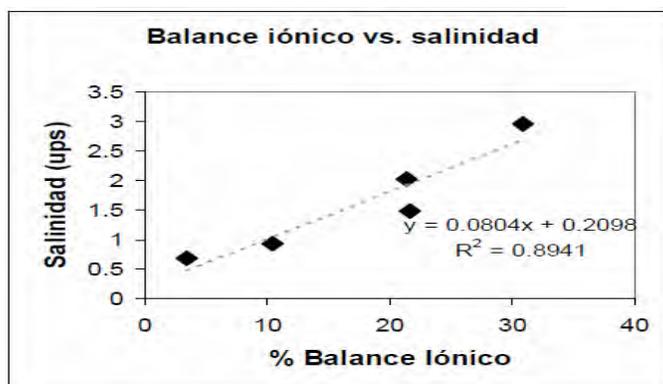
3. Repetibilidad entre precisión intermedia. Se determina el intervalo de confianza para la varianza, el cual no debe de incluir el cero.

### **3.2 Cuantificación de cationes por cromatografía iónica.**

Las concentraciones referidas con anterioridad para muestras en el área de estudio (Villanueva E., 2007), indican que las concentraciones de algunos cationes (potasio, magnesio, calcio, litio) a analizar se encuentran en una pequeña cantidad

con respecto a la concentración de sodio. Por lo cual se requiere de una técnica lo suficientemente sensible que dé lugar a una separación y cuantificación adecuada.

Anteriormente, se utilizaba un método analítico que, a pesar de que permitía la cuantificación de los iones, los resultados no presentaban una confiabilidad clara, lo que se observa al realizar el balance iónico de las muestras (Fig. 11, Tabla 8), en donde el porcentaje de dicho balance excede el 15,0% (Merchand, 2008). Un buen análisis de iones mayores debe tener un balance iónico  $\leq 5,0\%$ . Por tanto, se decidió establecer las condiciones en las que los resultados presentan una mejor confiabilidad, respaldado mediante la validación del método. La Tabla 8 especifica los parámetros utilizados en la metodología anterior.



**Figura 11** .Comparación entre salinidad y balance iónico en un análisis anterior en la zona de muestreo. En esta gráfica se observa que no existe un balance eléctrico, ya que el balance iónico es positivo (mayor cantidad de cationes) (tomado de Merchand, 2008).

**Tabla 8.** Condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de cationes por una metodología establecida con anterioridad (Merchand, 2008).

Condición	Especificación establecida
Temperatura de la columna	35 °C
Temperatura del detector	35 °C
Sensibilidad del detector	100 $\mu\text{S}$
Flujo de la fase móvil	1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Fase móvil	Ácido metanosulfónico 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
Polaridad del detector	Negativa

### **3.2.1 Desarrollo del método: elección de variables.**

El desarrollo del método analítico de cromatografía iónica se llevó a través de varios pasos, debido a que los resultados de uno llevan a la siguiente fase. En este apartado se realiza una descripción general de dicho desarrollo.

El equipo empleado para el análisis es el siguiente: cromatógrafo Alltech con bomba modelo 626, horno de columna modelo 630 y detector de conductividad modelo 680; se utilizó una columna de intercambio catiónico de baja capacidad (silica cubierta con un copolímero de polibutadieno /ácido maleico), de dimensiones 100mm de longitud por 4.6 mm de diámetro; como graficador se empleo un sistema PeakSamplechromatography data system SRI modelo 203 acoplado a una computadora con el programa Peak Simple (Fig. 12).

Para aquellos casos en los que la fase móvil da lugar a un pico negativo, es necesario realizar una integración manual del cromatograma, de manera que el programa integre adecuadamente los picos cromatográficos.



**Figura 12.** Equipo de cromatografía iónica en el laboratorio de cromatografía del Edificio 8 del Instituto de Ingeniería.

*Fase 1: Primera elección de fase móvil.*

Los cationes que se analizan por cromatografía iónica dentro en este estudio son:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . El ión amonio se encuentra en una cantidad mínima en el agua hidrotermal (Libes, 2009), por lo que se toma en cuenta para la elección de las condiciones, considerando como probable su cuantificación. Para observar el comportamiento de separación en el equipo, se probaron varias fases móviles, basados en varios aspectos:

- Aquellas fases probadas con anterioridad por el proveedor, que sentaron una base inicial para el desarrollo (Grace, 2009), de acuerdo a las características de la columna, así como de los analitos establecidos.
- La polaridad: de acuerdo a las características del analito, se observa que para obtener una mayor separación, es necesario disminuir la polaridad de la fase móvil, favoreciendo el tiempo de retención en la fase estacionaria (Fritz, 2009).

Las condiciones empleadas fueron: un flujo de  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , y una temperatura de  $35^\circ\text{C}$  tanto para el detector como el horno de la columna.

Se preparó un multiestándar con todos los cationes mencionados a concentraciones de  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , obtenidos a partir de estándares certificados marca Alltech, realizando las diluciones pertinentes para obtener un volumen de  $10,0 \text{ mL}$ . Debido a la naturaleza del multiestándar, decidió trabajarse con un estándar nuevo por día, para evitar diferencias por estabilidad. En cuanto a las fases móviles estudiadas fueron disoluciones acuosas de:

- Ácido metanosulfónico  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
- Ácido metanosulfónico  $9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
- Ácido metanosulfónico  $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
- Ácido oxálico  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

- Ácido oxálico 3.417 mmol\*L<sup>-1</sup>
- Ácido tartárico 3 mmol\*L<sup>-1</sup>, ácido oxálico 2 mmol\*L<sup>-1</sup>
- Ácido tartárico 2 mmol\*L<sup>-1</sup>, ácido oxálico 1 mmol\*L<sup>-1</sup>
- Ácido nítrico 4 mmol\*L<sup>-1</sup>, metanol 30% (v/v)
- Ácido nítrico 2 mmol\*L<sup>-1</sup>, metanol 15% (v/v)
- Ácido clorhídrico 5 mmol\*L<sup>-1</sup>

Tanto las fases móviles como los multiestándares fueron preparados utilizando agua desionizada (18 MΩ\*cm) con un equipo PURELAB UHQ II de la marca Elga (Fig.13), para evitar interferencias por presencia de iones en la misma.



**Figura 13.** Equipo desionizador de agua potable.

Las fases móviles presentaron un pH próximo a 2, condición establecida para la columna empleada (Grace, 2009). Para cambiar de fase, el equipo era lavado con agua desionizada hasta llegar a una conductividad de 2 a 4 μS para asegurar su limpieza, se eliminaba el aire mediante la purga de la bomba y se permitió la estabilización del equipo con cada fase antes de introducir un blanco de agua desionizada o el multiestándar. Las condiciones de trabajo (presión y conductividad) fueron registradas para cada fase.

Para comparar el comportamiento, se obtuvieron los parámetros cromatográficos resolución, capacidad y selectividad, escogiendo aquella fase móvil que presente los mejores valores a las mismas condiciones de trabajo.

*Fase dos: ajuste de las condiciones.*

Una vez obtenidos los resultados del punto anterior, se procede a cambiar las condiciones de trabajo de la fase móvil elegida. Para ello se tomaron tres distintas variables:

#### Variable A: Temperatura.

La temperatura en cromatografía de líquidos de alta resolución tiene influencia sobre el tiempo de retención y por consiguiente en la selectividad del método para los analitos. Al calentar la columna, se disminuye la viscosidad de la fase móvil y en consecuencia se acortan los tiempos de retención y mejora la resolución. Por tanto, y de acuerdo a las características de la columna, se decidió buscar una temperatura tanto como para el horno de la columna como para el detector entre 35 y 45 °C, manteniendo ambas en el mismo valor, observando el movimiento en la selectividad de la cuantificación.

#### Variable B: Polaridad de la fase móvil.

La polaridad de la fase móvil tiene influencia sobre la especificidad de la metodología, ya que dependiendo de la misma, los cationes permanecen más o menos tiempo en la fase estacionaria por afinidad (Fritz, 2009). Para observar su influencia, se varió la polaridad de la fase móvil.

#### Variable C: Flujo

El flujo es una herramienta mecánica para mejorar la separación entre picos adyacentes al aumentar el tiempo de contacto entre la muestra y la fase

estacionaria. El flujo se ajustó a  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  (límite mínimo del equipo) y a  $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  como límite máximo.

De acuerdo a lo anterior, se realizaron experimentos en donde se combinaron los límites mínimos y máximos de las tres variables y nuevamente se obtuvieron los parámetros de selectividad y resolución.

Para obtener datos que se asemejen a lo que se obtendrá en las muestras, se cambió la concentración del multiestándar, tomando en cuenta una dilución de la muestra más concentrada (agua de mar), lo cual es recomendado para muestras con alta concentración del analito (Fritz, 2009), como es el caso del sodio, y a su vez permitiendo la cuantificación de los otros analitos de interés. Basados en las concentraciones de los analitos reportados anteriormente (Villanueva E., 2007) se tiene (Tabla 9):

**Tabla 9.** Concentraciones de algunos iones encontrados para diferentes sitios de descargas hidrotermales en el área de Bahía Concepción, durante el muestreo del 2004 (tabla tomada de Villanueva E., 2007).

		Concentraciones en mmol/kg							
		Ca	Mg	K	Na	Cl	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Si
Bahía Concepción, 2004	Muestra								
	LP-1	34.68	8.52	14.76	249.78	424.12	5.42	2.46	2.42
	SAN-1	30.19	18.48	14.68	298.09	497.35	6.04	1.52	1.83
	MAN-1	32.44	16.67	15.02	303.31	497.35	5.10	1.40	1.56
	AM-BC	10.48	51.03	15.22	465.62	624.06	26.60	2.40	0.02

LP-1 y SAN-1: descargas hidrotermales en zonas intermareales, en donde se ven afectados por el agua de mar dependiendo de la marea

SAN-1: descarga hidrotermal ubicada en un manglar

AM-BC: composición química del agua de mar del área de Bahía Concepción para efectos de comparación.

De acuerdo a la concentración del agua de mar, el multiestándar preparado para la fase dos del desarrollo es:

- Litio:  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Sodio:  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Amonio:  $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

- Potasio:  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Magnesio:  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Calcio:  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

El equipo fue acondicionado para estabilizarlo con cada una de las fases, registrando la presión y la conductividad características. La conductividad permite observar las diferencias entre polaridades de las fases.

*Fase tres: segunda elección de fase móvil*

Una vez analizados los resultados se seleccionaron aquellas condiciones en donde la separación de los analitos es la mejor posible. A partir de ello, se retomó aquella variable que mostró una influencia mayor en el sistema. Se realizaron las adecuaciones pertinentes, dentro de las condiciones de trabajo fijadas (en relación tanto a las otras dos variables, como aquellos parámetros que no fueron alterados), como último ajuste de la metodología, para proceder con la calibración del equipo. Las concentraciones del multiestándar fueron:

- Litio:  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Sodio:  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Amonio:  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Potasio:  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Magnesio:  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Calcio:  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

### **3.2.2 Calibración y validación del sistema.**

Para llevar a cabo la validación del sistema, el equipo debe ser calibrado, estableciendo una relación entre las concentraciones de los analitos y las respuestas. Esta calibración se realizó en base a las concentraciones establecidas en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Concentraciones empleadas para los multiestándares en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las concentraciones se obtuvieron por dilución a partir de un estándar comercial. Las concentraciones de amonio no se han considerado, hasta establecer que su cuantificación es posible.

	1	2	3	4	5	6
Litio	1	3	5	7	10	
Sodio	10	30	50	70	100	130
Potasio	1	3	5	7	10	
Magnesio	3	5	10	15	20	25
Calcio	1	7	10	15	20	30

Como puede observarse en la Tabla 10, las concentraciones de litio superan a las esperadas (Villanueva E., 2007). En este caso, se utiliza el método de adición estándar para realizar la cuantificación del analito.

Para realizar una mejor calibración, se tomó en cuenta la reproducibilidad con diferentes analistas y la repetibilidad con distintos días de trabajo (tres analistas, tres días diferentes). Los estándares fueron preparados el mismo día de uso (ya que el vidrio adsorbe los cationes, esto evita errores por almacenaje). Mediante el programa (Peak Simple), se obtienen las áreas bajo la curva de cada pico (realizando una corrección manual en caso necesario), con lo cual se establece la linealidad de la curva respuesta vs. concentración para cada analito. El programa ofrece la posibilidad de introducir los puntos de la curva y guardarlos para cuantificaciones futuras.

Para verificar que el método es adecuado para la cuantificación de cationes y ya que la cuantificación en las muestras es múltiple, la validación evalúa a todos los cationes detectados en conjunto, realizando los procedimientos de validación una vez, y obteniendo los resultados para cada uno de los cationes. Al igual que la validación realizada para la cuantificación de bicarbonato, los experimentos y los criterios de aceptación fueron tomados de García, et al. (2002).

1. Precisión: se prepararon por sextuplicado una dilución 1:100 de la muestra de agua de mar, a la cual se adicionó un estándar de  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de Li, y se introdujeron al equipo previamente acondicionado a los parámetros establecidos. Para el caso de cromatografía, el coeficiente de variación entre lecturas debe ser menor a 1,5 %.

2. Ajuste del sistema: para métodos cromatográficos, es necesario evaluar los siguientes parámetros: factor de capacidad, resolución, retención relativa, factor de coe, y número de platos teóricos. Debido a que no se contó con una disolución de ajuste, se utilizó un multiestándar con las concentraciones máximas del intervalo. Se introdujo el multiestándar por quintuplicado al cromatógrafo y a partir de los resultados de tiempo de retención, tiempo muerto, ancho del pico y altura, se obtuvieron los parámetros. El coeficiente de variación entre resultados debe ser menor al 2,0 %, mientras que  $k'$  debe ser mayor a 2 y la resolución mayor a 2.

3. Linealidad del sistema: Se elaboraron por triplicado cinco niveles de concentración de las soluciones de referencia. Se introdujeron en el cromatógrafo previamente acondicionado y se registraron los cromatogramas y los parámetros de la integración. Se calculó el valor de la pendiente, así como la ordenada al origen, el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente. El intervalo de confianza no debe incluir el cero y el coeficiente de determinación debe ser mayor a 0,98.

4. Especificidad: una de las interferencias que pueden llegar a presentarse durante el análisis, es la presencia de ión amonio en la muestra, que pudiera interferir en la cuantificación de sodio, debido a que los picos se enciman. Para el agua proveniente de aguas hidrotermales de flujo lento, se presenta una concentración de ión amonio menor a  $0.06 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ , mientras que la concentración de  $\text{Na}^+$  va

de 312 a 512 mmol\*kg<sup>-1</sup> (Libes, 2009). Esto puede indicarnos que casi no existe interferencia en la cuantificación, pero es importante comprobarlo.

Por ello, se tomaron concentraciones similares a las reportadas anteriormente y se inyectaron al cromatógrafo con las condiciones establecidas para la metodología. Se obtuvieron las áreas, así como las concentraciones de dos maneras:

- Inyectando una muestra de agua de mar, obteniendo la concentración real dada por la lectura del equipo.
- Inyectando una muestra de agua de mar adicionada con amonio, para obtener la concentración dada en presencia del analito interferente.

Una vez obtenidas por triplicado, dichas concentraciones se sometieron a una prueba t de Student para apreciar si las diferencias son significativas a una confianza del 95,0 %, basando las hipótesis:

H<sub>0</sub>: no hay diferencia significativa entre las concentraciones determinadas

H<sub>i</sub>: hay diferencia significativa entre las concentraciones significativas

5. Exactitud y repetibilidad del método: para esta evaluación, se prepararon seis muestras adicionadas, las cuales contienen la mitad de la muestra, y la concentración al 100% de la misma se logró adicionando la cantidad necesaria de estándar. Las muestras fueron analizadas por un analista bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se determinó la cantidad recuperada de cada analito, cuyo valor debe darse entre el 98,0 y el 102,0 %.

6. Linealidad del método: se elaboraron tres niveles de concentración, partiendo de la mitad de la muestra analizada y agregando tres diferentes concentraciones, siendo una de ellas representante del 100,0 %; cada nivel se preparó por triplicado y se inyectaron en el equipo. Para que el método sea lineal, el coeficiente de determinación debe ser mayor a 0,98, el intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad, mientras que el intervalo de confianza de la ordenada debe

incluir el cero. El coeficiente de variación no debe ser mayor del 2,0 %. En cuanto al porcentaje de recobro, este debe encontrarse entre el 98,0 y 102,0 %.

7. Precisión intermedia: para el caso de la cromatografía iónica, se empleó como muestra el agua de mar, la cual fue analizada con la dilución 1:100 antes señalada por dos analistas en dos días diferentes. Se reporta la cantidad, obteniendo la media, la desviación estándar y un coeficiente de variación aceptado menor al 2,0 %.

8. Límite de detección y límite de cuantificación: Para la determinación de ambos límites, se calcularon con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la regresión. Se prepararon tres estándares a concentraciones diferentes de los analitos, las cuales se encuentren dentro del intervalo de calibración; se midieron las respuestas analíticas, calculando la pendiente, el coeficiente de determinación, la desviación estándar de la regresión y el intervalo de confianza para la pendiente. Los límites se evaluaron con las ecuaciones [13] y [14] siguiendo las mismas especificaciones que en el apartado 3.1.3.

9. Robustez: el estudio de robustez es cubierto durante la fase de desarrollo, ya que se variaron las condiciones que pueden interferir en una buena cuantificación, por lo que no se realizan más cambios en el método para comprobarlo (Feinberg, 2007).

10. Estabilidad de la muestra: para la determinación de estabilidad, debe guardarse la muestra un tiempo establecido próximo al intervalo entre el muestreo y la cuantificación, para observar posibles variaciones. Aunque en el caso de cromatografía iónica se guardan las muestras, las condiciones de muestreo y almacenaje son establecidas en base a las características de los analitos, por lo que se evita su alteración.

### **3.3 Muestreo y lectura de muestras**

#### **3.3.1 Obtención y conservación de las muestras.**

Para el muestreo se emplearon frascos de polietileno de 150 mL, los cuales fueron identificados con ayuda de un marcador indeleble, con el nombre asignado a la muestra, el número de frasco, así como el análisis al que se destinó (Fig. 14). Para cada una de los sitios de muestreo se tomaron cinco frascos:

- El primero, correspondiente al análisis de isotopía (cuyos resultados quedan fuera del presente trabajo), se llenó completamente con la muestra y fue sellado inmediatamente;
- En el segundo, se tomaron aproximadamente 100 mL, en donde se realizó la lectura de los parámetros fisicoquímicos (pH, conductividad eléctrica, salinidad), así como la cuantificación de carbonato de acuerdo a la metodología aquí establecida;
- En el tercer frasco, las muestras fueron colectadas y filtradas mediante un equipo millipore con la ayuda de una bomba de vacío y filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, y acidificadas con  $\text{HNO}_3$  de alta pureza hasta un pH aproximado a 2.

Estas muestras fueron almacenadas para el correspondiente análisis de componentes traza (no presentados en este trabajo); los últimos dos, a su vez, fueron filtrados por el equipo millipore con filtros de celulosa de poro 0,45  $\mu\text{m}$ , las cuales fueron guardadas para el análisis de iones en cromatografía iónica. Todos los frascos fueron cerrados y posteriormente sellados con parafilm para evitar la pérdida de muestra o mezcla entre ellas mediante su transporte. A su vez, se mantuvieron en refrigeración (temperatura menor a 4°C), para evitar la

evaporación y concentración de las muestras. Las muestras tomadas se dividieron en 3 tipos:

- Muestras de agua de mar: debido a que el mar presenta una composición heterogénea, se tomaron tres sitios para tener una mejor visualización de dicha composición. Los tres sitios fueron: cerca de la playa, y mar adentro, una al fondo, en el sedimento, y otra en la superficie del mar.
- Muestras de descargas hidrotermales: las cuales son las muestras de interés en este estudio.
- Muestras de agua dulce: obtenidas en lugares cercanos de la zona de muestreo, nuevamente como comparación de las concentraciones de los analitos de interés.

Todas las muestras fueron tomadas en condiciones similares, así como su caracterización.

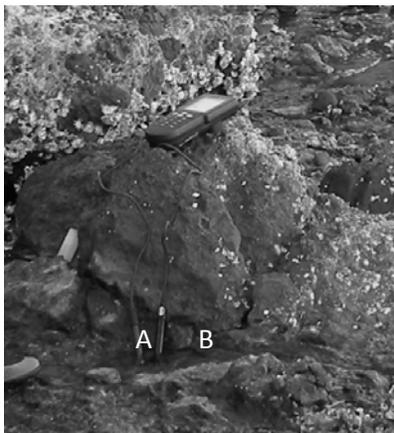


**Figura 14.** Muestreo realizado en descargas hidrotermales costeras de Bahía Concepción. En esta fotografía se muestra una descarga de agua caliente.

### **3.3.2 Determinación de parámetros físico – químicos**

Una vez tomadas las muestras se tomaron distintos parámetros para distinguirlas unas de otras:

- Se tomó la temperatura con ayuda de un termómetro de mercurio de 0 a 100 °C.
- Con ayuda de un GPS, se localizaron las coordenadas de la zona de muestreo.
- Con ayuda de un multiparámetro HACH modelo sensION1 (Fig. 15) previamente calibrado (para mayor referencia, revisar el manual sensION1, HAHC) y los electrodos correspondientes (vidrio para pH, y otro de conductividad), se tomaron por triplicado: pH, conductividad, salinidad, y sólidos totales disueltos (STD).



**Figura 15.** Multiparámetro HACH modelo sensION1 durante el trabajo de campo, en donde A) es el electrodo de conductividad y B), el electrodo de vidrio.

### **3.3.3 Cuantificación de bicarbonato**

La cuantificación de bicarbonato en las muestras fue realizada inmediatamente después de su extracción, para evitar su interacción con el CO<sub>2</sub> en el ambiente y cambios por la temperatura. Cada muestra fue evaluada por triplicado y el volumen de titulante gastado fue corregido por un blanco de agua desionizada. Los resultados se muestran junto con las incertidumbres expandidas.

### **3.3.4 Cuantificación de cationes por cromatografía iónica.**

Para el análisis de cationes, fue necesario buscar en referencias anteriores las posibles concentraciones de los mismos en las muestras (Villanueva E., 2007), lo que ayuda a establecer las diluciones a realizar. De manera general se aplicaron las siguientes diluciones:

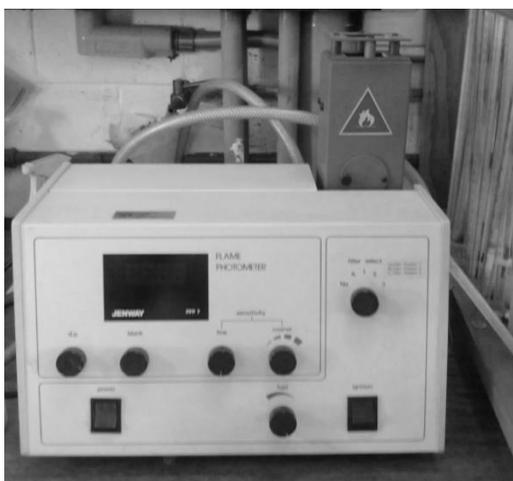
- Agua de mar: 1 mL llevado a un volumen de 100 mL, con agua desionizada.
- Agua de descarga hidrotermal: 1,5 a 2,0 mL en un volumen total de 100 mL.
- Agua dulce: 2 mL de muestra diluida a 10 mL.

Las diluciones se aplicaron por triplicado para observar repetibilidad de las lecturas. Al realizar las diluciones, se empleó el método de adición estándar para cuantificar la concentración de Litio, ya que su concentración es demasiado baja como para ser detectado en el equipo. A partir del estándar de Litio  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , se agregaron 0,5, 1 y 1,5 ml para realizar su cuantificación por diferencia. El sistema empleado fue el establecido y evaluado por el presente trabajo.

### **3.3.5 Cuantificación de cationes por otras metodologías (volumetría de complejos y fotometría)**

#### *Fotometría*

Para realizar la técnica se utilizó fotómetro de flama PFP7/C marca Jenway (Fig, 16), mientras que las sales empleadas para la elaboración de los estándares fueron: nitrato de potasio 99,8% pureza, nitrato de sodio 100,7%, nitrato de litio 99,2%, cloruro de calcio dihidratado 99,5%, y cloruro de sodio 99,9%. Las sales fueron secadas en la estufa a  $80^{\circ}\text{C}$ , durante dos horas. La concentración de los estándares se observa en la Tabla 11.



**Figura 16.** Flamómetro marca Jenway del laboratorio 3D de la Facultad de Química, UNAM.

**Tabla 11.** Estándares preparados para la cuantificación por fotometría. Los estándares se prepararon por dilución de una disolución madre preparada en el laboratorio.

	Litio	Sodio	Potasio	Calcio
Estándar 1 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0,2	2	2	20
Estándar 2 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0,4	4	4	40
Estándar 3 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0,6	6	6	60
Estándar 4 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0,8	8	8	80
Estándar 5 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1,0	10	10	100

Las muestras fueron diluidas para que entraran en el intervalo de concentración de los estándares y al porcentaje de transmitancia. El ajuste se realizó al momento del análisis.

Una vez preparados los estándares, se conectó al equipo al alimentador de combustible (gas) y se encendió moderando la flama para obtener un color azul constante; la longitud de onda fue colocada para el análisis de un ión específico (se analizaron litio, sodio, potasio y calcio); posteriormente se ajustó con el blanco de agua desionizada a un valor cercano a cero, mientras que el 100% de transmitancia se ajustó a la concentración más alta de los estándares. Una vez que el equipo dió valores constantes, se procedió con la lectura de los estándares por triplicado y posteriormente de las muestras evaluadas también por triplicado.

Se obtuvo la regresión lineal en cada caso, siguiendo los parámetros para linealidad del método (coeficiente de determinación mayor a 0,98 e intervalo de confianza de la pendiente que no incluya el cero) para aceptar el método como válido, ya que éste varía por la flama en el momento del análisis (la calibración debe hacerse de manera constante). Los resultados obtenidos aquí fueron comparados con el método de cromatografía iónica validado.

#### *Volumetría por complejos: $Ca^{2+}$ y $Mg^{2+}$*

El EDTA en su forma de sal disódica, es empleado comúnmente para las titulaciones complejométricas (Vogel, 1978). En el caso de mezclas en las cuales se encuentren presentes iones calcio y magnesio, permite hacer una titulación diferencial mediante la elección del indicador correcto. A su vez, ha sido establecido (Harris, 2007), que a pH mayores a 8, el complejo del EDTA con los iones calcio y magnesio presenta una mayor estabilidad. Los indicadores metálicos tienen la capacidad de cambiar de color cuando forman complejos y tienen diferentes constantes de formación, diversificando su uso (Harris, 2007). El negro de eriocromo T es el indicador más empleado para la cuantificación de dureza del agua (cuantificada como la presencia de carbonato de calcio y magnesio) (Harris, 2007). El calcon es un indicador específico de complejos con calcio, para lo cual es necesario retirar el magnesio en forma de precipitado, por lo que el control de pH durante la titulación es importante para evitar errores.

Se preparó una disolución de sal disódica de EDTA  $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , la cual fue valorada con zinc metálico (ver anexo 7.2); la disolución fue colocada en una bureta de vidrio de 10,0 mL para llevar a cabo la valoración de las muestras. Tres alícuotas de cada muestra fueron valoradas con negro de eriocromo T, a las cuales se agregaron 0,5 mL de disolución amortiguadora de amonio/amoniaco a pH 10 y fueron calentadas a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por cinco minutos; el cambio de color del indicador es de vino a azul. Otras tres alícuotas fueron valoradas usando calcón,

para lo cual se agregaron 0,5 mL de hidróxido de potasio  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; en este caso se agregó el titulante hasta observar el cambio de vire; se permitió la disolución del calcio precipitado (ya que una pequeña cantidad lo hace –Vogel, 1978-) por cinco minutos, y se agregó titulante hasta que la coloración azulada permaneció constante. De la misma manera, se analizaron tres blancos para cada caso para introducir la corrección por punto final.

La concentración fue calculada considerando una reacción 1:1 con el EDTA (Sección 2.1.1) La concentración de calcio fue determinada de manera directa, mientras que la de magnesio fue obtenida por la diferencia entre las dos valoraciones.

# **CAPÍTULO IV**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos durante el trabajo experimental así como su interpretación, tanto dentro del laboratorio como en campo. Se exponen las metodologías desarrolladas para la cuantificación de bicarbonato por volumetría directa y volumetría por retroceso, así como la metodología establecida para la cuantificación de los iones litio, sodio, potasio, magnesio y calcio, exponiendo el problema de cuantificación de amonio por el mismo método y justificando que el mismo sea despreciable para la cuantificación de los demás iones. A su vez, se presenta la validación de cada método y el resultado de éstos.

Por último, se exponen los resultados del trabajo realizado en campo en el área de Bahía Concepción, Baja California Sur, así como la cuantificación de los iones, mostrando dos metodologías alternas: volumetría por complejos para calcio y magnesio, y flamometría para litio, sodio, potasio y calcio.

#### **4.1 Cuantificación de bicarbonato.**

##### **4.1.1 Desarrollo de las metodologías.**

###### **4.1.1.1 Volumetría directa.**

Para el desarrollo, se obtuvieron las respuestas analíticas de la cuantificación de bicarbonato en un estándar de  $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio. Cada experimento fue leído por triplicado, obteniendo el porcentaje de recobro como respuesta indirecta para homogeneizar los resultados, ya que cada experimento se realizó con un estándar preparado por pesada independiente. El análisis de datos para el desarrollo experimental de 3 factores a dos niveles representa en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Parámetros obtenidos mediante el diseño experimental. En esta tabla se aprecia la suma de los resultados obtenidos para el porcentaje de recobro de las tres determinaciones que se hicieron a la concentración  $120\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de bicarbonato, en ocho experimentos diferentes. El signo hace referencia al nivel bajo (-1) o alto (+).

<b>Experimento</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>AB</b>	<b>AC</b>	<b>BC</b>	<b>ABC</b>
<b>1</b>	292,84	-292,84	-292,84	-292,84	-292,84	292,84	292,84
<b>2</b>	-292,14	-292,14	-292,14	292,14	292,14	292,14	-292,14
<b>3</b>	284,84	284,84	-284,84	284,84	-284,84	-284,84	-284,84
<b>4</b>	-284,06	284,06	-284,06	-284,06	284,06	-284,06	284,06
<b>5</b>	292,99	-292,98	292,99	-292,99	292,99	-292,99	-292,99
<b>6</b>	-293,54	-293,54	293,54	293,54	-293,54	-293,54	293,54
<b>7</b>	283,06	283,06	283,06	283,06	283,06	283,06	283,06
<b>8</b>	-282,37	282,37	282,37	-282,37	-282,37	282,37	-282,37
<b>Σ (+)</b>	-1152,10	1134,32	1151,95	-1152,24	-1153,59	1150,41	-1152,33
<b>Σ (-)</b>	1153,73	-1171,51	-1153,88	1153,58	1152,24	-1155,42	1153,49
<b>Diferencia</b>	1,63	-37,19	-1,94	1,33	-1,35	-5,01	1,16
<b>Efecto</b>	0,14	-3,10	-0,16	0,11	-0,11	-0,42	0,10
<b>Suma de Cuadrados</b>	0,11	57,61	0,16	0,07	0,08	1,05	0,06
<b>Coefficiente</b>	0,07	-1,55	-0,08	0,06	-0,06	-0,21	0,04

A: Concentración del ácido clorhídrico:  $0,01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (-1),  $0,1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (+1).

B: aparato: micropipeta  $200\ \mu\text{L}$  (-1), bureta digital  $50,0\ \text{mL}$  (+1).

C: Indicador: rojo de metilo (-1); anaranjado de metilo (+1)

Una vez obtenidos los coeficientes y tomando como primer coeficiente el promedio de todas las respuestas entre el número de datos, se tiene la siguiente ecuación:

$$Y = 96,08 + 0,07A - 1,55B - 0,08C + 0,06AB - 0,06AC - 0,21BC + 0,04ABC \quad [17]$$

En donde A, B y C son los factores establecidos. Con esta ecuación puede trabajarse para mejorar la respuesta, basados en los resultados del análisis de varianza, en donde se observó que el instrumento presenta una mayor influencia en la cuantificación del ión bicarbonato, tomando en cuenta una F al 95,0 % de confianza (tabla 13):

**Tabla 13.** Análisis de varianza para el diseño experimental con un total de 8 experimentos realizados por triplicado (N = 24). El valor de F se comparó contra un valor de tablas al 95,0 % de confianza, en donde la influencia del factor B presento una diferencia significativa para el valor de la respuesta obtenido.

<b>Factor</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>SCM</b>	<b>F</b>
<b>A</b>	0,11	1	0,11	0,26
<b>B</b>	57,61	1	57,61	<b>135,33</b>
<b>C</b>	0,16	1	0,16	0,37
<b>AB</b>	0,07	1	0,07	0,17
<b>AC</b>	0,08	1	0,08	0,18
<b>BC</b>	1,05	1	1,05	2,46
<b>ABC</b>	0,06	1	0,06	0,13
<b>ERROR</b>	0,43	16	0,43	
<b>TOTAL</b>	59,56	23	59,56	

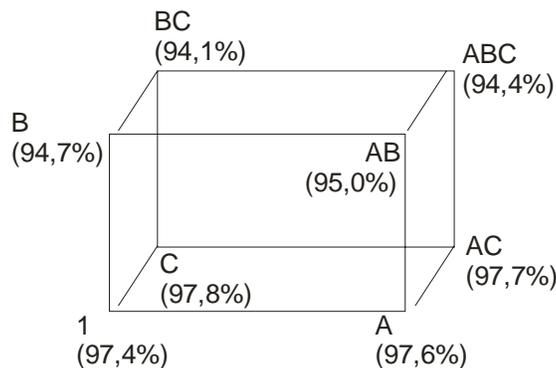
SC: Suma de cuadrados.

GL: grados de libertad.

SCM: Suma de cuadrados medios

F: Valor de la prueba F en el análisis de varianza

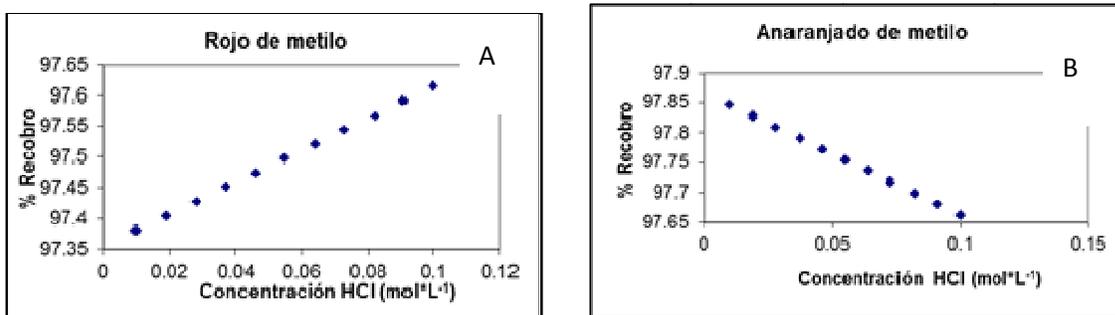
De acuerdo a la gráfica de variables (Fig. 17), se observa que el punto de mayor porcentaje de recobro es en A=-1, B=-1 y C=1, indicado como vértice C, con un valor promedio de 97,8 %.



**Figura 17.** Gráfica obtenida para el diseño experimental. El vértice 1 corresponde al experimento en donde se emplean los niveles negativos (bajos) de las variables. En cada vértice se presenta el porcentaje de recobro obtenido mediante la ecuación 11 (ver Capítulo 3). En el vértice C se aprecia el porcentaje de recobro mayor.

Debido a que se trata de una variable discreta (sólo puede tener los valores asignados) se fijó el valor de B, escogiendo como aparato la micropipeta; la variable C (indicador), se le asignaron valores de -1 y 1. Las gráficas de la Fig. 18

presentan los porcentajes de recobro resultantes con la variación de la concentración del ácido dentro del intervalo de trabajo ( $0,01$  a  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Se observó que las condiciones que presentan un mayor recobro son aquellos con una concentración  $0,01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  del ácido y anaranjado de metilo como indicador. A su vez, en el caso del rojo de metilo se tiene una tendencia a aumentar el porcentaje de recobro a una concentración mayor del ácido; uno de los problemas que se observan al aumentar la concentración del agente titulante, es que se disminuye la cantidad de volumen utilizado del mismo, aumentando las posibilidades de error en la cuantificación. Por tanto se decidió utilizar anaranjado de metilo como indicador, lo que permite reducir el error por un volumen, así como una concentración de ácido clorhídrico pequeña. Para evitar problemas de variación en cuanto a la concentración del ácido preparado en el laboratorio, se decidió trabajar a una concentración de  $0,02$  a  $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , en donde aún se observa un porcentaje de recobro aceptable (Fig. 18B).



**Figura 18.** Gráficas de porcentaje de recobro contra la concentración de HCl, fijando el aparato en su valor mínimo (micropipeta), en donde se aprecia el comportamiento de la respuesta utilizando el como indicador A) rojo de metilo y B) anaranjado de metilo, al variar la concentración del ácido.

Por tanto, las condiciones establecidas para el método son:

1. Concentración de ácido clorhídrico:  $0,02 - 0,025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , en donde el porcentaje de recobro es cercano el 98,0%.
2. Instrumento: pipeta  $10 - 200 \mu\text{L}$ .
3. Indicador: anaranjado de metilo.

Y la metodología puede resumirse como sigue:

- Colocar 5,0 mL de muestra homogeneizada en un matraz Erlenmeyer de 5 mL
- Agregarle dos gotas de fenolftaleína (para comprobar que no hay presencia de carbonato); si permanece incolora, se adicionan dos gotas de anaranjado de metilo; si aparece rosa, se lleva al punto final de fenolftaleína anotando la cantidad utilizada de ácido clorhídrico  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  previamente valorado, para después corregir las concentraciones de bicarbonato y carbonato. Después de esto, agregar las gotas de anaranjado de metilo.
- Proceder con la valoración registrando el volumen agregado y el número de veces que la pipeta fue empleada (cálculo de incertidumbre), así como el volumen total.
- Calcular la concentración de bicarbonato en la muestra, añadiendo el cálculo de la incertidumbre.

De acuerdo a la Norma Mexicana NMX-AA-036-SCFI-2001, “Análisis de agua – Determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba”, define la alcalinidad a “la presencia de sustancias hidrolizables en agua y que como producto de hidrólisis generan el ión hidroxilo, como son las bases fuertes y los hidróxidos de metales alcalinotérreos; contribuyen también en forma importante a la alcalinidad los carbonatos y fosfatos”. En esta norma, la metodología para alcalinidad hace referencia al anaranjado de metilo como indicador, lo que coincide con lo encontrado en el desarrollo del método. El agua utilizada para la preparación de soluciones así como la cuantificación en el blanco cumple con las características establecidas. La concentración de HCl es similar a la presentada aquí, ya que la requerida por la norma es de  $0,02 \text{ Eq}\cdot\text{L}^{-1}$ . La norma también establece que las muestras “pueden estar sujetas a la acción microbiana y a pérdidas o ganancias de  $\text{CO}_2$  u otros gases cuando se exponen al aire”, lo que apoya el hecho de que las muestras deben ser analizadas lo antes posible una vez tomadas, para evitar la presencia

de errores en la cuantificación (la norma maneja un tiempo máximo de 24 horas y una temperatura de almacenamiento de 0 a 4°C). Adicionalmente, también recomienda el uso de fenolftaleína para verificar la presencia de carbonato.

La volumetría a micro escala ofrece la posibilidad de transporte del ácido en recipientes y cantidades pequeñas, ya que el gasto del titulante es de cantidades menores a 5 mL; el problema con la bureta digital, es el volumen de 50,00 mL que maneja y su incertidumbre asociada a pequeños volúmenes, además del transporte del titulante en un frasco más grande que es acoplado a la bureta (Fig. 10B).

#### **4.1.1.2 Volumetría por retroceso.**

El establecimiento de esta metodología se ajustó a lo obtenido en la metodología anterior, así como las concentraciones esperadas en las muestras, por lo que la metodología quedó establecida de la siguiente manera:

- Tomar 5,0 mL de muestra homogeneizada en un matraz Erlenmeyer de 25 mL. Colocar una gota de fenolftaleína para observar presencia de carbonato (si aparece una disolución rosa es que se encuentra presente; en tal caso agregar HCl 0,02 a 0,025 mol\*L<sup>-1</sup> para llevar al punto final, anotando el volumen de ácido utilizado).
- Con ayuda de una bureta de 10,0 mL, agregar 2,5 mL de HCl de concentración entre 0,02 y 0,025 mol\*L<sup>-1</sup>.
- Calentar hasta ebullición por 5 minutos. Agitar para liberar el CO<sub>2</sub> formado.
- Titular el HCl restante con NaOH 0,02 a 0,025 mol\*L<sup>-1</sup>. Determinar la cantidad de HCl gastado para llevar el carbonato y bicarbonato presente a CO<sub>2</sub>, evaluando como cantidad de bicarbonato total, tomando en cuenta el volumen gastado por el blanco como referencia.

- Realizar la metodología por triplicado para cada muestra, así como para el blanco.

Este método establecido es similar al reportado para el análisis de bicarbonato establecido por Nicholson (1993); la diferencia con el autor radica en la extracción del CO<sub>2</sub> de la muestra, ya que en el método de la literatura se elimina al burbujear aire libre de CO<sub>2</sub>, mientras que aquí se emplea calor. Mediante la validación se buscó establecer que el sistema es confiable.

#### **4.1.2 Validación de los dos sistemas.**

Una vez establecidas las metodologías para la cuantificación de bicarbonato, se procede a validarlas. La normalización tanto del ácido clorhídrico como del hidróxido de sodio empleados se llevó a cabo como se explica en el Apéndice 7.2, determinando la incertidumbre de dicha concentración (Apéndice 7.4). A su vez, todos los instrumentos fueron calibrados antes de su uso (Apéndice 7.1), y se determinó la pérdida al secado del bicarbonato de sodio (Apéndice 7.5). Debe recordarse que los criterios de aceptación fueron tomados de García, et al. (2002).

##### *Precisión.*

Para la prueba de precisión, se analizaron 6 muestras de agua de mar con el procedimiento establecido, dando como resultado lo siguiente (Tabla 14):

**Tabla 14.** Resultados de la prueba de precisión para las dos metodologías de cuantificación de bicarbonato.

<b>Método</b>	<b>Concentración del agua de mar (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Desviación Estándar (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
<b>Volumetría directa</b>	142,29±7,01	2,22	1,5 %
<b>Volumetría en retroceso</b>	127,46±17,28	0,00	0,0 %

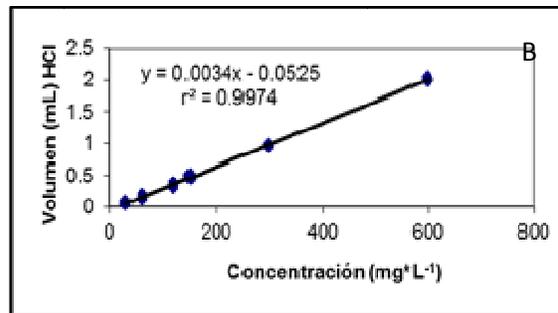
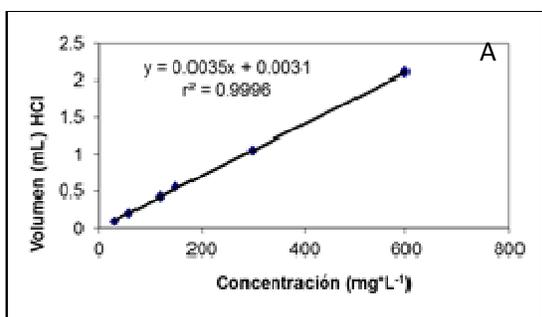
Como se observa, ambos métodos se encuentran dentro del valor establecido por la Guía de Validación, con un coeficiente de variación menor o igual a 1,5 %, estableciendo que ambos métodos son precisos.

*Linealidad del sistema.*

Se prepararon 6 estándares a diferentes niveles de concentración, y se llevó a cabo la valoración de los mismos. En la Tabla 15 se observa la respuesta dada en volumen de ácido clorhídrico gastado en función de la concentración del analito. Para verificar que únicamente se valora bicarbonato, se realizó la prueba de la fenolftaleína para ambos casos, resultando negativa. La Fig. 19 presenta las gráficas correspondientes.

**Tabla 15.** Volumen promedio utilizado de una disolución de ácido clorhídrico empleado para distintos estándares de bicarbonato en los métodos de cuantificación directo y por retroceso.

Estándar (mg*L <sup>-1</sup> )	Cantidad (mL) de ácido clorhídrico 0,02 mmol*L <sup>-1</sup> gastado	
	Volumetría directa	Volumetría por retroceso
30	0,10	0,07
60	0,20	0,13
120	0,43	0,34
150	0,55	0,48
300	1,05	0,96
600	2,10	2,00



**Figura 19.** Gráficas obtenidas para la linealidad del sistema de A) volumetría directa y B) volumetría por retroceso para la cuantificación de bicarbonato. Nótese que los datos analizados presentan una tendencia lineal.

La tabla 16 muestra los resultados de las regresiones lineales para los dos sistemas, obtenidas a partir del método de mínimos cuadrados (Ápndice 7.3):

**Tabla 16.** Características de las regresiones lineales establecidas para los métodos de cuantificación de bicarbonato utilizando el método de mínimos cuadrados.

<b>Método</b>	<b>Pendiente (mL*L*mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Intervalo de confianza (mL*L*mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ordenada al origen (mL)</b>	<b>Coefficiente de determinación r<sup>2</sup></b>
<b>Volumetría directa</b>	0,0035	0,0033 – 0,0037	0,0031	0,99
<b>Volumetría por retroceso</b>	0,0034	0,0033 – 0,0036	0,0500	0,99

En las dos metodologías, tanto el coeficiente de determinación como el intervalo para la pendiente presentan que el sistema es lineal, ya que el coeficiente es mayor a 0,98 y el intervalo de confianza para la pendiente no incluye el cero. A su vez, esto sustenta la prueba de especificidad, que para el caso de métodos volumétricos, se observa mediante la linealidad del sistema y su exactitud.

#### *Exactitud y repetibilidad.*

Se tomaron 2,0 mL de la muestra previamente homogeneizada, y se agregó una disolución estándar de 300 mg\*mL<sup>-1</sup> con ayuda de una bureta de 10,0 mL, tomando 1,45 mL para el método de volumetría directa y 1,4 mL para el método de volumetría por retroceso, para simular la cantidad de bicarbonato presente en 5,0 mL de muestra. La cuantificación se realizó por triplicado. Utilizando las concentraciones obtenidas para la muestra por ambas vías durante la prueba de precisión, se encontraron los resultados mostrados en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Resultados de exactitud y repetibilidad para los métodos de cuantificación de bicarbonato.

<b>Método</b>	<b>Cantidad (<math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>		<b>CV</b>	<b>Porcentaje de recobro</b>
	<b>adicionada</b>	<b>recuperada</b>		
<b>Volumetría directa</b>	145,17	144,10 $\pm$ 7,13	0,0 %	99,3 %
<b>Volumetría por retroceso</b>	136,98	135,96 $\pm$ 18,19	0,0 %	99,3 %

CV: Coeficiente de variación.

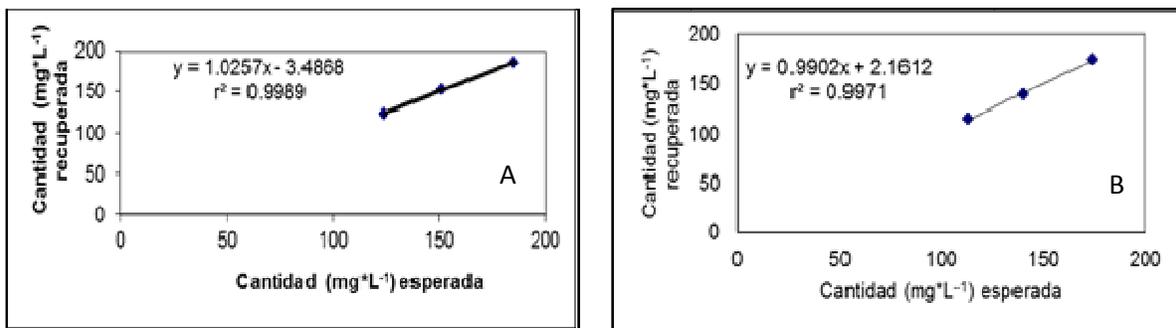
En ambas metodologías, el porcentaje de recobro está dentro del 98,0 – 102,0%, por lo que el método es exacto; a su vez, no se presentó una coeficiente de variación, dando como resultado que también es repetible. Esta prueba, al igual que la linealidad del sistema, respaldan la especificidad de los sistemas.

*Linealidad del método.*

Para esta prueba se agregaron a 2,0 mL de muestra de agua de mar 1, 1,45 y 2 mL de estándar  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de bicarbonato empleado para la prueba de exactitud y repetibilidad, dando lugar a tres niveles de concentración. La Tabla 18 indica el recobro obtenido para las concentraciones adicionadas para los métodos de volumetría directa y volumetría por retroceso. La Fig. 20 muestra la cantidad obtenida contra la cantidad adicionada.

**Tabla 18.** Datos promedio obtenidos para la linealidad de la cuantificación de bicarbonato por dos metodologías diferentes.

	<b>Cantidad (<math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Cantidad (<math>\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Porcentaje de recobro</b>
	<b>esperada</b>	<b>recuperada</b>	
<b>Volumetría directa</b>	<b>123,93</b>	122,95	99,2
	<b>151,29</b>	152,91	101,1
	<b>185,16</b>	185,87	100,4
<b>Volumetría por retroceso</b>	<b>112,67</b>	114,77	101,9
	<b>140,02</b>	138,94	99,2
	<b>173,18</b>	175,19	100,8



**Figura 20.** Gráficas de linealidad del método de cuantificación de bicarbonato por A) volumetría directa y B) por volumetría en retroceso

La Tabla 19 indica las características de la regresión lineal obtenida por el método de los mínimos cuadrados para las dos metodologías.

**Tabla 19.** Características de las regresiones lineales establecidas para la linealidad del método.

Método	Pendiente	IC	Ordenada al origen	IC	$r^2$	CV de la regresión	%R	CV
Volumetría directa	1,03	0,59	-3,49		0,99			
Volumetría por retroceso	0,99	0,29	2,16		0,99	1,8 %	100,3 %	1,3 %

IC: Intervalo de confianza

$r^2$ : Coeficiente de determinación

CV: coeficiente de variación

%R: porcentaje de recobro promedio

### Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó utilizando un estándar de  $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de bicarbonato preparado por triplicado por dos analistas, en tres días diferentes, obteniendo la Tabla 20.

**Tabla 20.** Resultados de precisión intermedia para la cuantificación de bicarbonato por dos metodologías diferentes.

<b>Método</b>	<b>Concentración (mg*mL<sup>-1</sup>) obtenida promedio</b>	<b>Porcentaje de recobro promedio</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
<b>Volumetría directa</b>	121,31±5,60	101,3	1,4 %
<b>Volumetría por retroceso</b>		98,4	0,9 %

Con lo cual se establece que el sistema es preciso entre diferentes analistas.

#### *Límite de detección y Límite de cuantificación*

Tanto el límite de detección como el de cuantificación fueron obtenidos de acuerdo a la desviación estándar de la regresión, obtenida para la prueba de linealidad del sistema. Los límites obtenidos mediante las ecuaciones [13] y [14] se encuentran en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Límites de detección y cuantificación para la determinación de bicarbonato por los métodos de volumetría directa y volumetría por retroceso.

<b>Método</b>	<b>Límite de detección (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Límite de cuantificación (mg*L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Volumetría directa</b>	3.64±0,03	11,02±0,09
<b>Volumetría por retroceso</b>	9,11±0,18	27,61±0,53

Aunque estas concentraciones son mínimas, necesita tomarse en cuenta el error por el indicador. Para el caso de la volumetría directa, el error dado se corrige mediante del empleo de un blanco, lo cual indica que la concentración mínima detectable debe ser mayor a la equivalencia del volumen gastado por el blanco, el cual se ha visto que fluctúa entre los 0,04 y 0,06 mL de HCl 0,025 mol\*L<sup>-1</sup>, equivalente a 12,23 y 18,34 mg\*L<sup>-1</sup>.

Al contrario de la técnica por volumetría directa, en la volumetría por retroceso los límites no son dados por la detección correcta del punto final, lo cual permitirá

discriminar entre el gasto del blanco, en donde la reacción se lleva a cabo entre el ácido y la base fuerte, y una concentración pequeña de bicarbonato, que implica un pequeño gasto de ácido fuerte.

Por tanto se puede asumir mediante los resultados, que ambos métodos son confiables para la cuantificación del ión bicarbonato en muestras de agua, considerando los intervalos establecidos en las pruebas de linealidad. En dicho intervalo pueden incluirse muestras de agua dulce, agua hidrotermal y agua de mar. Se debe tomar en cuenta que la determinación debe realizarse inmediatamente después de la obtención de la muestra para evitar la interacción con el CO<sub>2</sub> atmosférico y cometer errores en la evaluación.

#### **4.1.3 Equivalencia de las metodologías para la cuantificación de bicarbonato.**

Para verificar que ambas metodologías son equivalentes entre sí para la cuantificación de bicarbonato en agua hidrotermal, fue necesario comparar su exactitud, precisión y la linealidad del método. Los resultados se presentan a continuación.

##### *Exactitud y repetibilidad*

Para comparar las metodologías, se realizó una prueba de F, obteniendo:

Intervalo de confianza para la diferencia entre varianzas: 0,07 a 6,56

Intervalo de confianza para la diferencia entre medias: -0,52 a 1,12 mg\*L<sup>-1</sup>

El intervalo de confianzas para la varianza incluye la unidad, mientras que el intervalo para las medias incluye el cero, por lo que el ambos métodos son repetibles en exactitud.

*Repetibilidad entre linealidad del método*

En esta evaluación, se obtuvieron:

Intervalo de confianza entre pendientes: -0,17 a 0,25

Intervalo de confianza entre ordenadas: -37,17 a 25,88 mg\*L<sup>-1</sup>

Intervalo de confianza entre varianzas: 4,90 a 94,46

Intervalo de confianza entre medias: 0,83 a 1,47 mg\*L<sup>-1</sup>

Tanto los intervalos para las pendientes y las ordenadas incluyen el cero, por lo cual su linealidad es repetible. Aunque el intervalo de varianzas y medias no incluyen la unidad, se acepta que los métodos son equivalentes, ya que el porcentaje de recobro para ambos casos se encuentran dentro de lo establecido, en un intervalo del 98,0 al 102,0%.

*Repetibilidad entre precisión del método (precisión intermedia)*

Se obtuvo el intervalo de confianza para la varianza siguiendo la prueba de F:

Intervalo de confianza para la varianza: 0,35 a 17,81.

El intervalo incluye a la unidad, comprobando la repetibilidad en precisión de ambos sistemas.

En base a estos tres parámetros, ambos sistemas pueden utilizarse indistintamente para la cuantificación de bicarbonato. Los dos sistemas son confiables para su uso en campo, además de que permiten varias ventajas:

- El volumen utilizado de muestra es mínimo, por lo que se facilita su toma.
- Los instrumentos empleados son lo suficientemente resistentes para su transporte, lo que facilita en gran medida su uso en campo.

- El método de cuantificación por retroceso puede utilizarse mayormente con aquellas muestras que presentan una temperatura mayor a la ambiental, ya que evita la fase de calentamiento para retirar el CO<sub>2</sub> disuelto.
- La cantidad que se emplea de los agentes titulantes así como de indicador es mínima, por lo que el transporte de los mismos al campo se hace más cómodo y seguro, permitiendo el empleo de envases de polivinilo de 200 mL.

Las desventajas de los sistemas establecidos son:

- El equipo empleado debe estar perfectamente calibrado, ya que del volumen real de descarga dependen la precisión y exactitud del método, incluyendo la incertidumbre, por las cantidades que se manejan.
- El analista debe estar familiarizado con el uso de las micropipetas para evitar errores en la toma y descarga de volúmenes con las mismas, así como destreza para detectar con un error mínimo el punto final, por lo que debe tener experiencia con el indicador establecido.

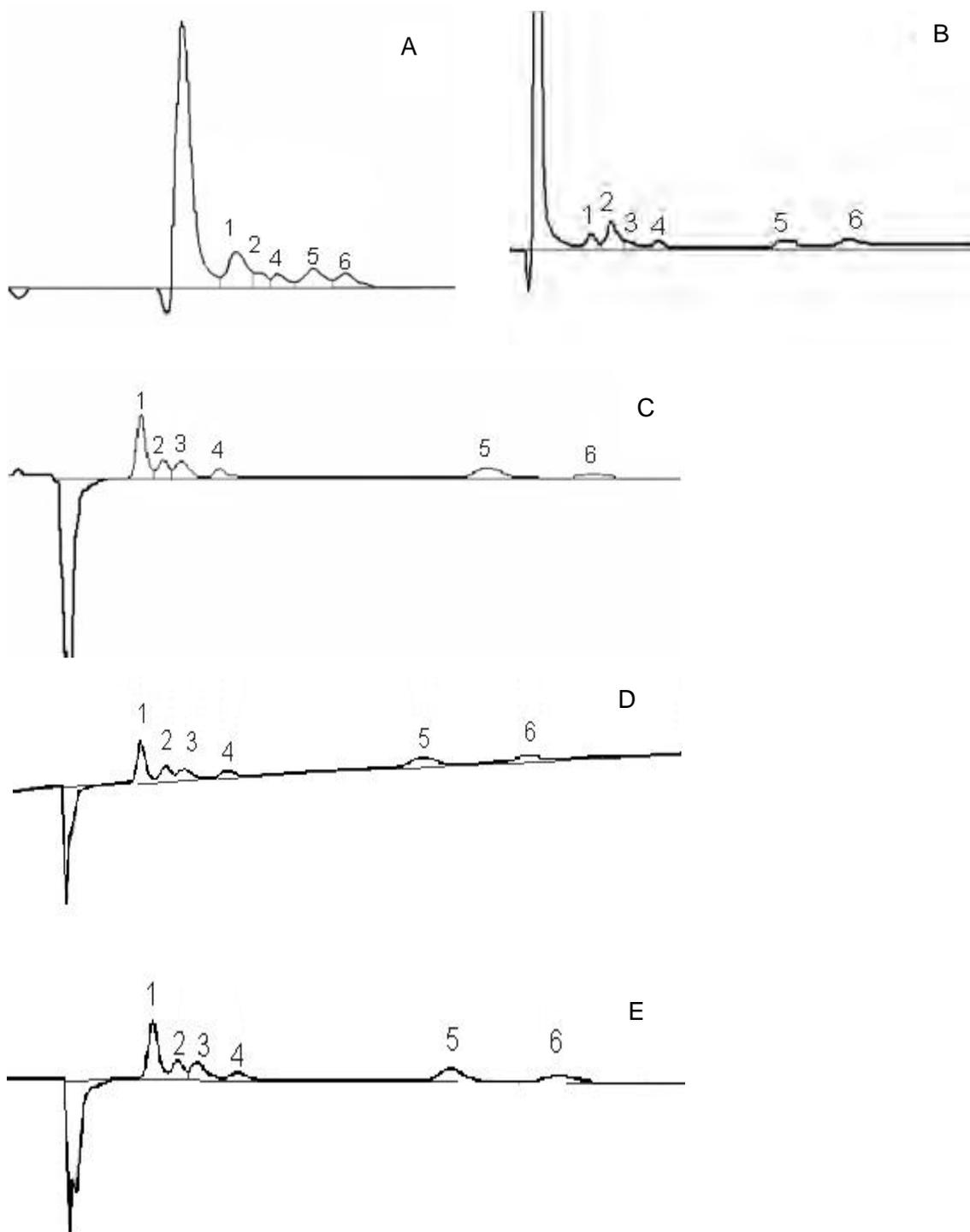
Estas desventajas pueden eliminarse con una experimentación correcta y cuidadosa, con lo que puede llegarse al grado de confiabilidad establecido en el presente estudio.

## **4.2 Cuantificación de cationes**

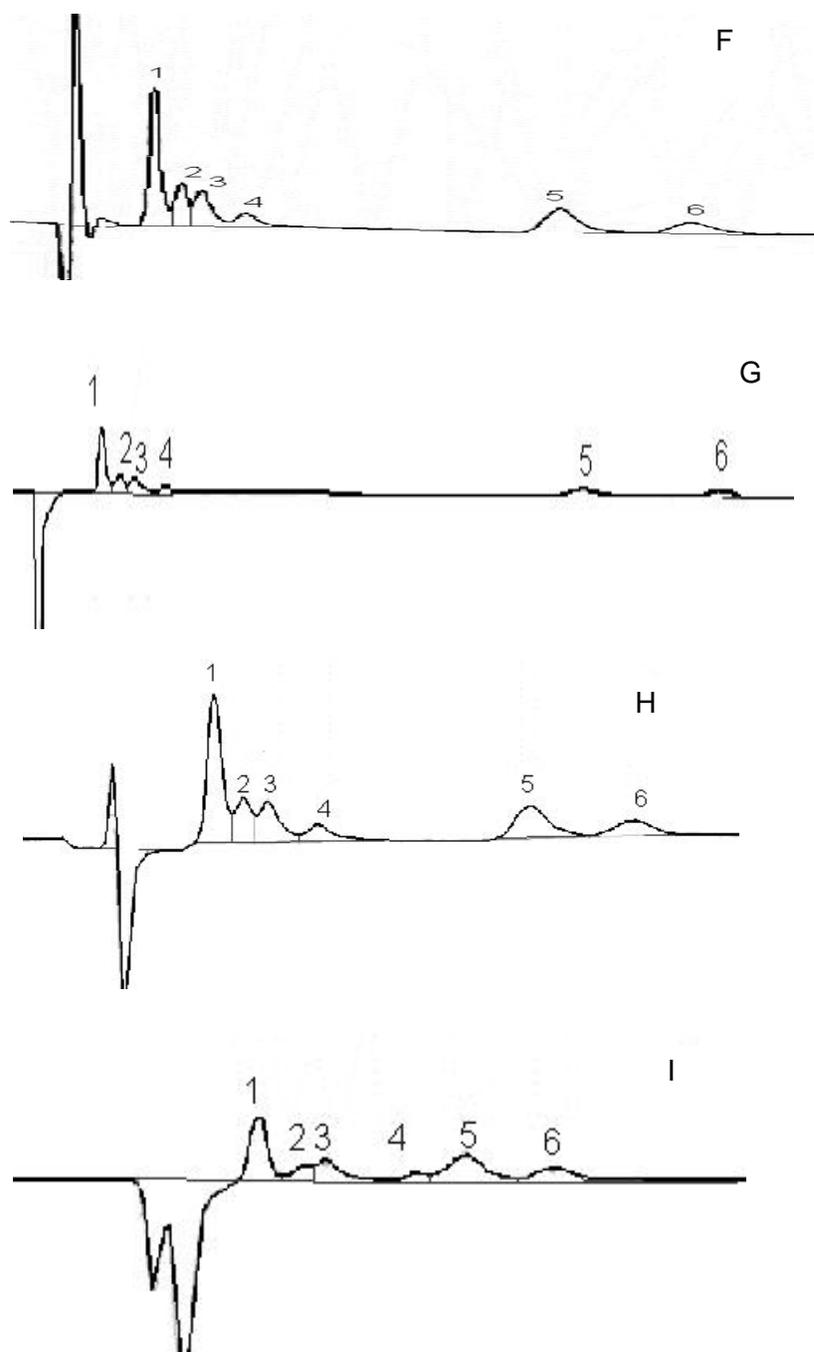
### **4.2.1 Establecimiento del método de cromatografía iónica**

*Fase 1: Primera elección de fase móvil.*

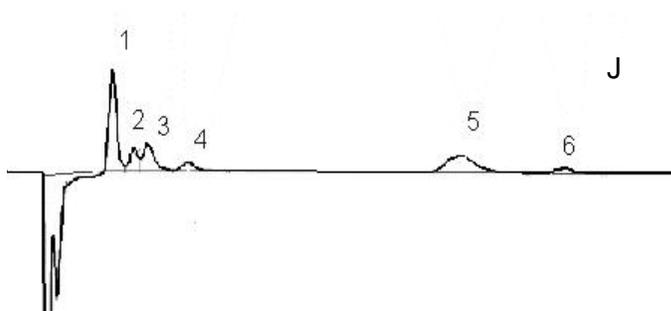
Se probaron varias fases móviles compatibles con la columna empleada. El orden de elución de los iones fue: Litio, Sodio, Amonio, Potasio, Magnesio y Calcio. Las Fig. 21, 22 y 23 muestran los cromatogramas obtenidos con cada fase.



**Figura 21.** Cromatogramas obtenidos para diferentes fases móviles durante la fase 1 de desarrollo. El pico o picos no numerados se deben a la fase móvil. El orden de elución es: 1, litio; 2, sodio; 3, amonio; 4, potasio; 5, magnesio y 6, calcio. A) Ácido metanosulfónico  $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , B) Ácido metanosulfónico  $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , C) Ácido metanosulfónico  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , D), Ácido oxálico  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , E) Ácido oxálico  $3,42 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .



**Figura 22.** Cromatogramas obtenidos para diferentes fases móviles durante la fase 1 de desarrollo. El pico o picos no numerados se deben a la fase móvil. El orden de elución es: 1, litio; 2, sodio; 3, amonio; 4, potasio; 5, magnesio y 6, calcio. F) Ácido tartárico  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ácido oxálico  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , G) Ácido tartárico  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ácido oxálico  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  y H) Ácido clorhídrico  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; I) Ácido nítrico  $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , metanol 30 % (v/v).



**Figura 23.** Cromatogramas obtenidos para diferentes fases móviles durante la fase 1 de desarrollo. El pico o picos no numerados se deben a la fase móvil. El orden de elución es: 1, litio; 2, sodio; 3, amonio; 4, potasio; 5, magnesio y 6, calcio J) Ácido nítrico 2 mmol\*L<sup>-1</sup>, metanol 15 % (v/v).

En la Tabla 22, se dan las condiciones del equipo con cada fase móvil. La conductividad hace referencia a la polaridad de la fase: cuando menor es la conductividad total, menor es la polaridad de la fase.

**Tabla 22.** Condiciones obtenidas para diferentes fases móviles.

Fase móvil	Tiempo (min) aproximado de corrida	Tiempo (min) muerto	Conductividad total (μS*cm <sup>-1</sup> ) del detector	Presión (psi) de la bomba
Ácido metanosulfónico 9 mmol*L <sup>-1</sup>	3,00	1,41	6792	1175
Ácido metanosulfónico 4,5 mmo*IL <sup>-1</sup>	9,00	1,33	3500	1197
Ácido metanosulfónico 3 mmol*L <sup>-1</sup>	14,00	1,35	2527	857
Ácido oxálico 2,5 mmol*L <sup>-1</sup>	12,00	1,20	2580	880
Ácido oxálico 3,42 mmol*L <sup>-1</sup>	11,00	1,31	2751	1151
Ácido tartárico 3 mmol*L <sup>-1</sup>	15,00	1,38	2304	801
ácido oxálico 2 mmol*L <sup>-1</sup>				
Ácido tartárico 2 mmol*L <sup>-1</sup> , ácido oxálico 1 mmol*L <sup>-1</sup>	27,00	1,00	1409	582
Ácido clorhídrico 5 mmol*L <sup>-1</sup>	8,00	1,34	3490	1007
Ácido nítrico 4 mmol*L <sup>-1</sup> , metanol 30 % (v/v)	13,00	1,60	2200	1249
Ácido nítrico 2 mmol*L <sup>-1</sup> , metanol 15 % (v/v)	17,00	1,58	1433	1016

También se determinaron los parámetros cromatográficos: factor de capacidad (ecuación [3]); factor de selectividad (ecuación [4]), y factor de resolución (ecuación [5]). Los resultados se muestran en las Tabla 23 y 24.

**Tabla 23.** Parámetros cromatográficos con diferentes fases móviles en la fase 1 de desarrollo.

Fase móvil	Parámetro	Cationes					
		Litio	Sodio	Amonio	Potasio	Magnesio	Calcio
<b>Ácido metanosulfónico 9 mmol*L<sup>-1</sup></b>	Tr' (min)	NR	NR	0,46	0,74	1,09	1,34
	k	NR	NR	0,32	0,53	0,77	1,23
	α	NR	NR	1,63	1,47	1,23	
	Rs	NR	NR	0,92	1,36	0,43	
<b>Ácido metanosulfónico 4,5 mmol*L<sup>-1</sup></b>	Tr' (min)	1,12	1,52	1,77	2,47	4,99	6,27
	k	1,16	1,53	1,82	2,43	6,80	8,53
	α	1,32	1,19	1,34	2,80	1,25	
	Rs	0,96	0,54	0,88	2,27	0,95	
<b>Ácido metanosulfónico 3 mmol*L<sup>-1</sup></b>	Tr' (min)	1,27	2,07	2,45	3,28	9,18	11,52
	k	1,16	1,53	1,82	2,43	6,80	8,53
	α	1,32	1,19	1,34	2,80	1,25	
	Rs	0,98	0,69	0,93	3,32	0,99	
<b>Ácido oxálico 2,5 mmol*L<sup>-1</sup></b>	Tr' (min)	1,65	2,18	2,57	3,55	7,88	10,33
	k	1,36	1,82	2,14	3,96	6,57	8,61
	α	1,34	1,18	1,38	2,22	1,31	
	Rs	1,00	0,68	1,28	3,51	1,41	
<b>Ácido oxálico 3,42 mmol*L<sup>-1</sup></b>	Tr' (min)	1,47	1,96	2,31	3,09	7,34	9,24
	k	1,12	1,49	1,75	2,36	5,60	7,05
	α	1,33	1,17	1,35	2,37	1,26	
	Rs	1,00	0,66	0,93	2,73	1,00	
<b>Ácido tartárico 3 mmol*L<sup>-1</sup>, ácido oxálico 2 mmol*L<sup>-1</sup></b>	Tr' (min)	1,69	2,25	2,69	3,60	10,20	12,95
	k	1,06	1,41	1,68	2,25	6,38	8,09
	α	1,33	1,20	1,34	2,83	1,27	
	Rs	0,97	0,69	0,66	2,91	1,02	
<b>Ácido tartárico 2 mmol*L<sup>-1</sup>, ácido oxálico 1 mmol*L<sup>-1</sup></b>	Tr' (min)	2,38	3,10	3,63	4,82	20,47	25,70
	k	2,38	3,10	3,63	4,82	20,47	25,70
	α	1,30	1,17	1,33	4,25	1,26	
	Rs	1,10	0,69	0,97	5,25	1,25	
<b>Ácido clorhídrico 5 mmol*L<sup>-1</sup></b>	Tr' (min)	1,12	1,51	1,79	2,42	5,04	6,32
	k	0,83	1,11	1,32	1,78	3,71	4,65
	α	1,34	1,19	1,35	2,08	1,26	
	Rs	1,02	0,68	0,76	1,83	0,83	

NR: no resuelto  
k: capacidad

Tr': tiempo de retención corregido  
α: selectividad  
Rs: resolución.

**Tabla 24.** Parámetros cromatográficos con diferentes fases móviles en la fase 1 de desarrollo.

Fase móvil	Parámetro	Cationes					
		Litio	Sodio	Amonio	Potasio	Magnesio	Calcio
Ácido nítrico 4 mmol*L <sup>-1</sup> , metanol 30 % (v/v)	Tr' (min)	1,42	2,07	2,40	3,77	8,32	10,72
	k	0,89	1,29	1,50	2,35	5,20	6,07
	α	1,46	1,16	1,57	2,21	1,29	
	Rs	1,15	0,43	0,85	2,05	1,03	
Ácido nítrico 2 mmol*L <sup>-1</sup> , metanol 15 % (v/v)	Tr' (min)	1,69	2,34	2,77	3,97	12,34	15,27
	k	1,07	1,48	1,75	2,51	7,81	9,67
	α	1,38	1,19	1,43	3,11	1,24	
	Rs	1,15	0,59	0,96	4,58	1,37	

NR: no resuelto  
k: capacidad

Tr': tiempo de retención corregido  
α: selectividad

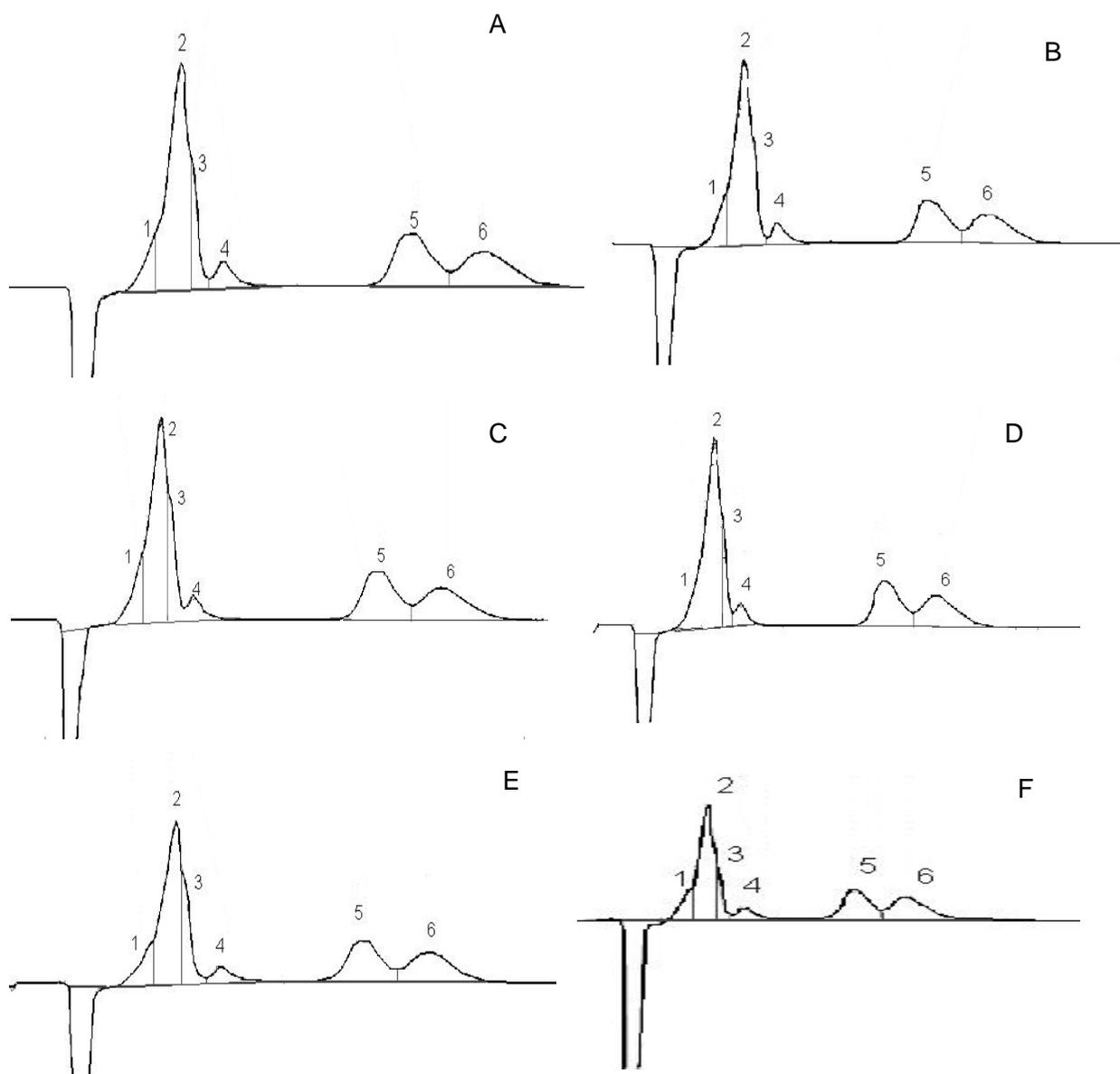
Rs: resolución.

En base a los resultados obtenidos, se decidió trabajar con la fase móvil de ácido nítrico 2 mmol\*L<sup>-1</sup> con metanol 15 % v/v, ya que fue la que presentó una mejor resolución para el caso de los iones litio, sodio, amonio y potasio, cuya separación se dificulta debido a sus características similares. A su vez, el tiempo de corrida que presentó se encuentra dentro de los valores medios, lo que puede agilizar el análisis de muestras de forma rutinaria.

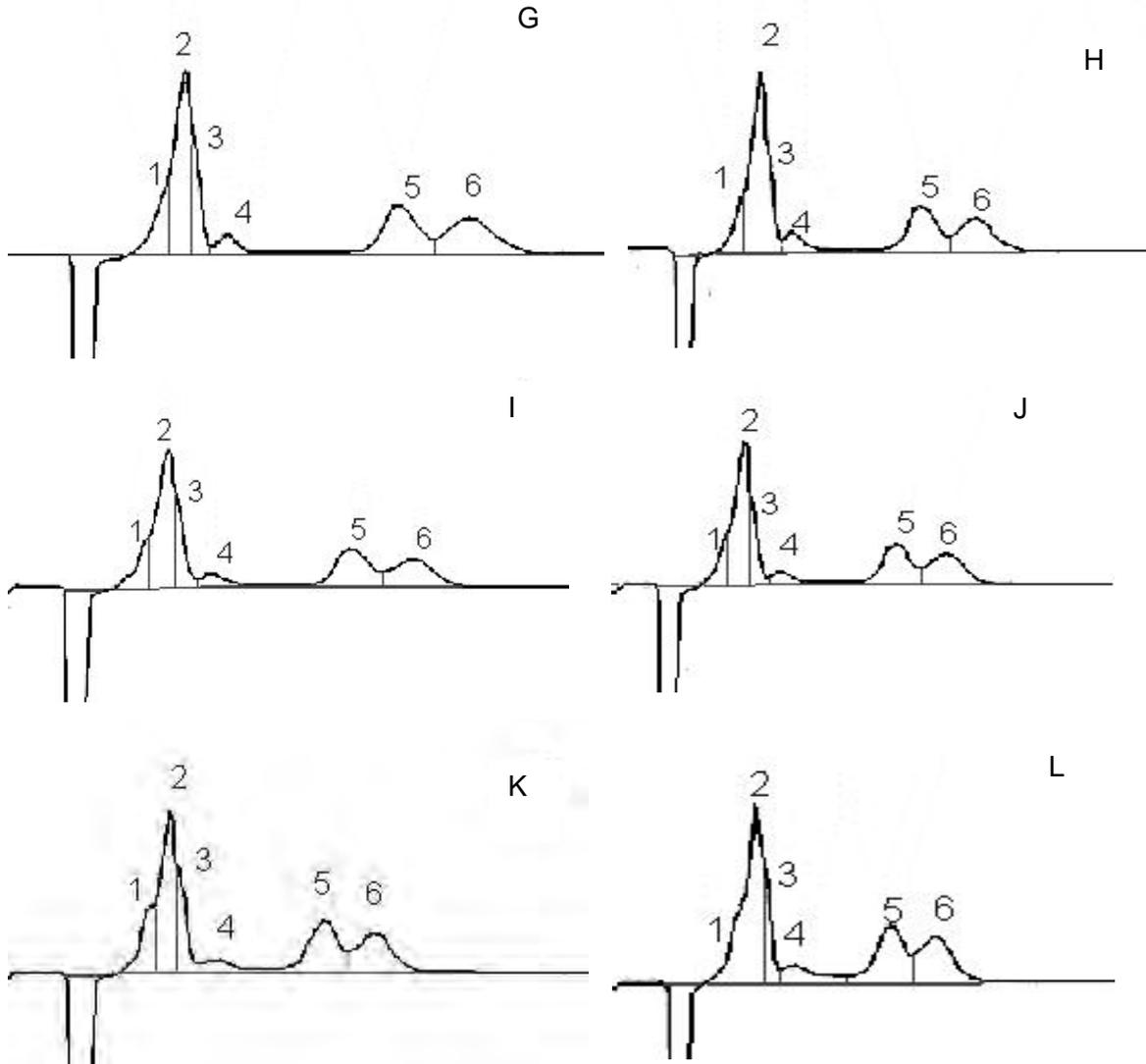
Aunque el ácido oxálico presentó valores similares en cuanto a la separación y un tiempo de corrida menor, la fase de ácido nítrico 2 mmol\*L<sup>-1</sup> con metanol 15 %v/v permite utilizar el modificador orgánico para variar la polaridad de la fase. Además, durante el trabajo rutinario, la misma fase permitió la estabilidad del equipo en un tiempo menor.

### *Fase 2: Ajuste de condiciones cromatográficas*

A partir de la fase anterior, se decidió fijar la concentración del ácido nítrico para manejar como variables: concentración de metanol (alteración de polaridad), entre 15 y 25 %; flujo de 0,8 a 1,2 mL\*min<sup>-1</sup>, y temperatura de 35 a 45 °C. Se aumentó la concentración de los cationes, para tener una idea más cercana sobre lo que ocurriría con una muestra de agua hidrotermal de acuerdo al apartado 3.2.1. Las Fig. 24 y 25 muestran los cromatogramas obtenidos.



**Figura 24.** Cromatogramas obtenidos durante la segunda fase del desarrollo. El orden de elución es: 1, litio; 2, sodio; 3, amonio; 4, potasio; 5, magnesio; 6, calcio. A) Fase móvil ácido nítrico 2 mM y metanol 15 % (v/v), a 35 °C y un flujo de 0,8 mL\*min<sup>-1</sup>; B) Fase móvil ácido nítrico 2 mM y metanol 15 % (v/v), a 35 °C y un flujo de 1,2 mL\*min<sup>-1</sup>; C) fase móvil ácido nítrico 2 mM y metanol 15 % (v/v), a 45 °C y un flujo de 0,8 mL\*min<sup>-1</sup>; D) fase móvil ácido nítrico 2 mM y metanol 15 % (v/v), a 45 °C y un flujo de 1,2 mL\*min<sup>-1</sup>.



**Figura 25.** Cromatogramas obtenidos durante la segunda fase del desarrollo. El orden de elución es: 1, litio; 2, sodio; 3, amonio; 4, potasio; 5, magnesio; 6, calcio. Los cromatogramas son obtenidos con: E) fase móvil ácido nítrico 2 mM y metanol 30 %v/v, a 35 °C y un flujo de 0,8 mL\*min<sup>-1</sup>; F) fase móvil ácido nítrico 2 mM y metanol 30 %v/v, a 35 °C y un flujo de 1,2 mL\*min<sup>-1</sup>; G) fase móvil ácido nítrico 2 mM y metanol 30 %v/v, a 45 °C y un flujo de 0,8 mL\*min<sup>-1</sup>; H) fase móvil ácido nítrico 2 mM y metanol 30 %v/v, a 45 °C y un flujo de 1,2 mL\*min<sup>-1</sup>; I) fase móvil ácido nítrico 2 mM y etanol 30% v/v, a 35 °C y un flujo de 0,8 mL\*min<sup>-1</sup>; J) fase móvil ácido nítrico 2 mM y etanol 30 %v/v, a 35 °C y un flujo de 1,2 mL\*min<sup>-1</sup>; K) fase móvil ácido nítrico 2 mM y etanol 30%v/v, a 45 °C y un flujo de 0,8 mL\*min<sup>-1</sup>; L) fase móvil ácido nítrico 2 mM y etanol 30%v/v, a 45 °C y un flujo de 1,2 mL\*min<sup>-1</sup>.

Las condiciones instrumentales obtenidas para cada experimento, incluyendo el tiempo de corrida, se presentan en la Tabla 24.

**Implementación de una metodología para el estudio químico de cationes y bicarbonatos en manantiales de Bahía Concepción (Baja California Sur, México)**

**Capítulo IV. Resultados y discusión**

**Tabla 24.** Condiciones instrumentales obtenidos para cada experimento en la fase 2 del desarrollo de la metodología de cromatografía iónica para la cuantificación de cationes.

Fase móvil	Temperatura (°C)	Flujo (mL*min <sup>-1</sup> )	Tiempo (min) de corrida	Tiempo (min) muerto	Presión (psi)	Conductividad (µS*cm <sup>-1</sup> ) total
HNO <sub>3</sub> 2 mmol*L <sup>-1</sup> , metanol 15 %v/v	35	0,8	9,0	1,63	786	808
		1,2	8,0	1,11	1152	810
	45	0,8	11,0	1,53	666	918
		1,2	8,0	1,11	1011	908
HNO <sub>3</sub> 2 mmol*L <sup>-1</sup> , metanol 30 %v/v	35	0,8	11,0	1,63	887	653
		1,2	7,5	1,19	1324	656
	45	0,8	11,0	1,60	750	751
		1,2	7,0	1,60	1162	738
HNO <sub>3</sub> 2 mmol*L <sup>-1</sup> , etanol 30 %v/v	35	0,8	8,5	1,66	1089	597
		1,2	6,0	1,15	1562	604
	45	0,8	9,0	1,60	990	707
		1,2	9,0	1,10	1479	712

En cuanto a los parámetros cromatográficos, las Tablas 25, 26 y 27 presentan los valores resultantes.

**Tabla 25.** Parámetros cromatográficos determinados para diferentes fases móviles durante la fase 2 del desarrollo.

Fase móvil	(°C)	Flujo (mL*min <sup>-1</sup> )	Parámetro	Litio	Sodio	Amonio	Potasio	Magnesio	Calcio
HNO <sub>3</sub> 2 mmol*L <sup>-1</sup> , metanol 15 %v/v	35	0,8	tr'(min)	1,74	2,34	2,59	3,29	7,54	9,32
			k	1,07	1,43	1,59	2,02	4,62	5,72
			α	1,35	1,11	1,27	2,29	1,24	
			Rs	0,77	0,41	0,58	2,42	0,67	
		1,2	tr'(min)	1,24	1,56	1,72	2,19	5,06	6,26
			k	1,12	1,40	1,55	1,97	4,56	5,64
	α		1,26	1,11	1,27	2,31	1,24		
	Rs		0,58	0,46	0,54	1,88	0,60		

NR: no resuelto Tr': tiempo de retención corregido

k: capacidad

α: selectividad

Rs: resolución

**Implementación de una metodología para el estudio químico de cationes y bicarbonatos en manantiales de Bahía Concepción (Baja California Sur, México)**

**Capítulo IV. Resultados y discusión**

**Tabla 26.** Parámetros cromatográficos determinados para diferentes fases móviles durante la fase 2 del desarrollo. Fases móviles con metanol.

Fase móvil	(°C)	Flujo (mL*min <sup>-1</sup> )	Parámetro	Cationes						
				Litio	Sodio	Amonio	Potasio	Magnesio	Calcio	
HNO <sub>3</sub> 2 mmol*L <sup>-1</sup> , metanol 15 %v/v	45	0,8	tr'(min)	1,90	2,35	2,52	3,15	7,70	9,42	
			k	1,24	1,54	1,65	2,06	5,03	6,16	
			α	1,24	1,07	1,25	2,44	1,22		
			Rs	0,61	0,33	0,68	3,10	0,74		
		1,2	tr'(min)	1,24	1,52	1,71	2,07	5,16	6,27	
			k	1,12	1,37	1,54	1,87	4,65	5,65	
	45	1,2	α	1,23	1,12	1,22	2,49	1,22		
			Rs	0,57	0,55	0,57	2,43	0,61		
		35	0,8	tr'(min)	1,79	2,32	2,49	3,35	6,69	8,37
				k	1,10	1,42	1,53	2,06	4,10	5,14
				α	1,30	1,07	1,35	1,99	1,25	
				Rs	0,68	0,27	0,72	1,76	0,59	
1,2	tr'(min)		1,12	1,52	1,75	2,20	4,45	5,57		
	k		0,97	1,32	1,52	1,91	3,87	4,84		
45	1,2	α	1,36	1,15	1,26	2,02	1,25			
		Rs	0,65	0,56	0,61	1,58	0,51			
	0,8	tr'(min)	1,80	2,33	2,58	3,22	7,02	8,65		
		k	1,13	1,46	1,61	2,01	4,39	5,41		
		α	1,30	1,11	1,25	2,18	1,23			
		Rs	0,64	0,44	0,63	1,86	0,64			
1,2	tr'(min)	0,67	1,03	1,18	1,63	4,15	5,25			
	k	0,42	0,65	0,74	1,02	2,59	3,28			
HNO <sub>3</sub> 2 mmol*L <sup>-1</sup> , etanol 30 %v/v	35	0,8	tr'(min)	1,54	1,99	2,21	3,07	5,14	6,31	
			K	0,93	1,20	1,33	1,85	3,10	3,80	
			α	1,29	1,11	1,39	1,67	1,23		
			Rs	0,60	0,36	1,00	1,49	0,63		
		1,2	tr'(min)	0,98	1,3	1,47	2,0	3,43	4,22	
			K	0,86	1,13	1,28	1,74	2,99	3,67	
	35	1,2	α	1,32	1,13	1,37	1,72	1,23		
			Rs	0,59	0,42	0,96	1,43	0,62		

NR: no resuelto Tr': tiempo de retención corregido

k: capacidad

α: selectividad

Rs: resolución

**Tabla 27.** Parámetros cromatográficos determinados para diferentes fases móviles durante la fase 2 del desarrollo.

Fase móvil	(°C)	Flujo (mL*min <sup>-1</sup> )	Parámetro	Litio	Sodio	Amonio	Potasio	Magnesio	Calcio
HNO <sub>3</sub> 2 mmol*L <sup>-1</sup> , etanol 30 %v/v	45	0,8	tr'(min)	1,65	2,05	2,27	2,95	5,45	6,58
			K	1,03	1,28	1,42	1,84	3,41	4,11
			α	1,24	1,11	1,30	1,85	1,21	
			Rs	0,53	0,42	0,75	1,52	0,56	
		1,2	tr'(min)	1,10	1,37	1,53	1,97	3,67	4,43
			K	1,00	1,24	1,39	1,79	3,33	4,03
			α	1,24	1,12	1,28	1,86	1,21	
			Rs	0,50	0,49	0,73	1,52	0,51	

NR: no resuelto Tr': tiempo de retención corregido

k: capacidad

α: selectividad

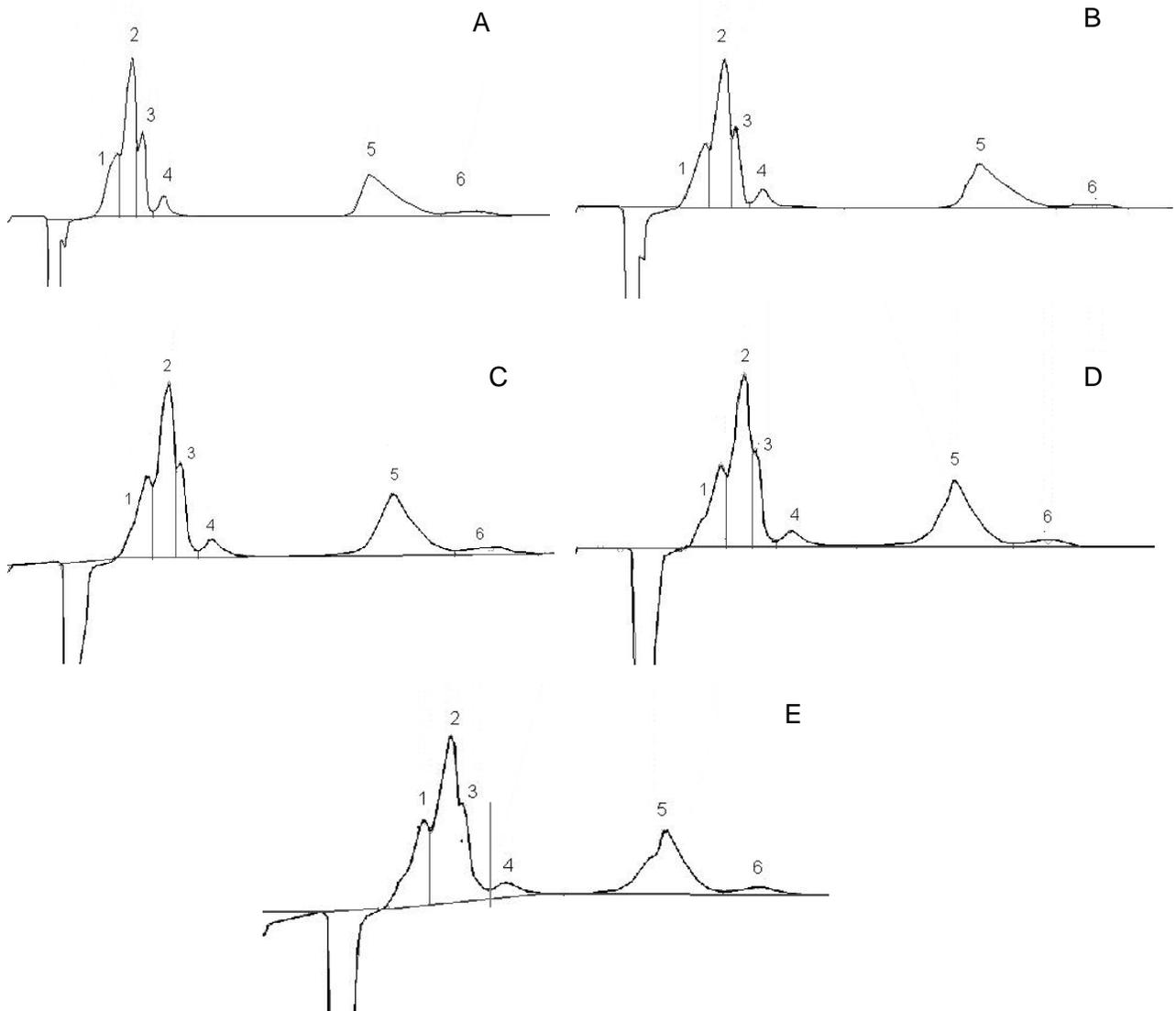
Rs: resolución

Al comparar los resultados obtenidos, se decide tomar la mezcla de ácido nítrico con etanol para establecer el método, así como un flujo de 0,8 mL/min y una temperatura de 35 °C para el detector y la columna. Esto se decidió debido a que la resolución mejora al comparar las fases con 30% v/v del modificador orgánico; el metanol presenta una menor separación entre el sodio y el amonio, así como entre el litio y el sodio.

*Fase tres: segunda elección de fase móvil.*

En la fase anterior se observó que una temperatura del equipo de 35°C y un flujo de 0,8 mL\*min<sup>-1</sup> ofrecen una mejor separación. Se decidió trabajar nuevamente con la polaridad, trabajando a varias concentraciones de etanol. Para cada caso, se especifica la conductividad total obtenida, que depende del grado de polaridad de la fase móvil.

La Fig. 26 muestra los cromatogramas obtenidos durante esta fase.



**Figura 26.** Cromatogramas obtenidos durante la fase tres del desarrollo analítico, variando la concentración de etanol en la fase móvil. La mezcla de la fase móvil fue ácido nítrico 2 mM con etanol A) 5 %v/v, B) 10 %v/v, C) 15 %v/v, D) 20 %v/v y E) 25 %v/v.

La Tabla 28 muestra las condiciones del equipo para cada caso ensayado durante la fase tres. Como se observa, a medida que aumenta la concentración de etanol en la fase móvil, disminuye la conductividad total del detector, lo que concuerda con la disminución de la polaridad de la fase. A su vez, el tiempo de corrida también disminuye.

**Tabla 28.** Condiciones instrumentales para la fase tres del desarrollo del método de cromatografía iónica para la cuantificación de cationes

Concentración (%v/v) de etanol en la fase móvil	Tiempo (min) de corrida	Tiempo (min) muerto	Presión (psi)	Conductividad ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) total
5%	16,0	2,00	769	889
10%	15,0	1,93	856	856
15%	12,0	1,66	964	760
20%	11,0	1,68	1047	704
25%	10,0	1,60	1101	621

La Tabla 29 presenta los parámetros cromatográficos para las mezclas de la fase tres del desarrollo.

**Tabla 29.** Parámetros cromatográficos para las fases probadas durante la fase tres del desarrollo.

Concentración % (v/v) de etanol en la fase móvil	Parámetro	Cationes					
		Litio	Sodio	Amonio	Potasio	Magnesio	Calcio
5%	tr'(min)	1,78	2,28	2,63	3,35	10,42	13,75
	k	0,89	1,14	1,32	1,68	5,21	6,88
	$\alpha$	1,28	1,15	1,27	3,11	1,32	
	Rs	0,62	0,61	0,37	1,79	0,96	
10%	tr'(min)	1,77	2,29	2,60	3,35	9,35	12,54
	k	0,92	1,19	1,35	1,74	4,85	6,50
	$\alpha$	1,29	1,14	1,29	2,79	1,34	
	Rs	0,60	0,56	0,49	1,77	0,92	
15%	tr'(min)	1,81	2,32	2,59	3,36	7,69	10,06
	k	1,09	1,40	1,56	2,02	4,63	6,06
	$\alpha$	1,29	1,11	1,30	2,29	1,31	
	Rs	0,63	0,49	0,64	1,49	0,80	
20%	tr'(min)	1,70	2,22	2,47	3,29	6,95	9,05
	k	1,01	1,32	1,47	1,96	4,14	5,39
	$\alpha$	1,30	1,11	1,33	2,12	1,30	
	Rs	0,67	0,47	0,73	1,41	0,76	
25%	tr'(min)	1,67	2,20	2,40	3,28	6,38	8,25
	k	1,04	1,38	1,50	2,05	3,99	5,16
	$\alpha$	1,32	1,09	1,37	1,94	1,29	
	Rs	0,72	0,35	0,88	1,38	0,73	

NR: no resuelto Tr': tiempo de retención corregido

k: capacidad

$\alpha$ : selectividad

Rs: resolución

Debido que en ningún caso se observó una buena separación del amonio con el sodio, y a que el primero se espera en una concentración baja, se optó por retirarlo del análisis y considerando componente interferente de la matriz (etapa de validación). Por tanto, las condiciones especificadas para el método son:

Fase móvil	Ácido nítrico 2 mM, etanol 25 % v/v
Flujo	0,8 mL*min <sup>-1</sup>
Temperatura de la columna	35 °C
Temperatura del detector	35 °C
Sensibilidad del detector	100 µS*cm <sup>-1</sup>
Polaridad del detector	Negativa

Una observación importante acerca de la fase móvil es que la mezcla etanol agua es exergónica, por lo que genera burbujas de aire. Para evitarlas, se agita la mezcla durante veinte minutos previo a su filtración con un equipo millipore y filtros de 0,45 µm.

En lo que concierne al cromatograma, se observó que los picos de magnesio y calcio son los que presentan una mayor asimetría (Fig. 26). Esto se debe a la saturación de la columna por dichos iones y el retraso que presentan en la elución.

#### **4.2.2 Calibración y validación del sistema.**

##### *Calibración del sistema.*

Una vez establecida la metodología, es importante llevar a cabo la calibración, ya que se utiliza el método de estándar externo para realizar la cuantificación de las muestras problema. La calibración se determinó con los resultados obtenidos por tres analistas, en tres días diferentes y tres repeticiones, con un mínimo de 5 estándares por curva. La Tabla 10 muestra los distintos estándares establecidos para cada ión. El calcio fue dividido en dos secciones, ya que presenta un cambio

de pendiente. La Tabla 30 muestra las pendientes y las ordenadas al origen determinadas para cada caso.

**Tabla 30.** Ecuaciones obtenidas para las curvas de calibración de cada ión analizado por cromatografía iónica.

<b>Ión</b>	<b>Intervalo de concentración (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Ordenada al origen</b>
<b>Litio</b>	1 – 10	579,41±23,48	-142,43±136,67
<b>Sodio</b>	10 -130	141,42±2,59	405,72±198,41
<b>Potasio</b>	1 – 10	151,96±5,86	-0,11±35,02
<b>Magnesio</b>	3 – 25	243,43±6,63	315,26±100,32
<b>Calcio</b>	1 - 10	90,09±3,2	70,72±19,49
<b>Calcio</b>	10 – 30	180,08±08	-285,00±188,54

Los datos de la calibración se introdujeron al software, de forma que pueda ser utilizada en cuantificaciones posteriores.

#### *Validación del sistema.*

Una vez realizada la calibración del sistema, se procede a establecer si el sistema es adecuado para cuantificar los iones en muestras de agua hidrotermal. Es importante considerar que tanto el agua de mar (con una salinidad más alta) como el agua dulce (de salinidad más baja) son empleados durante el análisis como material control del muestreo. La validación se realizó determinando la precisión, linealidad del método y del sistema, ajuste del equipo, especificidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, así como límites de detección y cuantificación. Los criterios son tomados de García, et al. (2002).

#### *Precisión.*

Se analizaron 2 muestras por sextuplicado y en ambas se evalúan los cinco iones (litio, sodio, potasio, magnesio y calcio) Para el agua de mar se maneja la curva de

calibración de 1 a 10 mg\*L<sup>-1</sup> de calcio, mientras que para el agua hidrotermal (Los sueños 6, ver muestreo), se utiliza la curva de 10 a 30 mg\*L<sup>-1</sup> del mismo ión.

La Tabla 31 muestra los resultados para el agua de mar y el agua hidrotermal. Para el caso del agua hidrotermal, la concentración de litio corresponde al estándar añadido.

**Tabla 31.** Resultados de precisión para el método de cromatografía iónica.

Cación	Agua de mar			Agua hidrotermal		
	Concentración (mg*L <sup>-1</sup> )	Desviación Estándar (mg*L <sup>-1</sup> )	C.V.	Concentración (mg*L <sup>-1</sup> )	Desviación Estándar (mg*L <sup>-1</sup> )	C.V.
<b>Litio</b>	199±16	2,48	1,2			
<b>Sodio</b>	10788±424	146,00	1,4	8213.71±326.15	123.21	1.5
<b>Potasio</b>	378±7	5,32	1,4	299.63±23.35	2.4	0.8
<b>Magnesio</b>	1281±6	18,00	1,4	491.88±27.74	6.89	1.4
<b>Calcio</b>	593±7	7,37	1,2	1323.81±98.09	14.56	1.1

Como puede observarse, para todos los cationes analizados, se tiene un coeficiente de variación igual o menor al 1,5%, por lo que se establece que el método es preciso.

#### *Ajuste del sistema.*

Se analizó por sextuplicado un estándar con las concentraciones establecidas en la Tabla 32. A su vez, la tabla muestra el tiempo de retención para cada ión, así como el factor de capacidad (*k*), el factor de selectividad ( $\alpha$ ) y la Resolución (*Rs*) entre los iones cercanos. El coeficiente de variación no fue mostrado en la Tabla 32, ya que en todos los casos el valor fue de 0,0%.

**Tabla 32.** Resultados obtenidos para el ajuste del sistema.

<b>ión</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>T<sub>r</sub>' (min)</b>	<b>K</b>	<b>α</b>	<b>Rs</b>
<b>Litio</b>	1,00	1,15	1,63	1,36	0,50
<b>Sodio</b>	10,00	1,57	1,19	1,27	0,85
<b>Potasio</b>	1,00	2,87	1,52	1,80	1,44
<b>Magnesio</b>	5,00	5,17	2,75	0,54	0,63
<b>Calcio</b>	10,00	6,19	3,29		

Tr': tiempo de retención

k: capacidad      α: selectividad

Rs: resolución

Aunque los resultados no cumplen con lo especificado, de un valor de *k* mayor a 2, *Rs* mayor a 2, el sistema se aceptó, ya que fue el que mejores resultados ofreció durante la fase de desarrollo.

*Linealidad del sistema.*

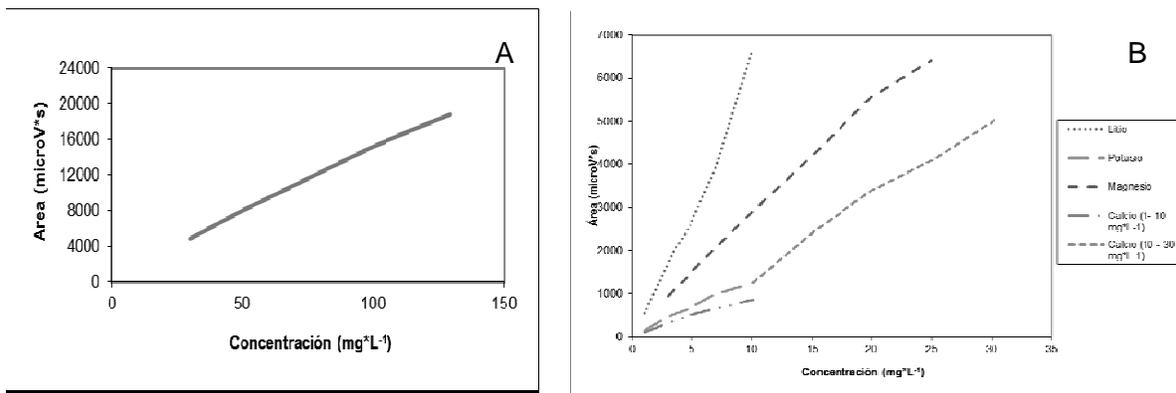
Se analizó la linealidad de los intervalos de concentración establecidos para cada ión. Los estándares fueron analizados por quintuplicado, obteniendo los resultados de las Tablas 33 y 34. A su vez, la Fig. 27 presenta los puntos obtenidos para cada una de las regresiones.

**Tabla 33.** Resultados de linealidad del sistema para los cationes medidos por cromatografía iónica.

<b>ión</b>	<b>Intervalo de concentración (mg/L)</b>	<b>Pendiente (μV*s*L*mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ordenada al origen (μV*s)</b>	<b>Intervalo de confianza de la pendiente (μV*s*L*mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>
<b>Litio</b>	1 – 10	663,57	-360,55	489,70 837,41	0,98
<b>Sodio</b>	10 – 30	139,76	962,21	128,72 150,80	0,99
<b>Potasio</b>	1 - 10	119,96	86,01	94,67 145,25	0,99

**Tabla 34.** Resultados de linealidad del sistema para los cationes medidos por cromatografía iónica.

<b>Ión</b>	<b>Intervalo de concentración (mg/L)</b>	<b>Pendiente (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>Ordenada al origen (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b>Intervalo de confianza de la pendiente (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>Coefficiente de determinación <math>R^2</math></b>
<b>Magnesio</b>	3 – 25	253,63	380,99	218,05 289,21	0,99
<b>Calcio</b>	1 – 10	81,46	69,92	64,76 98,16	0,98
<b>Calcio</b>	10 -30	182,80	-427,03	150,91 214,71	0,99



**Figura 27.** Gráficas obtenidas para la linealidad del sistema de cromatografía iónica. A) Linealidad de sodio y B) linealidad de litio, potasio, magnesio y calcio.

**Especificidad.**

Como se mencionó en la fase de desarrollo, una de las dificultades que se presentó fue que el método no permite la cuantificación de amonio. Por tanto se considera como factor de interferencia para la cuantificación de sodio. Para mostrar que su presencia no afecta la cuantificación del sodio, se probaron por sextuplicado una muestra de agua de mar no adicionada y otra adicionada con una concentración de amonio a  $2,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los resultados se muestran en la Tabla 35. Para éste análisis no se agregó estándar de litio.

**Tabla 35.** Resultados obtenidos para la muestra adicionada (A) y no adicionada (B) para la prueba de especificidad.

	A: Adicionada		C V	B: No adicionada		CV
	Concentración (mg*L <sup>-1</sup> )	Desviación Estándar (mg*L <sup>-1</sup> )		Concentración (mg*L <sup>-1</sup> )	Desviación Estándar (mg*L <sup>-1</sup> )	
<b>Sodio</b>	10864±886	0,02	2,1	10553±904	338,32	3,2
<b>Potasio</b>	369±14	0,84	3,1	367±17	11,43	3,1
<b>Magnesio</b>	1323±103	0,08	1,1	1294±103	27,67	2,1
<b>Calcio</b>	600±33	0,71	4,2	621±36	12,00	1,9

CV: coeficiente de variación

A partir de dichos datos, se realizó un análisis de diferencia entre dos medias por una t de Student considerando un 95,0% de confianza, en donde la regla de decisión establecida indica que no hay diferencia significativa si  $t_{calculada} < t_{tablas}$ . Los resultados se muestran en la Tabla 36. Los cálculos fueron realizados de acuerdo a la ecuación [38] mostrada en el Apéndice 7.4.

**Tabla 36.** Resultados de la prueba de t realizada para la especificidad del sistema.

	t calculada	Grados de Libertad	t de tablas al 95,0 %	Interpretación
<b>Sodio</b>	1,71	7	2,37	no hay diferencia
<b>Potasio</b>	0,25	8	2,31	no hay diferencia
<b>Magnesio</b>	2,09	6	2,45	no hay diferencia
<b>Calcio</b>	1,71			

Por tanto, no hay diferencia si se adiciona amonio, es decir, el amonio no afecta la cuantificación de otros cationes en la muestra.

*Exactitud y repetibilidad del método.*

Para valorar la exactitud del método se colocaron 0,05 mL de muestra de agua de mar en un matraz volumétrico de 10 mL, y se adicionó una cantidad determinada de estándares de litio, sodio, potasio, magnesio y calcio, de modo que se obtuvieran concentraciones similares a las presentes en 0,1 mL. Las

**Implementación de una metodología para el estudio químico de cationes y bicarbonatos en manantiales de Bahía Concepción (Baja California Sur, México)**

**Capítulo IV. Resultados y discusión**

concentraciones adicionadas, las recuperadas, así como su coeficiente de variación y su porcentaje de recobro, se muestran en la Tabla 37. Las concentraciones presentadas se refieren a la dilución. Al igual que para la precisión, fue necesario analizar tanto el agua de mar como el agua de una descarga hidrotermal; para el caso del agua hidrotermal, solo se agregó estándar de calcio y litio.

**Tabla 37.** Resultados de exactitud para una muestra de agua hidrotermal por cromatografía iónica.

Ión		Litio	Sodio	Potasio	Magnesio	Calcio
Agua de mar	Cantidad (mg*L <sup>-1</sup> ) muestra	0,00	52,8±4,2	1,9±0,1	6,3±0,8	2,9±0,1
	Cantidad estándar (mg*L <sup>-1</sup> )	5,0±0,1	51,8±0,8	2,1±0,1	6,5±0,1	2,8±0,3
	Cantidad (mg*L <sup>-1</sup> ) total	5,0±0,1	104,7±5,1	4,0±0,1	12,8±0,1	5,7±0,4
	Cantidad (mg*L <sup>-1</sup> ) medida	5,0±0,4	106,5±4,3	4,0±0,3	12,9±0,7	5,7±0,4
	CV	1,6	2,0	1,6	1,0	1,0
	% R	99,3	101,8	99,0	101,3	100,0
Agua hidrotermal	Cantidad (mg*L <sup>-1</sup> ) muestra	0,00	40,2±3,2	1,5±0,1	2,4±0,3	6,5±0,9
	Cantidad estándar (mg*L <sup>-1</sup> )	5,0±0,1				9,1±0,2
	Cantidad (mg*L <sup>-1</sup> ) total	5,0±0,1	40,2±3,2	1,5±0,1	2,4±0,3	15,5±1,2
	Cantidad (mg*L <sup>-1</sup> ) medida	4,9±0,4	41,0±0,2	1,5±0,2	Fuera de intervalo de cuantificación	15,7±1,6
	CV	1,1	2,0	1,6		0,6
	% R	98,8	101,9	102,0		100,9

CV: coeficiente de variación

% R: porcentaje de recobro

Como puede observarse, el porcentaje de recobro para todos los casos se encuentra entre el 98,0 y 102,0 %, además de que se presenta un coeficiente de

variación menor o igual a 2,0%, por lo que el método se califica como preciso para la cuantificación de cationes en las muestras analizadas.

*Linealidad del método.*

La linealidad del método califica el porcentaje de recobro a tres niveles de concentración de una muestra adicionada, así como la concordancia entre la respuesta y la cantidad del analito. En la Tabla 38 se muestran las cantidades añadidas para los tres niveles de concentración de cada ión, así como la cantidad recuperada y el porcentaje de recobro con el coeficiente de variación. Para el calcio, se utilizaron ambas muestras (agua de mar y agua hidrotermal).

**Tabla 38.** Porcentaje de recobro para tres diferentes niveles de concentración para los iones determinados por cromatografía iónica

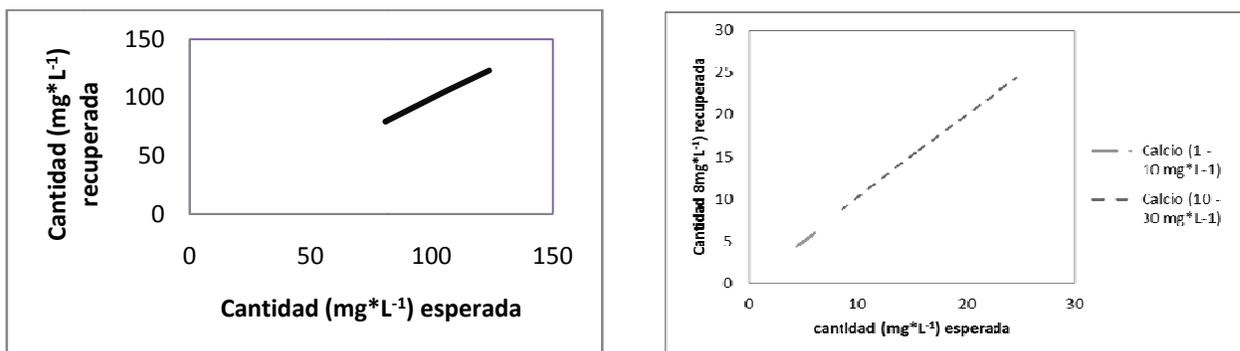
<b>Ión</b>	<b>Cantidad muestra (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cantidad estándar (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cantidad total (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cantidad recuperada (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>% Recobro Promedio/CV</b>
<b>Litio</b>		4,99±0,40	4,99±0,40	4,95±0,20	99,4/0,8
		6,00±0,07	6,00±0,07	5,92±0,49	
		8,00±0,08	8,00±0,08	8,02±0,65	
<b>Sodio</b>	52,83±4,22	26,87±0,27	79,70±4,49	80,91±3,18	101,1/0,4
		51,83±0,58	104,66±4,80	105,62±5,60	
		69,81±0,75	122,64±4,97	123,67±8,82	
<b>Potasio</b>	1,86±0,08	1,05±0,02	2,91±0,10	2,96±0,23	101,4/0,5
		2,12±0,02	3,98±0,10	4,04±0,34	
		2,95±0,03	4,81±0,11	4,85±0,37	
<b>Magnesio</b>	6,28±0,78	3,18±0,04	9,46±0,82	9,69±0,01	101,4/0,9
		6,50±0,08	12,78±0,86	12,89±0,78	
		6,96±0,09	13,24±0,87	13,37±0,88	
<b>Calcio</b>	2,90±0,08	1,39±0,03	4,29±0,11	4,36±0,31	100,7/0,9
		2,78±0,06	5,69±0,14	5,71±0,42	
		3,41±0,07	6,31±0,15	6,31±0,53	
<b>Calcio (agua hidrotermal)</b>	6,48±0,97	2,00±0,08	8,48±1,05	8,72±0,86	101,1/1,9
		9,05±0,38	15,53±1,35	15,73±1,55	
		18,12±0,42	24,60±1,39	24,38±2,40	

La Tabla 39 presenta las pendientes y ordenadas con sus intervalos de confianza, el coeficiente de determinación y el coeficiente de variación para la regresión determinado para cada ión.

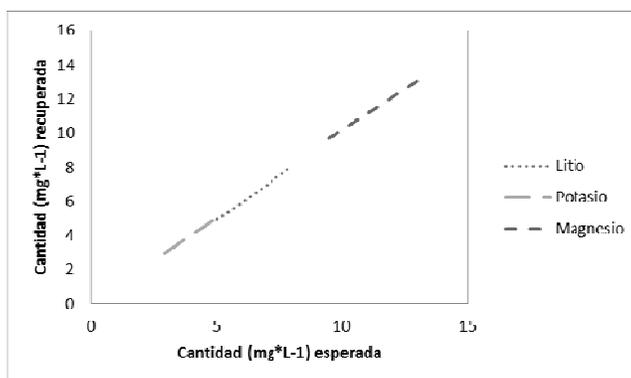
**Tabla 39.** Características de las regresiones lineales obtenidas a partir de la linealidad del método.

<b>Ión</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Intervalo de confianza</b>	<b>Ordenada (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Intervalo de confianza (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>CV</b>
<b>Litio</b>	1,03	0,76 1,29	-0,20	-1,92 1,51	0,99	0,7
<b>Sodio</b>	0,97	0,78 1,16	3,76	-15,57 23,08	0,99	0,4
<b>Potasio</b>	0,99	0,91 1,08	0,06	-0,28 0,39	0,99	0,2
<b>Magnesio</b>	0,97	0,41 1,53	0,44	-3,08 3,97	0,99	0,6
<b>Calcio</b>	0,96	0,84 1,08	0,19	-0,43 0,83	0,99	0,2
<b>Calcio (agua hidrotermal)</b>	0,97	0,82 1,12	2,59	-2,11 3,08	0,99	0,8

Las Fig. 28 y 29 muestran las diferentes gráficas obtenidas para la linealidad del método.



**Figura 28.** Gráficas para la linealidad del método de cromatografía iónica. A) Linealidad del sodio, B) Linealidad del calcio (ambas curvas)



**Figura 29.** Linealidad del método para litio, potasio y magnesio.

De acuerdo a los parámetros obtenidos el método es lineal para todos los casos porque:

- El porcentaje de recobro se encuentra entre el 98,0 y 102,0 % y su coeficiente de variación es menor a 2,0%.
- El intervalo de confianza para la pendiente incluye la unidad.
- El intervalo de confianza para la ordenada incluye el cero.
- El coeficiente de determinación  $R^2$  es mayor al 0,98%.
- El coeficiente de variación para la regresión es menor a 2,0%.

#### *Precisión intermedia.*

Se evaluó la precisión para el sistema entre analistas realizando la cuantificación de la dilución de una muestra de agua de mar a la que se le adicionó estándar de litio a una concentración de  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y la cuantificación del calcio en la muestra de agua hidrotermal. Los valores se obtuvieron por triplicado en dos días diferentes. La Tabla 40 presenta los resultados obtenidos, indicando la concentración en la muestra.

**Tabla 40.** Resultados obtenidos para la cuantificación de los iones por dos analistas.

<b>ión</b>	<b>Concentración (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Desviación Estándar (mg*L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
<b>Litio</b>	201±17	3,62	1,8
<b>Sodio</b>	11153±460	390,35	3,5
<b>Potasio</b>	378±10	13,60	3,6
<b>Magnesio</b>	1332±104	46,62	3,5
<b>Calcio</b>	676±50	26,36	3,9
<b>Calcio (agua hidrotermal)</b>	129406±1263	2070,50	1,6

Aunque el coeficiente de variación es mayor a 2,0 % (a excepción del litio y el calcio en agua hidrotermal), se establece que el método es preciso. La variación entre los valores es causada por varios fenómenos que ocurren entre analistas, como es el aforo en el material de vidrio, así como el uso correcto de las micropipetas, además de que la integración dada por el programa es corregida manualmente. Para obtener un mejor coeficiente de variación, debe capacitarse a los analistas para minimizar este tipo de errores.

#### *Límites de cuantificación y detección.*

Se analizaron 3 estándares por triplicado para cada ión, obteniendo la regresión lineal correspondiente. La Tabla 41 muestra los resultados obtenidos, señalando la pendiente y su intervalo de confianza, la ordenada, el coeficiente de determinación y los límites correspondientes con su incertidumbre asociada.

**Tabla 41.** Límites de detección y cuantificación para el análisis de cationes por cromatografía iónica.

<b>Ión</b>	<b>Pendiente (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>Intervalo de confianza (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}</math>)</b>	<b>Ordenada (<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>LD (<math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>LC (<math>\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>
<b>Litio</b>	549,59	480,47 610,71	-13,68	0,99	0,19±0,002	0,60±0,02
<b>Sodio</b>	156,26	146,50 186,01	59,18	0,99	1,39±0,01	4,23±0,04
<b>Potasio</b>	203,73	198,20 209,26	-80,60	0,99	0,04±0,0001	0,14±0,001
<b>Magnesio</b>	272,22	262,46 281,97	64,07	0,99	0,15±0,001	0,44±0,002
<b>Calcio (1 – 10 mg/L)</b>	120,64	103,96 137,32	43,76	0,99	0,23±0,01	0,70±0,02
<b>Calcio (10 – 30 mg/L)</b>	173,62	157,50 189,73	-399,85	0,99	0,26±0,004	1,77±0,03

$r^2$ : coeficiente de determinación

LD: límite de detección

LC: límite de cuantificación

Dichos límites de detección y cuantificación deben ser tomados en cuenta al analizar una muestra, cuidando que la concentración del ión no sea menor a las mostradas para los límites. Los límites se aceptan, ya que el intervalo para la confianza no incluye el cero y el coeficiente de determinación es mayor a 0,98.

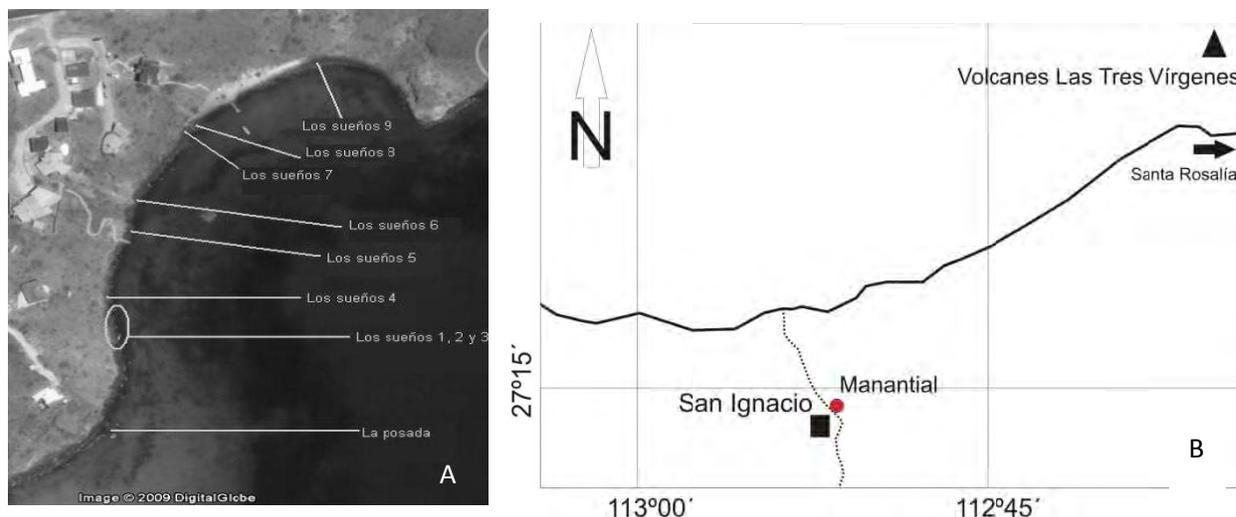
De acuerdo a los resultados obtenidos para la validación del sistema de cromatografía iónica, se tiene que el método establecido para la cuantificación de litio, sodio, potasio, magnesio y calcio es confiable y puede utilizarse para el análisis de muestras de agua hidrotermal con salinidades menores a la del agua de mar, de aproximadamente 3,5 ‰ (w/w), como el caso del agua de mar y muestras de agua dulce con una salinidad menor a 0,05 ‰ (w/w).

Una de las dificultades que se presenta con ésta metodología, es la concentración de sodio en las muestras, pues aunque se consideró una dilución alta para las muestras de agua de mar (1/100), fue la que permitió cuantificar el litio y el potasio. Para el caso del litio, se decidió realizar un método de adición estándar, ya que se amplían las posibilidades de cuantificarlo. A pesar del problema de cuantificación del litio, la gran ventaja con la metodología propuesta es que requiere un pequeño volumen para el análisis de la muestra, además de que se cuantifican los cinco analitos en una misma corrida, por lo que el análisis de la muestra por cromatografía iónica para cationes lleva un tiempo aproximado de 40 minutos (considerando tres repeticiones).

### 4.3 Resultados de las muestras.

#### 4.3.1 Identificación de las muestras.

En la Tabla 42 se muestran los nombres de las muestras obtenidas en el muestreo en la zona de Bahía Concepción, así como la ubicación de las mismas; la Fig. 30 muestra una imagen de la zona de muestreo de las descargas hidrotermales.



**Figura 30.** Mapas que representan las áreas de muestreo de las descargas hidrotermales costeras A), y muestras de agua dulce. Las muestras de agua de mar se tomaron en la zona de la Bahía.

**Tabla 42.** Ubicación de las muestras obtenidas durante el muestreo en Bahía Concepción, en enero del 2009.

<b>Muestra</b>	<b>Tipo</b>	<b>latitud</b>	<b>Longitud</b>
<b>Agua hidrotermal</b>	<b>La Posada</b>	Agua hidrotermal	26°45'32.2"N 111°53'71.7"W
	<b>Los Sueños 1</b>	Agua hidrotermal	26°45'43.5"N 111°53'66.5"W
	<b>Los Sueños 2</b>	Agua hidrotermal	26°45'43.5"N 111°53'66.5"W
	<b>Los Sueños 3</b>	Agua hidrotermal	26°45'43.5"N 111°53'66.5"W
	<b>Los Sueños 4</b>	Agua hidrotermal	26°45'45.9"N 111°53'66.2"W
	<b>Los Sueños 5</b>	Agua hidrotermal	26°45'45.5"N 111°53'66.1"W
	<b>Los Sueños 6</b>	Agua hidrotermal	26°45'46.5"N 111°53'66.1"W
	<b>Los Sueños 7</b>	Agua hidrotermal	26°45'46.6"N 111°53'61.0"W
	<b>Los Sueños 8</b>	Agua hidrotermal	26°45'49.4"N 111°53'74.7"W
	<b>Los Sueños 9</b>	Agua hidrotermal	26°45'51.5"N 111°53'57.6"W
<b>Agua de mar</b>	<b>Agua de mar I</b>	Agua de mar	26°43'22.2"N 111°53'6.6"W
	<b>Agua de mar II</b>	Agua de mar	26°45'32.2"N 111°53'71.7"W
	<b>Agua de mar III</b>	Agua de mar	26°43'22.2"N 111°53'6.6"W
<b>Agua dulce</b>	<b>La Trinidad</b>	Agua dulce	26°49'56"N 111°44'16"W
	<b>San Ignacio</b>	Agua dulce	27°14'17"N 112°51'58"W
	<b>Río Mulegé</b>	Agua dulce	26°53'06"N 111°59'11"W
	<b>Mulegé manglar</b>	Agua dulce	26°45'30"N 111°53'41"W

#### 4.3.2 Parámetros fisicoquímicos.

En la Tabla 43 se muestran los parámetros fisicoquímicos determinados en campo para cada muestra, como son: temperatura, pH, conductividad y sólidos totales disueltos (STD).

**Tabla 43.** Determinación de los parámetros fisicoquímicos para las muestras en campo

Muestra		Temperatura (°C)	pH	Conductividad (mS*cm <sup>-1</sup> )	STD (g*L <sup>-1</sup> )	Salinidad ‰
Agua hidrotermal	La Posada	49,2	7,25	57,21	28,6	21,8
	Los Sueños 1	56,1	7,69	51,6	25,8	21,8
	Los Sueños 2	56,4	6,80	51,8	25,9	23,0
	Los Sueños 3	52,3	6,33	40,1	20,0	18,5
	Los Sueños 4	55,7	6,83	49,6	24,8	22,1
	Los Sueños 5	50,9	7,18	46,5	23,2	22,0
	Los Sueños 6	50,1	6,76	51,0	25,5	23,2
	Los Sueños 7	40,6	7,32	46,6	23,2	21,8
	Los Sueños 8	57,4	7,36	50,6	25,3	22,9
	Los Sueños 9	42,5	7,33	50,6	25,3	24,0
Agua de mar	Agua de mar I	19,0	8,51	65,0	32,5	34,1
	Agua de mar II	19,0	8,01	35,0	17,5	38,0
	Agua de mar III	19,0	8,49	64,3	32,2	36,0
Agua dulce	La Trinidad	19,0	8,54	2,4	1,2	1,2
	San Ignacio	19,0	7,99	1,3	0,6	0,6
	Río Mulegé	19,0	8,00	1,9	0,9	0,9
	Mulegé	19,0	7,90	1,3	0,6	0,6
	manglar					

STD: sólidos totales disueltos.

‰:partes por mil

### 4.3.3 Determinación de bicarbonato.

La Tabla 44 muestra los resultados para la concentración de bicarbonato determinados tanto por volumetría directa, como por volumetría en retroceso, con sus respectivas incertidumbres.

**Tabla 44.** Resultados obtenidos para el bicarbonato presente en las muestras.

Muestra		Concentración obtenida por volumetría en retroceso ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración obtenida por volumetría directa ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
Agua hidrotermal	La Posada	84,58±7,81	82,05±7,58
	Los Sueños 1	84,58±7,81	88,37±8,16
	Los Sueños 2	84,58±7,81	88,37±8,16
	Los Sueños 3	66,46±6,14	75,74±6,99
	Los Sueños 4	84,58±7,81	88,37±8,16
	Los Sueños 5	114,79±10,60	94,68±8,74
	Los Sueños 6	102,71±9,48	107,30±9,91
	Los Sueños 7	84,58±7,81	88,37±8,16
	Los Sueños 8	78,54±7,25	82,05±7,58
	Los Sueños 9	84,58±7,81	100,99±9,32
Agua de mar	Agua de mar I	175,20±16,17	195,67±18,06
	Agua de mar II	108,75±12,22	151,48±13,98
	Agua de mar III	112,78±11,16	151,48±13,99
Agua dulce	La Trinidad	193,33±17,85	183,04±16,90
	Río Mulegé	237,64±22,30	259,84±24,08
	Mulegé manglar	265,83±24,53	246,16±22,72
	San Ignacio	420,90±39,68	372,39±34,38

Como puede observarse, existen discrepancias entre los valores; esto se debe a que la cuantificación por volumetría directa se realizó *in situ*, mientras que la cuantificación por volumetría en retroceso se realizó tiempo después; esto refleja lo comentado anteriormente tanto por la NMX-AA-036-SCFI-2001 como por el presente trabajo. Debe considerarse también que la concentración de bicarbonato está relacionada con la temperatura y pH, ya que de ello depende la solubilidad del dióxido de carbono en el fluido, así como la distribución de las diferentes especies carbonato/bicarbonato. El ácido carbónico por lo regular se pierde en forma de gas.

#### 4.3.4 Determinación de cationes

*Determinación de cationes por cromatografía iónica.*

Las muestras obtenidas se analizaron por el método de cromatografía iónica, obteniendo los datos mostrados en la Tabla 45.

**Tabla 45.** Concentraciones determinadas para los cationes analizados

Muestra		Concentración (mg*L <sup>-1</sup> )				
		Litio	Sodio	Potasio	Magnesio	Calcio
Agua hidrotermal	La Posada	25±2	7364±276	361±28	319±18	1233±122
	Los Sueños 1	6±1	6789±257	336±27	351±20	1104±109
	Los Sueños 2	12±1	6882±260	320±25	396±23	992±98
	Los Sueños 3	20±2	8037±303	311±25	447±25	1225±122
	Los Sueños 4	2±0,2	6871±258	332±26	355±20	1060±105
	Los Sueños 5	11±1	4002±153	184±15	196±12	640±64
	Los Sueños 6	6±1	8432±322	410±33	481±27	1252±125
	Los Sueños 7	6±1	7556±308	402±32	315±18	1299±128
	Los Sueños 8	21±2	7742±296	390±32	405±23	1197±118
	Los Sueños 9	7±1	8183±310	404±32	535±30	1170±115
Agua de mar	Agua de mar I	3±0,2	12221±465	384±30	1475±82	497±38
	Agua de mar II	17±1	11761±445	415±33	1391±77	542±41
	Agua de mar II	10±1	11634±448	422±33	1474±82	570±44
Agua dulce	La Trinidad	1±0,1	430±17	15±1	99±6	68±7
	San Ignacio	1±0,1	153±169	6±1	60±3	71±7
	Río Mulegé	1±0,1	248±10	8±1	74±4	100±10
	Mulegé Manglar	1±0,1	230±9	9±1	71±4	109±11

*Determinación por cationes por otras metodologías.*

Para verificar que el método es adecuado para la cuantificación de litio, sodio, potasio, magnesio y calcio, se determinaron los iones en las muestras por dos métodos diferentes: flamometría y volumetría por complejos. La flamometría ha sido empleada como método de rutina en el Laboratorio 3D de la Facultad de

Química, mientras que la volumetría por complejos ha sido utilizada durante mucho tiempo (Vogel, 1978).

La Tabla 46 muestra los resultados obtenidos por el método de flamometría y volumetría de complejos para los cationes analizados en las muestras.

**Tabla 46.** Concentraciones obtenidas por flamometría y volumetría por complejos.

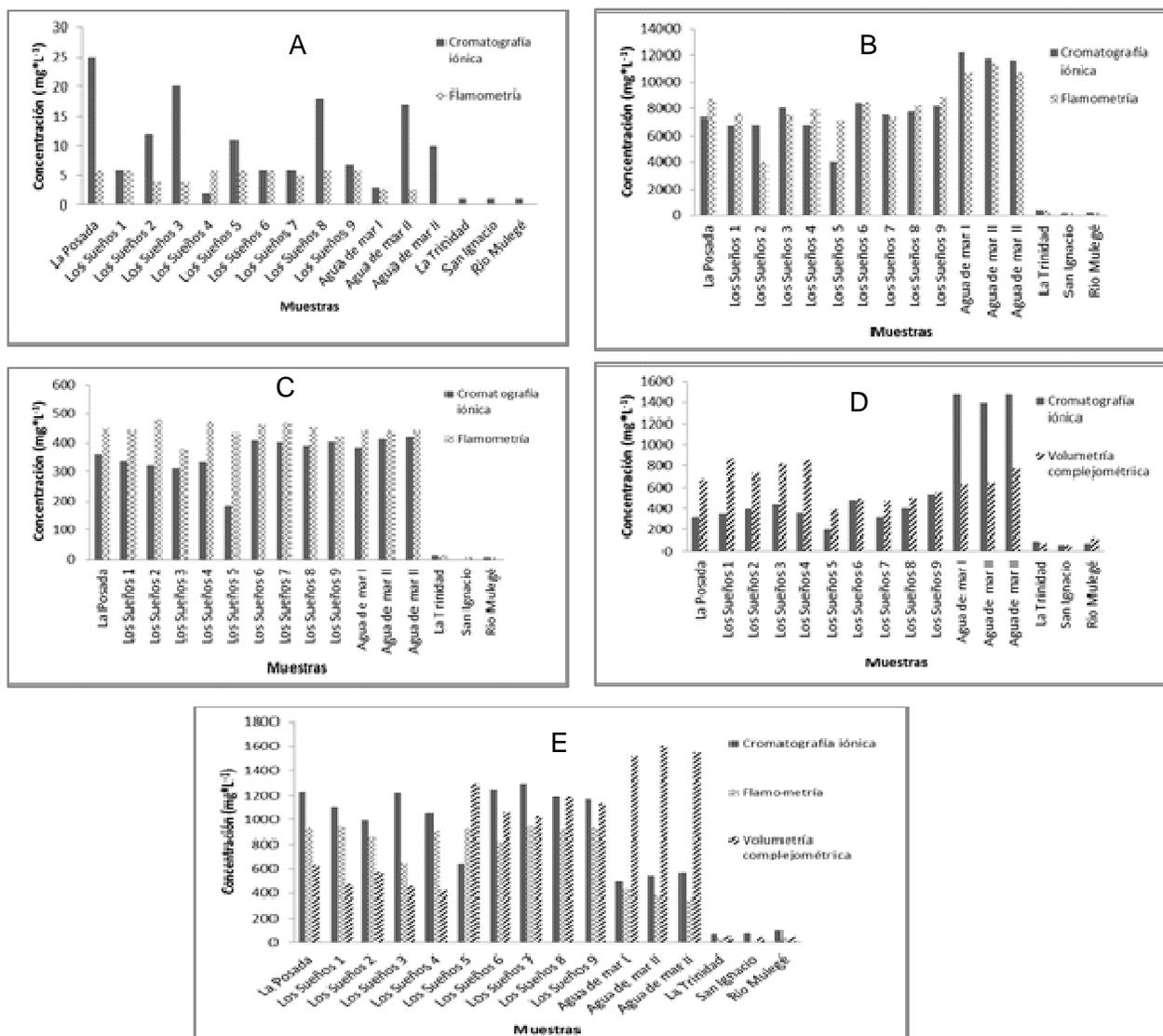
	Flamometría				Volumetría por complejos	
	Litio (mg*mL <sup>-1</sup> )	Potasio (mg*L <sup>-1</sup> )	Calcio (mg*L <sup>-1</sup> )	Sodio (mg*L <sup>-1</sup> )	Calcio (mg*L <sup>-1</sup> )	Magnesio (mg*L <sup>-1</sup> )
<b>La posada</b>	6±1	447±45	929±38	8781±306	6293±809	680±1867
<b>Los sueños 1</b>	6±1	443±45	941±40	7575±521	473±809	871±2495
<b>Los sueños 2</b>	4±1	478±48	859±38	3982±156	573±1080	730±2519
<b>Los sueños 3</b>	4±1	379±38	647±24	7530±263	454±777	816±2360
<b>Los sueños 4</b>	6±1	471±48	908±33	7930±281	420±719	856±2360
<b>Los sueños 5</b>	6±1	433±44	928±36	7198±251	1300±1338	392±2034
<b>Los sueños 6</b>	6±1	461±47	819±31	8471±294	1062±1817	496±3066
<b>Los sueños 7</b>	5±1	464±47	945±41	7362±292	1029±1759	476±2961
<b>Los sueños 8</b>	6±1	450±46	915±36	82221±284	1246±2131	502±3457
<b>Los sueños 9</b>	6±0,73	424±43	932±38	8890±306	1135±1941	559±3326
<b>Agua de mar I</b>	2,69±0,34	441±44	431±17	10750±375	1519±3905	629±6380
<b>Agua de mar II</b>	2,64±0,33	441±45	381±14	11396±398	1606±4129	642±6686
<b>Agua de mar III</b>	2,76±0,35	440±1	359±15	108089±378	1548±3980	772±6845
<b>La Trinidad</b>	0,22±0,03	15±2	31±1	420±15	48±35	79±102
<b>Sn Ignacio</b>	0,14±0,02	9±1	10±0,4	171±6	41±36	65±100
<b>Mulegé manglar</b>	0,15±0,02	8±1	38±1	237±8	43±45	126±186

Al comparar los resultados obtenidos para ambas metodologías (Fig. 31) se observan discrepancias entre los valores obtenidos. Debe tomarse en cuenta que, al contrario de la metodología de cromatografía iónica, tanto la técnica de flamometría como volumetría por complejos no ha sido validada, y tampoco se conoce si es adecuada para la cuantificación de cationes en agua salina, ya que la matriz presenta una gran cantidad de componentes que pueden provocar interferencia en el intervalo de lectura.

**Implementación de una metodología para el estudio químico de cationes y bicarbonatos en manantiales de Bahía Concepción (Baja California Sur, México)**

**Capítulo IV. Resultados y discusión**

El magnesio fue cuantificado por volumetría de complejos; un problema con esta técnica es la interferencia del calcio para la cuantificación del calcio, por lo que se realizó la titulación utilizando dos indicadores: calcon (específico para calcio) y Negro de eriocromo T. En la cuantificación del calcio utilizando como indicador el calcon, la muestra debe mantenerse a un pH mayor a 12,3 para evitar la interferencia del magnesio, al permanecer en forma de precipitado.



**Figura 31.** Gráficas de comparación de metodologías para la cuantificación de cationes. A) Litio; B) Sodio; C) Potasio; D) Magnesio; E) Calcio

Al comparar los datos de la Fig. 31D, se observa que para el caso de las muestras de agua de mar, la diferencia en la cuantificación de magnesio por cromatografía iónica y por volumetría por complejos es considerablemente más baja. Si se observa el caso del calcio en la Fig. 31E para las mismas muestras, ocurre el caso contrario, el ión presenta una mayor concentración por volumetría por complejos que por cromatografía iónica. En ambas figuras se observa la interferencia del ion magnesio para la cuantificación de calcio y viceversa.

A su vez, en el caso del calcio se observan las tendencias para los tres métodos. La gráfica muestra discrepancias entre las concentraciones obtenidas para las tres técnicas; esto es de suma importancia para la veracidad de los resultados; nótese en las tablas 43 y 44 que las incertidumbres son muy diferentes, y la que presenta un menor valor es la correspondiente a la metodología de cromatografía iónica, lo que la hace más confiable.

Lo mismo se tiene para el litio (Fig. 31A), en donde las diferencias entre concentraciones son altas. Al igual que el caso anterior, la incertidumbre para la cromatografía es menor. Sin embargo, puede considerarse un balance iónico con la cuantificación de aniones en las muestras para corroborar los resultados, lo cual está fuera de los objetivos de este trabajo.

Al comparar las tres metodologías, se puede deducir que la más indicada para la cuantificación de los iones litio, sodio, amonio, potasio, magnesio y calcio es por el método validado de cromatografía iónica, en donde, además de acelerar el proceso de análisis, se tiene una mayor especificidad y sensibilidad, reflejada a su vez en los valores asignados de incertidumbre.

En cuanto a los resultados de las concentraciones de los iones para las diferentes muestras, puede observarse que, exceptuando el litio, los otros cationes presentan una relación con su origen, así como una relación con la salinidad estudiada en campo (Tabla 41). Aquellas muestras que presentan una salinidad mayor (agua de

mar) presentan una mayor concentración de iones (Fig. 31), mientras que las que tienen una salinidad baja, la concentración de iones es la menor. Puede observarse que el agua hidrotermal tiene una gran influencia del agua de mar con la que tiene contacto en la zona costera, ya que sus niveles de concentración de los cationes superan por mucho las del agua dulce.

En cuanto a iones específicos, aquellas muestras provenientes de descargas hidrotermales presentan una mayor cantidad de calcio (Villanueva E, 2007) (Fig. 31E), mientras que el agua de mar presenta una mayor cantidad de magnesio (Fig. 31D).

De esta manera, se hace más sencillo la clasificación de una muestra de agua debido a su contenido de bicarbonato, litio, sodio, potasio, magnesio y calcio, permitiendo así, junto con los resultados obtenidos por pruebas independientes, el establecimiento de modelos geoquímicos para las descargas analizadas.

# **CAPÍTULO V**

## **CONCLUSIONES**

Se desarrollaron y validaron dos métodos de cuantificación de bicarbonato y un método de cromatografía iónica para la cuantificación de cationes en muestras de descargas hidrotermales, de acuerdo a lo establecido en la Guía de Validación (García, et al., 2002). Los métodos establecidos se ajustaron al tipo de muestra para auxiliar en el establecimiento de modelos geoquímicos de descargas hidrotermales costeros.

Cada metodología presentada aquí tiene sus características particulares, lo que dio lugar a diferentes parámetros de validación, así como los criterios utilizados para considerar el sistema como adecuado para un propósito en específico.

De acuerdo a la naturaleza compleja de la muestra, es difícil determinar la influencia de todos componentes para la cuantificación de los analitos de interés, por lo que la especificidad de los métodos se convierte en un parámetro vital para su desarrollo. La cuantificación diferencial de sodio y amonio también se ve afectada por la matriz y las características químicas de los iones, por lo que el amonio se retiró del análisis.

Para realizar una comparación acerca del origen, se utilizaron tres muestras de agua de mar y cuatro muestras de agua dulce obtenidas en los alrededores de Bahía Concepción, las cuales fueron utilizadas como control para la interpretación de resultados.

#### *Cuantificación de bicarbonato.*

El desarrollo y la validación de las dos metodologías empleadas para el análisis de bicarbonato (volumetría directa y volumetría por retroceso), se realizaron tomando en cuenta el trabajo en campo, lo que demanda el transporte de los instrumentos y los reactivos, así como la adaptación a condiciones variables.

Por ello, se buscaron materiales resistentes, que puedan transportarse a la zona de muestreo; también se redujo la cantidad de reactivo necesario, por lo que el ácido, el indicador y la base pueden transportarse fácilmente en frascos de plástico de 150 mL, disminuyendo la probabilidad de derrames. La micropipeta puede llevarse con facilidad, siempre llevando un control de su calibración antes del trabajo en campo para evitar errores en los volúmenes descargados. Los indicadores pueden transportarse en frascos gotero.

Ambos procedimientos establecidos pueden utilizarse con alta confiabilidad, debido a que aprobaron las pruebas de la validación, siempre y cuando se ponga especial atención en aquellos pasos críticos, como es la toma de la muestra, el volumen descargado y las concentraciones del titulante. La metodología de volumetría por retroceso presenta una ventaja al cuantificar bicarbonato en descargas de agua caliente, ya que evita el proceso de calentamiento para retirar el dióxido de carbono formado.

Al cuantificar el ión en las muestras durante el trabajo en campo, debe evitarse el contacto con el medio ambiente por un tiempo prolongado, debido a que al bajar la temperatura del fluido muestreado, se altera el pH de la muestra y por tanto el equilibrio en el sistema  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ , además de permitir una mayor disolución del  $\text{CO}_2$  ambiental. No debe de olvidarse que la prueba de la fenolftaleína, en la que se prueba la presencia de carbonato, es importante para una cuantificación más confiable, evitando la cuantificación de carbonato como bicarbonato.

#### *Cuantificación de litio, sodio, potasio, magnesio y calcio.*

Se desarrollo un método para la cuantificación de litio, sodio, potasio, magnesio y amonio en descargas hidrotermales de la zona de Bahía Concepción, Baja California Sur, México. El amonio fue retirado del análisis debido al problema de

cuantificación en presencia de altas concentraciones de sodio. Durante la corrida cromatográfica, el pico resultante de la concentración de sodio se traslapa con el correspondiente al amonio.

El método desarrollado mostró ser confiable para la cuantificación de los iones litio, sodio, potasio, magnesio y calcio presentes en las muestras de agua hidrotermal, además de poder ser usado para agua dulce o agua de mar, con una salinidad menor a 3.5 ‰, realizando una dilución en los casos en que la concentración del sodio sea alta (mayor a  $130 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Es importante hacer énfasis en que la cantidad de sodio limita las posibilidades de desarrollo del método; sin embargo, se realiza su cuantificación debido a que es el catión de más alta concentración en las muestras de agua, de la más alta a la más baja salinidad.

El método propuesto posibilita la determinación del sodio junto a la determinación de otros cationes presentes en la muestra de forma precisa y selectiva, en un tiempo de análisis corto con el gasto mínimo de muestra, así como una menor producción de residuos. Debe recordarse que, para un método validado, debe realizarse una verificación continua del desempeño, así como una revalidación cuando se tiene un mantenimiento en los equipos, o un cambio de columna, así como un cambio en el lote de los estándares.

Ya que se utiliza un método de cromatografía iónica sin supresión, la fase móvil debe estar preparada de forma homogénea, ya que un cambio de conductividad puede dar lugar a variaciones en la retención de los cationes así como un cambio en las concentraciones determinadas.

La cuantificación de cationes en muestras de descarga hidrotermal es importante para el establecimiento de un modelo geoquímico de la muestra, ya que brinda una idea acerca del origen de la misma, así como su interacción con el medio

circundante al relacionar las concentraciones de los iones con el origen de la muestra y sus parámetros físico – químicos.

#### *Muestreo.*

El trabajo de campo implica una organización en la recolección, ubicación geográfica, determinación de parámetros físico químicos y de bicarbonatos. La identificación de muestras evita su pérdida así como confusiones al momento de hacer los análisis correspondientes.

La filtración de muestras para la cuantificación de cationes evita que la columna utilizada se desgaste por la presencia de contaminantes sólidos; las muestras destinadas a parámetros físico – químicos y bicarbonato no requieren filtrarse, pues las determinaciones se hacen al momento de la muestra. El material utilizado para la cuantificación debe enjuagarse con agua desionizada al cambiar de muestra, para evitar la contaminación y errores en los resultados.

El multiparámetro debe calibrarse para la determinación de parámetros físico – químicos, ya que son la base para la interpretación de los resultados posteriores de análisis cuantitativo.

#### *Comparación con otras metodologías (cuantificación de cationes).*

La determinación de litio, sodio, potasio y calcio por flamometría tienen como ventaja la alta sensibilidad del equipo, ya que detecta cantidades muy pequeñas de los iones. El problema con este método es que la calibración debe realizarse de forma continua, ya que la flama del equipo es variable. Para el caso del sodio, se requiere una dilución muy alta para su cuantificación, ya que el método detecta al ión en un rango de concentración de 2 a 10 mg\*L<sup>-1</sup>. Es de considerarse que dicho

método no ha sido adecuado para la cuantificación en descargas de agua hidrotermal, en donde la interferencia de la matriz es relevante.

La cuantificación de calcio y magnesio por volumetría por complejos, presenta el problema de que el magnesio es interferente para la determinación de calcio con el indicador específico calcon, lo que se refleja al obtener su propia concentración, resultando en una concentración menor a la real.

Por tanto, se encontró que la mejor opción para la cuantificación de litio, sodio, potasio, magnesio y calcio en descargas hidrotermales calientes es la realizada por medio de cromatografía iónica sin supresión, cuyo método se desarrolló y validó exitosamente.

# **CAPÍTULO VI**

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Blanco Florido, D. 2007. Caracterización de las mineralizaciones asociadas a manantiales hidrotermales Costeros en Bahía Concepción, Baja California Sur. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ingeniería, UNAM, 55 pp.
2. Brand. 2010. Manual de operación Bureta Digital III. Brand & Co.
3. Canet, C., Prol-Ledesma, R.M., 2006. Procesos de mineralización en manantiales hidrotermales submarinos someros. Ejemplos de México. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. Tomo LVIII (1): 83-102.
4. Canet, C., Prol-Ledesma, R.M., Proenza, *et al.* 2005a. Mn-Ba-Hg mineralization at shallow submarine hydrothermal vents in Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Chemical Geology*, 224: 96-112.
5. Canet, C., Prol-Ledesma, R.M., *et al.* 2005b. Silica-carbonate stromatolites related to coastal hydrothermal venting in Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Sedimentary Geology*, 174: 97-113.
6. Cardigos, F., Colaço, A., Dando, P.R., *et al.* 2005. Shallow water hydrothermal vent field fluids and communities of the D. João de Castro Seamount (Azores). *Chemical Geology*, 224 (1-3): 153-168.
7. Guardado Pérez, J.; Mercader Trejo, F. 2005. Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. 2ª edición, Traducción de la obra original en inglés: The fitness of purpose of analytical methods, de Eurachem. CENAM, México, 67 pp.
8. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2004. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Vol 1, 8ª edición. Secretaría de salud, México.
9. Dosal Gómez, M. A.; Adelina, M. P.; Sandoval, R. 2007. Manual de Química Analítica Experimental 1. Facultad de química, UNAM, México.
10. Faure, G. 1991. Principles and applications of inorganic geochemistry: A comprehensive textbook for geology students. 2<sup>nd</sup> edition, MacMillan Publishing, New York, 626 pp.

11. Feinberg, M. 2007. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of Chromatography A*, 1158; 174–183.
12. Jenway, 2008. Flame Photometer PFP7 Operating and Service Manual.
13. Fritz, J.; D. Gjerde. 2009. *Ion Chromatography*. 4<sup>th</sup> edition, Wiley – VCH, Germany, 377 pp.
14. Garcia, A.; Soberón, E., *et al.* 2002. *Metodos analíticos: Guía de Validación*. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C., México.
15. German, C.R., Von Damm, K.L., 2004. Hydrothermal Processes. En: *The Oceans and Marine Geochemistry: Treatise on Geochemistry*, Elderfield, H. Elsevier, Amsterdam, Heidelberg. 6: 181-222.
16. Grace. 2009. Catálogo de productos para cromatografía.
17. HACH. 2000. Manual de Operación Multiparámetro SensION1.
18. Harris, D. 2007. *Análisis químico cuantitativo*. 3a edición en español, Reverté, España, 744 pp.
19. Herzig, P.M., Hannington, M.D., 2000. Polymetallic Massive Sulfides and Gold Mineralization at Mid-Ocean Ridges and in Subduction-Related Environments. En: Cronan, D.S. (Ed.). *Handbook of Marine Mineral Deposits*. CRC Marine Science Series, 17. CRC Press: Boca Raton, FL (USA).
20. Libes, S. 2009. *Introduction to marine biogeochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed, Elsevier, USA, 2009, 909 pp.
21. Lund, J.W., Freeston, D.H., Boyd, T.L., 2005. Direct application of geothermal energy. *Worldwide review*. *Geothermics*, 34: 691-727.
22. Merchand Reyes, G.; Villanueva Estrada, R.E., *et al.* 2008. Determinación de elementos mayores en descargas hidrotermales costeras utilizando cromatografía iónica. Simposio Nacional de Metrología, CENAM, Santiago de Querétaro, México.
23. Navidi, W. 2006. *Estadística para ingenieros y científicos*. Mc Graw Hill, México, 868 pp.
24. Nicholson, K. 1993. *Geothermal Fluids*. Springerlink, Berlin, 259 pp.

25. NMX – AA - 036- SCFI – 2001. “Análisis de agua – Determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba”. Secretaría de economía, México.
26. Papadoyannis, I.; Samanidou, V. 2005. Ion Chromatography principles: suppressed and nonsuppressed. Encyclopedia of Chromatography. 2<sup>nd</sup> edition, Taylor & Francis, U. S. A., pp. 859- 864.
27. Pichler, T., Veizer, J., 1999. Precipitation of Fe(III) oxyhydroxide deposits from shallow-water hydrothermal fluids in Tutum Bay, Ambitle Island, Papua New Guinea. Chemical Geology, 162: 15-31.
28. Prol-Ledesma; R. M., Canet, C., *et al.* 2002a. Vent fluid origin in the Punta Mita Coastal submarine hydrothermal system, Mexico. GSA Annual Meeting, Denver, USA, 27-30.
29. Prol-Ledesma, R.M.; Canet, C., *et al.* 2002b. Cinnabar deposition in submarine coastal hydrothermal vents, Pacific Margin of Central Mexico. Economic Geology, 97: 1331-1340.
30. Prol-Ledesma, R.M.; Canet, C., *et al.* 2004. Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, México. Journal of Volcanology and Geothermal Research. 137: 311-328.
31. Prol-Ledesma, R.M., Canet, C., *et al.* 2010. Morphology of pyrite in particulate matter from shallow submarine hydrothermal vents. American Mineralogist, 95: 1500-1507.
32. Prol-Ledesma, R.M., Dando, P.R., de Ronde, C.E.J., 2005. Special issue on “shallow-water hydrothermal venting. Chemical Geology, 224: 1-4.
33. Rodríguez, A. 2009. Metalogenia del Área Mineralizada en Manganeso de Bahía Concepción, Baja California Sur. Tesis de maestría. Instituto de geofísica, UNAM, 210 pp.
34. Rodríguez, J. M. 2009. Presentaciones para el curso de Desarrollo Analítico. Formato electrónico.
35. Queré, A. 2007. Introducción al Laboratorio de Química Analítica Experimental. Facultad de Química, UNAM, México, 64 pp.

36. Rouessac, F.; Rouessac, A. 2003. Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas. Mc Grw – Hill – Interamericana, España, 441 pp.
37. Sandoval, R. 2009. La ecuación de Charlot. Archivo electrónico.
38. Speiss, F.N.; McDonald, K.C., *et al.* 1989. East Pacific Rise-hot springs and geophysical experiments on the East Pacific Rise. *Science*, 207: 1421-1433.
39. Tarasov, V.G., Gebruk, A.V., Mironov, A.N., Moskalev, L.I., 2005. Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: Two different phenomena? *ChemicalGeology*, 224 (1-3): 5-39.
40. Tunnicliffe, V., 1992. The Nature and Origin of the Modern Hydrothermal Vent Fauna. *Palaios*, 7 (4): 338-350.
41. Vidal, V.M.V., Vidal, F.V., 1981. Coastal Submarine Hydrothermal Activity off Northern Baja California 2. Evolutionary History and Isotope Geochemistry. *Journal of Geophysical Research*, 86(B10): 9451-9468.
42. Villanueva Estrada, R. E. 2007. Procesos geoquímicos en las manifestaciones hidrotermales ubicadas en zonas intermareales y submarinas de las costas de Bahía Concepción (Baja California Sur) y Punta Mita (Nayarit). Tesis de doctorado. Instituto de Geofísica, UNAM, México, 123 pp.
43. Villanueva E. 2008. Geoquímica de Sistemas Hidrotermales Dominados Por agua de Mar y agua Meteórica. Archivo electrónico.
44. Villanueva G., Pedro. 2006. Notas de volumetría ácido base.
45. Vogel. 1978. Textbook or quantitative inorganic analysis. 4<sup>th</sup> edition, Longman, Great Britain, 925 pp.

# **CAPÍTULO VII**

## **APÉNDICES**

## **7.1 Calibración de material**

“La calibración de los recipientes volumétricos de vidrio para laboratorio consiste en determinar el volumen de agua contenida o entregada por el recipiente” (Harris, 2007); para ello, puede utilizarse un método gravimétrico, en el que se pesa la masa del agua contenida por el instrumento de vidrio y se toma en cuenta la densidad del agua a la temperatura ambiente. A continuación se muestra la metodología empleada para la calibración del material volumétrico utilizado.

a) Bureta digital y micropipetas.

De acuerdo al instructivo del fabricante (Brand, 2010), la bureta digital debe de calibrarse de la siguiente manera:

- Utilizar agua destilada. EL agua desionizada se utilizó presenta una resistividad de  $18 \Omega \text{m} \cdot \text{cm}$  con un equipo PURELAB UHQ II de la marca Elga.
- Medir la temperatura del agua y llenar el instrumento evitando la presencia de burbujas en el tubo contenedor.
- Purgar dejando caer las primeras cinco gotas. En un vaso limpio y seco, vaciar el contenido de la bureta en su totalidad, al 50% y a un 10%, procurando que el vaciado se realice de forma continua para cada descarga.
- Pesar el volumen descargado en la balanza analítica tarada previamente con el vaso de precipitados.
- Repetir el paso anterior 10 veces para cada volumen, y transformar el peso a volumen de acuerdo a la tabla de factor de corrección especificada por el proveedor (Brand, 2010).
- Obtener el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación de las medidas.
- Indicar en la bureta digital el volumen real descargado obtenido por la calibración anterior.

La Tabla 47 muestra el resultado de la calibración de las micropipetas y de la bureta digital. Las incertidumbres combinadas al 95 % de confianza se obtienen a partir de lo siguiente:

$$\frac{U_v}{V} = \sqrt{\left(\frac{U_{\text{termómetro}}}{\text{Temperatura}}\right)^2 + \left(\frac{U_{\text{balanza}}}{\text{Peso}}\right)^2 + \left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad [18]$$

U: Incertidumbre

V: volumen

D.E.: desviación estándar

N: número de repeticiones

**Tabla 47.** Tabla que presenta las incertidumbres al 95 % de confianza, asociadas a las buretas y pipetas mostrando el valor al 100, 50 y 10 % de capacidad de cada instrumento.

	<b>Buretas</b>			<b>Micropipetas</b>			
	10,0 mL	25,0 mL	50,0 mL (digital)	Hamilton 0,1 – 1,0 mL	Hamilton 0,01 – 0,1 mL	Transferpette 0,1 -1,0 mL	Transferpette 0,02 – 0,2 mL
<b>Descargado al 100%</b>	10,01	24,97	49,75	1,01	0,10	0,99	0,20
<b>Desviación Estándar</b>	0,01	0,05	0,05	0,001	0,002	0,01	0,002
<b>% Coeficiente de variación</b>	0,1	0,2	0,1	0,1	2,0	0,7	0,8
<b>Incertidumbre al 95 %</b>	0,09	0,79	0,01	0,001	0,0003	0,01	0,0003
<b>% Incertidumbre al 95 %</b>	0,9	3,1	0,03	0,1	0,3	0,5	0,2
<b>Descargado al 50%</b>	5,01	12,44	24,76	0,51	0,05	0,50	0,10
<b>Desviación Estándar</b>	0,02	0,02	0,03	0,002	0,0002	0,003	0,0003
<b>% Coeficiente de variación</b>	0,5	0,2	0,1	0,4	0,4	0,6	0,3
<b>Incertidumbre al 95 %</b>	0,07	0,19	0,02	0,001	0,0003	0,001	0,0003
<b>% Incertidumbre al 95 %</b>	1,4	1,5	0,4	0,1	0,6	0,2	0,3
<b>Descargado al 10%</b>	1,01	2,50	4,81	0,12	0,01	0,10	0,02
<b>Desviación Estándar</b>	0,03	0,04	0,03	0,01	0,0003	0,001	0,0003
<b>% Coeficiente de variación</b>	2,7	1,4	0,6	4,1	3,0	1,3	1,6
<b>Incertidumbre al 95 %</b>	0,02	0,06	0,09	0,001	0,0003	0,0003	0,0003
<b>% Incertidumbre al 95 %</b>	1,7	2,2	0,4	0,4	2,9	0,3	1,6

b) Material volumétrico de vidrio.

Para el caso de material contenedor (como matraces volumétricos), es necesario medir el peso del material vacío y llenado al aforo para conocer el peso del agua contenida, mientras que para el material de descarga (como pipetas), únicamente se descarga el contenido sobre algún recipiente y se mide el peso del agua.

Para ello, se realizó el proceso de medición 10 veces, tomando en cuenta que una de las fuentes de error es debida a la repetibilidad de la medición, a su vez, es necesario el registro de la temperatura del agua empleada.

Los resultados obtenidos fueron se aprecian en la Tabla 48. Para los matraces con capacidad mayor a 50 mL no es posible hacer esta determinación, por lo que se utiliza la incertidumbre dada por el fabricante.

**Tabla 48.** Incertidumbres expandidas obtenidas mediante el método gravimétrico para pipetas y matraces volumétricos.

	<b>Volumen descargado promedio (mL)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>% CV</b>	<b>Incertidumbre al 95 %</b>	<b>% incertidumbre al 95 %</b>
<b>Pipetas</b>					
25,0 mL	24,96	0,01	0,1	0,18	0,7
10,0 mL	9,97	0,03	0,3	0,01	0,1
5,0 mL	4,99	0,01	0,3	0,10	2,0
2,0 mL	2,00	0,01	0,3	0,01	0,2
<b>Matraces</b>					
50,0 mL	49,93	0,08	0,2	1,06	2,1
25,0 mL	24,96	0,02	0,1	0,20	0,8
10,0 mL	9,97	0,05	0,01	0,03	0,3
<b>Termómetro -1,0 – 100,0 °C</b>	22,61	0,05	0,00002	0,002	0,01

Lo anterior es empleado para los cálculos establecidos en el trabajo, tanto en la determinación de concentraciones como en las incertidumbres expandidas asociadas.

## **7.2. Preparación de reactivos.**

### *Preparación y normalización de ácido clorhídrico.*

Para el desarrollo del método se emplearon dos disoluciones de ácido clorhídrico: 0,1 y 0,01 mol\*L<sup>-1</sup>. Ambas fueron normalizadas por triplicado potenciométricamente para una mejor detección del punto final. Para determinar la concentración real del ácido clorhídrico empleado para la determinación del contenido del ión bicarbonato, es necesario emplear el estándar primario de bicarbonato de sodio.

De acuerdo a la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2004), el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> debe secarse por una hora a 270°C para realizar cualquier análisis, ya que a esta temperatura se asegura que no hay NaHCO<sub>3</sub>, el cual se descompone a temperaturas elevadas liberando hidrógeno. Una vez seco se espera que el patrón primario alcance la temperatura ambiente utilizando un desecador con lo cual se evita la absorción de humedad.

La titulación se lleva a cabo con la bureta automática previamente calibrada. Para cada uno de los ácidos, se emplearon 10,0 mL de muestra. La reacción que se lleva a cabo para la normalización del ácido es:

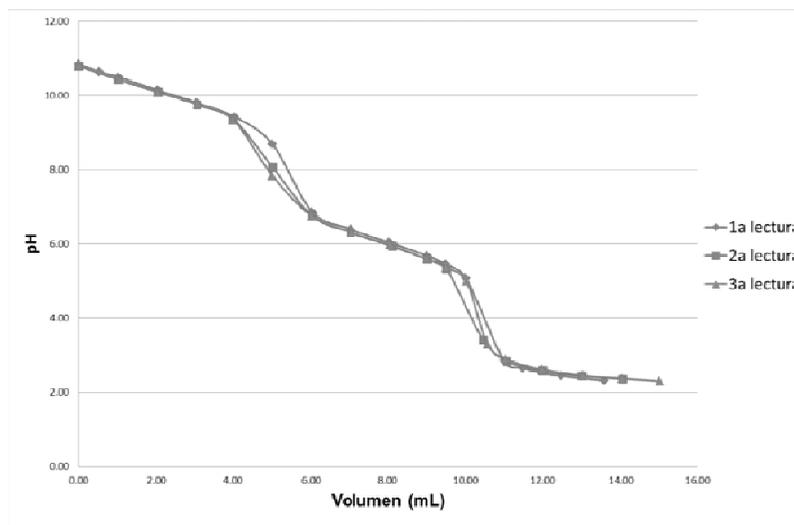


A su vez, para saber la cantidad de patrón primario que debe emplearse, considerando un gasto de ácido clorhídrico de 10,0 mL, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{mg}_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = \frac{\text{mol}_{\text{HCl}}}{\text{L}_{\text{HCl}}} \times \frac{1\text{mol}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}{2\text{mol}_{\text{HCl}}} \times \frac{106\text{g}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}{1\text{mol}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}} \times \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \times \frac{\% \text{ pureza}}{100} \times 0.01\text{L} \quad [19]$$

Una vez obtenido la cantidad de carbonato de sodio a pesar, se procede a pesar la cantidad por triplicado y agregar agua suficiente para su disolución. Se procedió a adicionar cantidades de ácido de aproximadamente 1,0 mL utilizando como indicador rojo de metilo. El pH se determinó utilizando un electrodo de vidrio acoplado a un multiparámetro HACH modelo sensION1, verificando su funcionamiento con amortiguadores a pH de 4, 7 y 10 (HACH, 2000). Cuando se llegó al vire del indicador, el contenido del vaso fue calentado hasta regresar a una coloración amarillo paja; esto se realiza ya que se tiene una disolución amortiguadora en donde las especies de ácido carbónico y bicarbonato permanecen en equilibrio; al calentar a ebullición, el ácido carbónico es eliminado y por tanto la cantidad de bicarbonato restante puede llevarse hasta ácido carbónico provocando el vire del indicador a rosa (Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2004)

La Fig. 32 siguiente presenta un ejemplo de normalización, para el ácido clorhídrico  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .



**Figura 32.** Curva de calibración experimental obtenida al titular una disolución de HCl aproximadamente  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , utilizando carbonato de sodio como patron primario. El experimento fue realizado por triplicado.

A partir de los datos obtenidos, se emplea el método de la segunda derivada para encontrar el punto final (Harris, 2007). Para la primera derivada, se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$\text{mL promedio} = \frac{\text{mL}_1 + \text{mL}_2}{2} \quad [20]$$

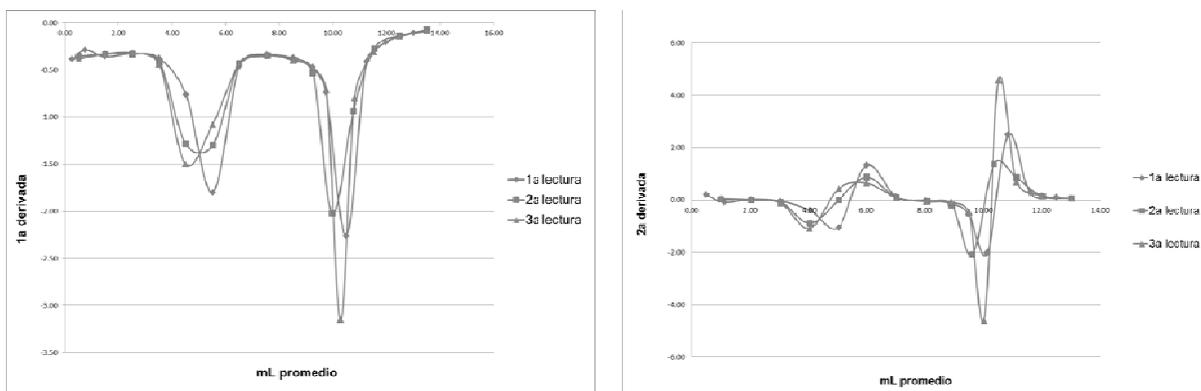
$$\text{1a derivada} = \frac{\text{pH}_2 - \text{pH}_1}{\text{mL}_2 - \text{mL}_1} \quad [21]$$

A partir de estos cálculos puede obtenerse una gráfica similar a la del la Fig. 33A, donde los puntos mínimos corresponden al volumen en el punto final. Una vez obtenida la primera derivada, puede calcularse la segunda derivada:

$$\text{mL promedio} = \frac{\text{mL}_{\text{promedio 1}} + \text{mL}_{\text{promedio 2}}}{2} \quad [22]$$

$$\text{2a derivada} = \frac{\text{1a derivada}_2 - \text{1a derivada}_1}{\text{mL}_{\text{promedio 2}} - \text{mL}_{\text{promedio 1}}} \quad [23]$$

Los resultados dan una gráfica como la de la Fig. 33B, en donde el cruce por el origen de las abscisas es el volumen en el punto final.



**Figura 33.** Gráficas de A) la primera derivada y B) la segunda derivada para HCl 0,1 mol\*L<sup>-1</sup>. El primer pico negativo en A) señala el punto de equivalencia entre el CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mientras que el segundo presenta el punto de equivalencia entre el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Lo mismo aplica para los cruces en B).

Una vez obtenidos los puntos finales de cada valoración por la segunda derivada, se obtuvieron las concentraciones, el promedio, las desviaciones estándar, el coeficiente de variación, así como la incertidumbre combinada (Apéndice 7.4).

La concentración fue calculada de acuerdo a lo siguiente:

$$\frac{\text{mg}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}{\text{mL}_{\text{HCl}}} \times \frac{99,9\%_{\text{seco}}}{100\%_{\text{húmedo}}} \times \frac{100,1\%_{\text{pureza}}}{100\%} \times \frac{61,01 \text{ mg}_{\text{CO}_3^{2-}}}{84,01 \text{ mg}_{\text{Na}_2\text{CO}_3}} \times \frac{2 \text{ mol}_{\text{HCl}}}{1 \text{ mol}_{\text{CO}_3^{2-}}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \frac{\text{mol}_{\text{HCl}}}{\text{L}} \quad [24]$$

Debe cuidarse que el coeficiente de variación sea menor al 2,0 %.

#### *Preparación de hidróxido de sodio.*

El hidróxido de sodio es empleado para el método de cuantificación de bicarbonato por retroceso, y debe estar perfectamente valorado para obtener un análisis preciso. Para preparar una disolución de hidróxido de sodio aproximadamente  $0,025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , se empleó el siguiente cálculo:

$$\frac{0,025 \text{ mol NaOH}}{1 \text{ L}} \times \frac{40,01 \text{ g NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} \times \frac{100\%_{\text{reactivo}}}{99,8\%_{\text{pureza}}} = 1,0023 \text{ g NaOH} \quad [25]$$

La valoración del hidróxido se realizó de forma similar a la normalización del ácido clorhídrico, utilizando este último como patrón secundario y fenolftaleína como indicador. Se obtuvieron las gráficas correspondientes a la titulación potenciométrica, así como la primera y la segunda derivadas, obteniendo el punto final y a partir del volumen gastado la concentración del hidróxido de sodio:

$$\text{Concentración NaOH} = \frac{\text{Concentración HCl} \times \text{Vol HCl}}{\text{Vol NaOH}} \quad [26]$$

Se normalizó el hidróxido por triplicado, obteniendo una desviación estándar y observando que el coeficiente de variación sea igual o menor a 2,0%. La incertidumbre se calculó de acuerdo a lo establecido en el Apéndice 7.4.

*Disolución EDTA 1,0 mmol\*L<sup>-1</sup>.*

Para preparar una disolución de EDTA se emplea su sal disódica Na<sub>2</sub>Y<sup>-</sup>, la cual tiene una pureza del 99,8%. El cálculo realizado para su preparación es el siguiente:

$$\frac{0,1 \text{ mmol}_{\text{EDTA}}}{1 \text{ L}} \times \frac{100\%}{99,8\%_{\text{pureza}}} \times \frac{1 \text{ mmol}_{\text{Sal disódica}}}{1 \text{ mmol}_{\text{EDTA}}} \times \frac{372,24 \text{ mg}_{\text{Sal disódica dihidratada}}}{1 \text{ mmol}_{\text{Sal}}} \times 1 \text{ L} \quad [27]$$

Por lo tanto, se pesaron 0,0373 g de la sal disodicadhidratada de EDTA y se llevó a un volumen de 1 L.

La normalización de ésta disolución se llevó a cabo considerando un gasto de 10,0 mL de disolución de EDTA, preparando una disolución de zinc de la siguiente manera (Dosal, *et al.*, 2007).

1. Pesar la cantidad necesaria de Zinc en granalla para preparar una disolución 1 mmol\*L<sup>-1</sup>.

$$\frac{1 \text{ mmol Zn}}{1 \text{ L}} \times \frac{65,38 \text{ mg Zn}}{1 \text{ mmol Zn}} \times 0,1 \text{ L} = 6,538 \text{ mg Zn} \quad [28]$$

2. Disolver en 5 mL de ácido clorhídrico 6 mol\*L<sup>-1</sup>, mediante calentamiento, y transferir a un matraz de 100,0 mL, enjuagando el vaso con agua destilada.
3. Neutralizar el ácido con una disolución de NaOH 1 mol\*L<sup>-1</sup> utilizando como indicador al rojo de metilo.
4. Agregar 10 mL de amortiguador NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> pH 10.
5. Completar el volumen.

La valoración se llevó a cabo por triplicado, tomando una alícuota de 10,0 mL de la disolución de zinc preparada, detectando el punto final con un indicador complejométrico (Negro de eriocromo T), una vez obtenido el punto final, el cálculo de la concentración es el siguiente:

$$\text{Concentración EDTA} = \frac{\text{Concentración Zinc} \times \text{mL Zinc}}{\text{mL EDTA}} \quad [29]$$

A su vez, es necesario calcular tanto la desviación, el coeficiente de variación y la incertidumbre de la disolución (Apéndice 7.4).

#### *Indicadores*

Para la preparación de los distintos indicadores empleados aquí, se siguió lo establecido en la FEUM (2004):

- Anaranjado de metilo: Disolver 100 mg de anaranjado de metilo en 100 mL de agua y filtrar si es necesario.
- Rojo de metilo: Disolver 100 mg de rojo de metilo en 100 mL de etanol y filtrar si es necesario.
- Fenolftaleína: Disolver 1,0 g de fenolftaleína en 100 mL de alcohol.
- Negro de Eriocromo T: en un matraz volumétrico de 100 mL, disolver 100 mg de negro de eriocromo T en 80 mL de alcohol y llevar al volumen con agua.
- Calcon (Vogel, 1978): Disolver 200 mg de indicador en 50 mL de metanol.

#### *Fases móviles para cromatografía iónica.*

Las fases móviles empleadas para el desarrollo de la metodología de cromatografía iónica para la cuantificación de cationes en descargas hidrotermales, sigue diversos métodos de acuerdo a la naturaleza de las mismas.

Algunas se realizaron por pesada directa del soluto, mientras que otras por medición volumétrica. Para el caso de aquellas que necesitan prepararse por pesada, se estableció un error de  $\pm 10\%$  del peso especificado. Todos los cálculos se especifican para preparar un litro de disolución, llevando al volumen con agua desionizada y filtrada con filtros de  $0,45 \mu\text{m}$  de porosidad.

1. Ácido metanosulfónico  $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : diluir 3 frascos de 25 mL de la disolución concentrada (Alltech, Lote 0511000053) y diluir a 1 litro.
2. Ácido metanosulfónico  $4,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : tomar 500 mL de la disolución  $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  preparada anteriormente y llevar a 1 litro.
3. Ácido metanosulfónico  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : diluir 1 frasco de 25 mL del concentrado comercial y llevar a 1 litro.
4. Ácido oxálico  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : pesar  $0,3167 \text{ g}$  de ácido oxálico dihidratado, con una pureza de  $99,5 \%$ .
5. Ácido oxálico  $3,42 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : pesar  $0,4401 \text{ g}$  de ácido oxálico dihidratado.
6. Ácido tartárico  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  – ácido oxálico  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : pesar  $0,2534 \text{ g}$  de ácido oxálico dihidratado R.A y  $0,4525 \text{ g}$  de ácido tartárico R.A. y agregar a un matraz volumétrico de  $1 \text{ L}$ , disolver y llevar al volumen.
7. Ácido tartárico  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  – ácido oxálico  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : pesar  $0,1267 \text{ g}$  de ácido oxálico dihidratado, colocar en un matraz volumétrico de un litro, agregar agua desionizada y disolver; pesar  $0,3017 \text{ g}$  de ácido tartárico y agregar al mismo matraz; completar con agua desionizada.
8. Ácido nítrico  $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , metanol  $30 \%$  (v/v): mezclar  $300 \text{ mL}$  de metanol con un poco de agua desionizada en un matraz volumétrico de  $1 \text{ L}$ , agregar  $4 \text{ mL}$  de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , mezclar vigorosamente y llevar al volumen. Colocar en un vaso de precipitados y poner en agitación de 15 a 20 minutos, hasta que desaparezcan las burbujas.
9. Ácido nítrico  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , metanol  $15 \%$  (v/v): tomar  $500 \text{ mL}$  de la mezcla anterior y llevar a un litro.

10. Ácido clorhídrico  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : tomar 5 mL de HCl  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  y agregarlo a un matraz volumétrico de un litro que contenga agua desionizada; llevar al volumen.
11. Ácido nítrico  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , mezcla con modificador orgánico: para el caso de las diferentes mezclas en donde la proporción de etanol y metanol varia, se agregan 2 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  y se agrega el volumen necesario para cubrir el porcentaje en volumen (por ejemplo, 300 mL para un litro con un 30 % (v/v) de etanol). El volumen se ajusta a un litro total con agua desionizada.

### **7.3 Pruebas estadísticas empleadas**

Las pruebas estadísticas juegan son una herramienta importante para el desarrollo y la validación de métodos, así como la precisión de los resultados generados durante un análisis. En este anexo se muestran los cálculos empleados para la fase del desarrollo experimental, análisis de varianza, las pruebas de t de Student para las pruebas de especificidad, y método de mínimos cuadrados para las regresiones lineales. Debido a que los cálculos realizados para la validación son más específicos y de mayor extensión, la mayoría no fueron planteados aquí, para mayor información referirse a García et al., 2002.

#### *Desarrollo experimental*

Para el desarrollo experimental se utilizan las siguientes fórmulas (Rodríguez, 2009):

$$\text{Contraste} = \sum \text{valores positivos} + \sum \text{valores negativos} \quad [30]$$

En donde los valores positivos y negativos son la suma de las respuestas para cada experimento, y toman el signo de acuerdo al factor analizado (A, B, C, o su interacción).

$$\text{Efecto} = \frac{\text{Contraste}}{k \times 2^{n-1}} \quad [31]$$

En donde k = número de observaciones

n = número de factores

La suma de cuadrados se emplea para el análisis de varianza del método. Se ha establecido previamente que la influencia de los diferentes factores puede ser descrita por una ecuación.

$$\text{Suma de cuadrados (SC)} = \frac{\text{Contraste}^2}{k \times 2^n} \quad [32]$$

Los coeficientes para cada factor o su interacción se obtienen:

$$\text{Coeficiente} = \frac{\text{Efecto}}{2} \quad [33]$$

El primer coeficiente, el cual no se asocia a ningún factor o interacción en particular, se obtiene del promedio de todos los valores obtenidos.

#### *Análisis de varianza.*

Para el análisis de varianza, es necesario obtener la suma de cuadrados total, a la cual se le resta un factor de corrección (FC).

$$\text{Suma de cuadrados total} = \sum x^2 - FC \quad [34]$$

$$FC = \frac{(\sum x)^2}{N} \quad [35]$$

Donde x= respuestas obtenidas

N= número total de observaciones

Una vez calculada la suma de cuadrados total, se procede a obtener la suma de cuadrados residual:

$$SCR = SCT - SC_A - SC_b - SC_c - SC_{AB} - SC_{AC} - SC_{BC} - SC_{ABC} \quad [36]$$

Donde SCR = Suma de cuadrados residual

SCT = Suma de cuadrados totales [32]

SC = suma de cuadrados de los diferentes factores [31]

La suma de cuadrados medios se obtiene dividiendo la suma de cuadrados sobre los grados de libertad. Los grados de libertad para cada factor, debido a que se utilizó el diseño a dos niveles, corresponden a un valor de 1. Los grados de libertad totales es  $N - 1$ , mientras que los grados de libertad residuales se obtienen de manera análoga a la suma de cuadrados.

La F se obtiene así:

$$F = \frac{\text{Suma de cuadrados medios del factor}}{\text{Suma de cuadrados medios residual}} \quad [37]$$

Este valor se compara con la F de tablas al 95 % de confianza

*t de Student.*

Esta prueba se utiliza como comparación entre dos medias. Para calcularla, es necesario contar con las varianzas, los promedios, así como el número de observaciones realizadas (Navidi, 2006).

$$t = \frac{(\bar{X} - \bar{Y}) - (\bar{\mu}_x - \bar{\mu}_y)}{\sqrt{s_x^2/n_x + s_y^2/n_y}} \quad [38]$$

t = valor de t

$\bar{X}, \bar{Y}$  = medias de las observaciones

$\mu_{x,y}$  = error de las medias

$s^2$  = varianza

n = numero de observaciones

$$v = \frac{\left(\frac{s_x^2}{n_x} + \frac{s_y^2}{n_y}\right)^2}{\frac{(s_x^2/n_x)^2}{n_x - 1} + \frac{(s_y^2/n_y)^2}{n_y - 1}}$$

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

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

---

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

$$u_A = \sqrt{\frac{s}{n}}$$



dada por la balanza analítica depende del método, ya que una pesada que implique la masa del recipiente vacío y la masa con el reactivo, mientras que una pesada simple involucra un solo proceso; la incertidumbre combinada se calcula para el primer caso y se calcula de acuerdo a su sensibilidad. En el caso de la balanza empleada aquí, la sensibilidad es de 0,0001 g, por lo que la incertidumbre de la balanza es (Queré, 2007):

$$U_c = \sqrt{0,0001_g^2 + 0,0001_g^2} \quad [44]$$

En donde  $U_c$  es la incertidumbre combinada

Dado a que las incertidumbres de distintas mediciones, la incertidumbre total se considera como una propagación de incertidumbres; para determinar la incertidumbre de un valor, en el caso de que el modelo matemático incluya sumas o restas, se determina que la incertidumbre es la suma de todas las incertidumbres de los factores p, q..., por lo que se tiene:

$$U^2_y = \sqrt{u^2(p) + u^2(q) + \dots} \quad [45]$$

En donde  $U^2_y$  = incertidumbre combinada de y

$U^2(p)$  = incertidumbre de p

$U^2(q)$  = incertidumbre de q

Cuando la incertidumbre se debe a mediciones independientes, con multiplicaciones y divisiones en el modelo matemático, se considera una incertidumbre asociada relativa:

$$\frac{u_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{u_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{u_q}{q}\right)^2 + \dots} \quad [46]$$

En donde  $U_y$  = incertidumbre de la medición y

$U_p$  = incertidumbre de la medición p

$U_q$  = incertidumbre de la medición q

y = valor de la medición y

La incertidumbre combinada expandida, con un nivel de confianza al 95 %, es igual a:

$$U_{exp,y} = u_y \times 2 \quad [47]$$

En donde  $U_{exp,y}$  = incertidumbre expandida combinada

$u_y$  = incertidumbre

2: factor al 95 % de confianza

La cual es la incertidumbre asociada a la respuesta y se reporta como  $y \pm u_{exp}$ . De acuerdo a dichos principios, se calcularon cada una de las incertidumbres asociadas los resultados obtenidos al presente trabajo.

### **7.5 Pérdida al secado de bicarbonato de sodio**

Se realizó la prueba pérdida al secado del bicarbonato de sodio empleado para la preparación de estándares, ya que el tiempo requerido para secarlo de manera continua consume una cantidad de tiempo importante. Por tanto, se realizó la valoración para introducir el factor en los cálculos correspondientes. La prueba se realizó acorde a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2004) para el bicarbonato de sodio:

“Pérdida por secado: MGA 0671. No más de 0,25 por ciento. Secar 4,0 g de la muestra, sobre gel de sílice durante 4 h.”

La monografía MGA establece que el compuesto debe secarse dentro de un pesafiltros, previamente secado a las mismas condiciones por treinta minutos, distribuido uniformemente, con el tapón abierto. Los cálculos son:

$$\text{Peso perdido} = \text{peso inicial de la muestra (g)} - \text{peso final de la muestra (g)} \quad [48]$$

$$\text{Porcentaje} = \frac{\text{peso perdido(g)}}{\text{peso inicial(g)}} \times 100 \quad [49]$$

Después de la prueba, el resultado fue:

Pérdida al secado del bicarbonato de sodio: 0,1 %

Coefficiente de variación: 0,0 %