



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

**“DETERMINACIÓN QUÍMICA DE ANIONES EN DESCARGAS
NATURALES DE LA ZONA COSTERA DE BAHÍA CONCEPCIÓN,
BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO: CROMATOGRAFÍA IÓNICA”.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
JESSICA ANGELES RAZO.



MÉXICO, D.F.

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Pedro Villanueva González
VOCAL: Profesor: Ernestina Cervera Flores
SECRETARIO: Profesor: Ruth Esther Villanueva Estrada
1er. SUPLENTE: Profesor: Georgina Margarita Maya Ruíz
2° SUPLENTE: Profesor: Adolfo García Osuna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto de Ingeniería, edificio 8, laboratorio 101.
Bahía Concepción, Baja California Sur y Punta de Mita, Nayarit (recolección de muestras).

ASESOR DEL TEMA:

Ruth Esther Villanueva Estrada.

SUSTENTANTE:

Jessica Angeles Razo

AGRADECIMIENTOS.

Gracias Dios porque tú me esforzaste y me guiaste a lo largo de este camino, cambiaste mi vida y me permitiste terminar la carrera. Gracias Señor porque tú me pusiste en el momento correcto y con las personas correctas para poder ser una profesionalista del área de la salud. A ti te dedico todo lo que soy.

Gracias a tí mamá, por darme tu apoyo incondicional en todo momento, por ser un ejemplo de fortaleza, responsabilidad y entrega al trabajo, por darme amor, cariño, cuidados y apoyo. Te quiero mucho. Gracias a mis hermanas Monica y Erika por su constante apoyo y cariño. Gracias por motivarme para seguir adelante, por sus consejos, regaños y experiencias, que han sido parte fundamental de mi vida. Las quiero mucho. Gracias a mi familia por su cariño y apoyo, especialmente a mi tía Susana y mi abuelita por su comprensión, consejo y ayuda en todo momento, por considerarme como una hija y estar al pendiente de mí sin importar la situación. Las quiero mucho.

Gracias a mi asesora Ruth Villanueva por tenerme paciencia en la elaboración de este trabajo. Agradezco infinitamente tu confianza, apoyo y disposición para ayudarme, pero sobre todo, por la oportunidad de conocer a una gran persona como tú.

Gracias a mis amigos por confiar en mí, por hacerme reír dentro y fuera de las aulas, porque ustedes fueron testigos de mi vida como estudiante, especialmente a mi amiga Giovanna por su constante apoyo, tanto moral como en este trabajo. Gracias a mis amigos y hermanos de la fe por sus oraciones.

Gracias a Jazmín, Dayan y Ezequiel porque no tan solo me apoyaron en la elaboración de mi trabajo de tesis, también de ustedes aprendí otras cosas útiles para mi vida laboral. Gracias al programa PAPIT IN1809 Modelación geoquímica aplicada a sistemas hidrotermales y su aplicación al sistema de información geográfico del agua de la UNAM, así como al Instituto de Geofísica por el apoyo económico recibido durante la elaboración de este trabajo.

RESUMEN.

La cromatografía de líquidos de tipo iónico es una técnica que permite la separación de iones, basándose en las diferencias de sus cargas superficiales y accesibles. Su área de aplicación incluye, entre otras, el análisis de muestras ambientales, siendo el agua, una muestra que puede ser analizada mediante la técnica de cromatografía de líquidos de tipo iónico.

Las concentraciones de aniones y cationes presentes en el agua hidrotermal y los parámetros fisicoquímicos del agua, nos permiten clasificar el tipo de agua hidrotermal descargada, la cual es de importancia para el estudio geoquímico de la zona.

Uno de los inconvenientes que se tienen para analizar el agua, son los diferentes rangos de concentración de aniones presentes en ella, especialmente en el agua de mar, el cual es un desafío para la optimización de la metodología.

La extracción en fase sólida es una técnica auxiliar la cual permite retirar aquellos componentes cuya concentración inhibe la cuantificación de aniones en menor proporción en la muestra, como es el caso del ion fluoruro: su respuesta analítica se ve disminuida por el ion cloruro que se encuentran en mayor concentración.

Debido a que la cromatografía de líquidos de tipo iónico puede ser empleada como una técnica alternativa de análisis de aniones mayores en aguas naturales y la extracción en fase sólida una técnica de separación que puede ser utilizada como un pretratamiento de muestras, se estandarizó un método de análisis utilizando ambas técnicas de separación para la cuantificación de aniones mayores en agua salina, hidrotermal y dulce, con el fin de proponer un método de análisis rápido y eficaz para los aniones fluoruro, cloruro, bromuro, nitrito, nitrato y sulfato.

En la etapa de validación, el método presentó repetibilidad, exactitud, linealidad (sistema y método), robustez y selectividad. Además, se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación del método, los cuales garantizan el buen funcionamiento de la metodología obteniendo resultados confiables.

La metodología propuesta reduce el tiempo de análisis, cantidad de muestra utilizada para el análisis, se reducen las interferencias en el análisis y se obtiene un límite de detección menor en comparación con las técnicas empleadas en las normas nacionales.

El análisis de aniones en agua hidrotermal provenientes de Bahía Concepción, Baja California Sur, muestra que existe un efecto de mezcla entre agua de mar y agua meteórica, en base a la concentración de cloruros y bromuros en el agua proveniente del sistema hidrotermal. En el caso del agua hidrotermal proveniente de Punta de Mita, Nayarit, no se puede determinar si existe un fenómeno de mezcla, ya que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de aniones en el agua de mar comparada con el agua hidrotermal.

INDICE.

Capítulo I. Introducción	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Justificación	3
1.3 Planteamiento del problema	3
Capítulo II. Marco teórico	5
2.1 Cromatografía de líquidos tipo iónico	6
2.2 Extracción en fase sólida	10
2.3 Adecuación del sistema y validación de un método analítico	15
2.4 Trazabilidad e incertidumbre	19
2.5 Área de estudio	20
2.5.1 Bahía Concepción, Baja California Sur	22
2.5.2 Punta de Mita, Nayarit	24
Capítulo III. Metodología	27
3.1 Tratamiento de muestras en campo	28
3.2 Cuantificación de aniones por cromatografía de líquidos tipo iónico	30
3.2.1 Descripción del cromatógrafo con detector de conductividad	30
3.2.2 Adecuación del sistema	34
3.2.3 Validación del método analítico	34
3.2.4 Calibración del material volumétrico	38
3.3 Preparación de disoluciones estándar y de muestras	40
3.3.1 Utilización de la extracción en fase sólida	43
Capítulo IV. Resultados y discusión	44
4.1 Adecuación del sistema	45
4.2 Validación del método analítico	51
4.3 Incertidumbre	60
4.4 Utilidad de la extracción en fase sólida	61

4.5 Cuantificación de aniones de las descargas naturales en Bahía Concepción, Baja California Sur y Punta de Mita, Nayarit	65
Capítulo V. Conclusiones	70
Referencias Bibliográficas	73
Anexos	78
Anexo 1. Glosario	79
Anexo 2. Cálculo de incertidumbre	83
Anexo 3. Formulas empleadas en la adecuación y validación del sistema y método analítico	87
Anexo 4. Tabla de criterios de aceptación para la validación del sistema y método analítico	90
Anexo 5. Aplicación de un análisis estadístico: ANOVA	91
Anexo 6. Factores para calcular el volumen calibrado en pipeta y matraz a diferentes temperaturas	94
Anexo 7. Tabla estadística de la distribución t de Student	95
Anexo 8. Tabla estadística de la distribución F de Fisher	96

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN.

1.1 OBJETIVOS

General.

Diseñar una metodología, con la cual, sea posible la identificación y cuantificación de aniones en aguas de diferente salinidad, estableciendo lineamientos generales mínimos necesarios para llevar a cabo el proceso de validación del método analítico, y finalmente obtener resultados confiables, que nos permitan conocer el origen de este tipo de aguas.

Particulares

- Obtener conocimientos y habilidades en el manejo de un cromatógrafo de líquidos de tipo iónico.
- Adecuar un sistema de cromatografía de líquidos de tipo iónico para la determinación y cuantificación de aniones mayores en agua de tipo hidrotermal.
- Validar el método analítico empleado, utilizando criterios y pruebas estadísticas, las cuales demostraran que la metodología cumple con los requisitos mínimos necesarios para su validación.
- Utilizar el método de extracción en fase solida como técnica complementaria a la cromatografía iónica para mejorar la respuesta analítica de los aniones presentes en menor concentración en aguas.
- Determinar las características fisicoquímicas y la composición química del agua hidrotermal proveniente de Bahía Concepción, Baja California Sur y Punta de Mita, Nayarit.

1.2 JUSTIFICACIÓN.

Los sistemas hidrotermales son estudiados ampliamente debido a que sostienen complejas comunidades de microorganismos termófilos, tienen un efecto en la producción de energía geotérmica a partir de manifestaciones hidrotermales en el océano (Canet, et al., 2003; Prol-Ledesma et al., 2002 y 2004), permiten comprender de diversos procesos biogeoquímicos de los elementos en los océanos, la formación de yacimientos minerales y el ciclo geoquímico de los elementos en los océanos, motivo por el cual, un análisis de aniones es de gran importancia, ya que nos permite conocer una parte de la composición química del fluido hidrotermal y, en conjunto con las características fisicoquímicas y la determinación de otros compuestos en el fluido, se pueden entender los mecanismos que controlan la química del fluido hidrotermal (modelos geoquímicos) así como la existencia de fenómenos de mezcla (agua meteórica con agua marina).

El análisis de aniones y cationes por intercambio iónico, sobre todo en aguas, constituye un método de elección, muchas veces oficial (ISO 10304-2:1996, Method 300.0 EPA, NMX-AA-116-SCFI-2001) .Las normas para análisis de aguas naturales utilizan metodologías tardadas y con poca sensibilidad para el análisis de aniones (Crompton, 2002). Investigaciones realizadas, principalmente en Japón, consideran a la cromatografía de líquidos de tipo iónico como una buena herramienta para la determinación y cuantificación de iones en agua de mar (Gros, et al., 2008; Huang, et al., 2000) siendo más frecuentes los análisis de aniones, por existir menos alternativas instrumentales que en el caso de cationes y siempre con la ventaja de que un solo análisis determina simultáneamente varios compuestos.

1.3 Planteamiento del problema.

El agua de mar es una matriz compleja lo cual dificulta su análisis, debido a que contiene principalmente sales (en mayor proporción cloruro de sodio y potasio) provenientes del intemperismo de rocas continentales que son transportadas por medio de ríos y vientos. También están presentes otras sales en menor proporción por lo que la sensibilidad para cada elemento es distinta.

El origen de las descargas hidrotermales costeras puede ser por filtración tanto de agua meteórica como de agua de mar, por lo que su composición puede variar o bien, ser similar a la del agua de mar, obligándonos a utilizar una técnica analítica instrumental que nos permita identificar y cuantificar aniones en aguas hidrotermales submarinas.

Para poder diseñar una metodología para identificar y cuantificar aniones se tiene que tomaron en cuenta los siguientes puntos:

- La matriz es compleja, ya que cuenta con diversos componentes inorgánicos.
- Los analitos a cuantificar son iones, específicamente, aniones.
- Las descargas provienen de la mezcla de agua meteórica con agua de mar.
- Los aniones no están en la misma proporción, por lo que unos pueden interferir en la cuantificación de otros aniones en menor proporción.

CAPÍTULO II.

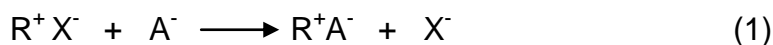
MARCO TEÓRICO.

2.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS TIPO IÓNICO.

La cromatografía de líquidos de tipo iónico es una técnica similar a la cromatografía de líquidos de alta resolución, la cual está orientada a la separación de iones y compuestos polares, basándose en las diferencias de sus cargas superficiales y accesibles (Rouessac y Rouessac, 2003; García de Marina y Yusá, 2008). El fundamento de la técnica es la atracción iónica que primeramente establecen la fase estacionaria (retención) y después la fase móvil (elución) sobre los solutos de naturaleza iónica con carga (Fig.1). Cuanto más grande sea la carga que posea un ión, mas retenido estará por la fase estacionaria. Es preciso que la fase estacionaria posea iones de carga contraria a los iones que se quieren separar. Existen dos tipos de cromatografía de intercambio iónico:

- Cromatografía de intercambio catiónico.
- Cromatografía de intercambio aniónico.

En la cromatografía de intercambio aniónico los solutos son aniones y la fase estacionaria posee grupos catiónicos capaces de retener los aniones, neutralizados por el contraión de carga negativa, aniónico (Quattrocchi, et al., 1992; Rouessac y Rouessac, 2003). El ion de interés se une a la fase estacionaria, sustituyendo al contraión aniónico, como se muestra en la ecuación 1.



En donde R es el intercambiador iónico, X el contraión de la fase móvil y A⁻ el analito aniónico.

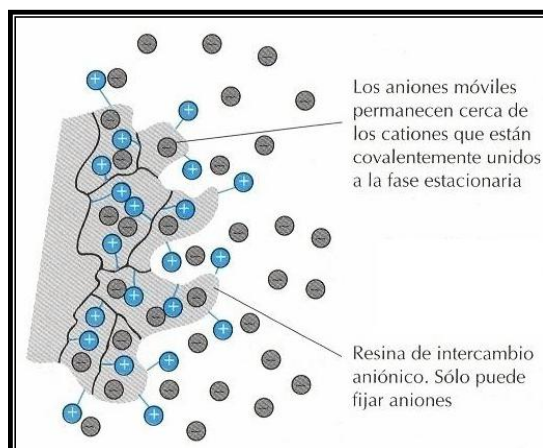


Figura 1 Interacción de la fase móvil con la fase estacionaria en cromatografía de intercambio iónico.

Esta modalidad es en general la preferida para la separación de iones inorgánicos.

Los primeros detectores aplicados a estas separaciones explotaron una característica universal y distintiva de los iones, la conductividad (Quattrocchi, et al., 1992).

El primer problema enfrentado con los detectores de conductividad, debido a la alta capacidad de intercambio de los rellenos de la fase estacionaria, es decir, su alta capacidad de retención, son las bajas concentraciones a detectar. Esto obligaba al empleo de eluyentes de alta fuerza iónica y el análisis de disoluciones diluidas presentaba una respuesta baja del analito contra una alta señal de fondo debida al eluyente, dificultando la distinción de la señal producida por las pequeñas concentraciones de iones de la muestra (García de Marina y Yusá, 2008). Para mejorar la sensibilidad de este tipo de detección, se intercala entre la columna y el detector un dispositivo destinado a intercambiar por captura los iones aportados al electrolito, denominado supresor. Su fin es reemplazar los iones iniciales del eluyente por otros de conductividad más baja (Hu, et al., 2004).

La respuesta del detector es proporcional a la diferencia de conductividad entre el soluto y la fase móvil. Es un detector de manejo sencillo, económico y carece de componentes ópticos y universales con respecto a los iones (Quattrocchi, et al., 1992).

Las fases estacionarias deben cumplir como requisito, el poseer una distribución granulométrica, comprimida, tener una gran superficie específica, presentar resistencia

mecánica, permanecer estables a pH ácidos o básicos y ser capaces de asegurar una transferencia rápida de iones.

Los intercambiadores anionicos contienen un grupo iónico fuertemente o débilmente ácido. Los de mayor difusión son los fuertes, porque se encuentran disociados en todo el rango de pH. Los intercambiadores iónicos empleados en cromatografía de líquidos de tipo iónico son copolímeros, sílices modificadas y algunas resinas.

La fase móvil en general, es una disolución acuosa de pH y fuerza iónica controlados por medio de una disolución amortiguadora y puede contener cantidades moderadas de un modificador orgánico, metanol o acetonitrilo (Quattrocchi, et al., 1992; Haddad, 2004).

Se sabe que participan dos procesos en el mecanismo de retención: intercambio iónico y partición entre las fases en equilibrio.

La fuerza o poder de elución de la fase móvil es proporcional a la fuerza iónica (I). A mayor fuerza iónica, mayor fuerza del disolvente y menor retención. La fuerza iónica está dada por la ecuación 2, en donde C_i es la concentración iónica de la especie i (aniones y cationes contribuyen individualmente) y Z_i su carga (valencia) (Quattrocchi, et al., 1992).

$$I = 1/2 \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2 \quad (2)$$

El análisis cualitativo en cromatografía, se basa en utilizar los tiempos de retención de los picos que se obtienen en los cromatogramas y el análisis cuantitativo basado en las áreas o alturas de éstos (Fig. 2).

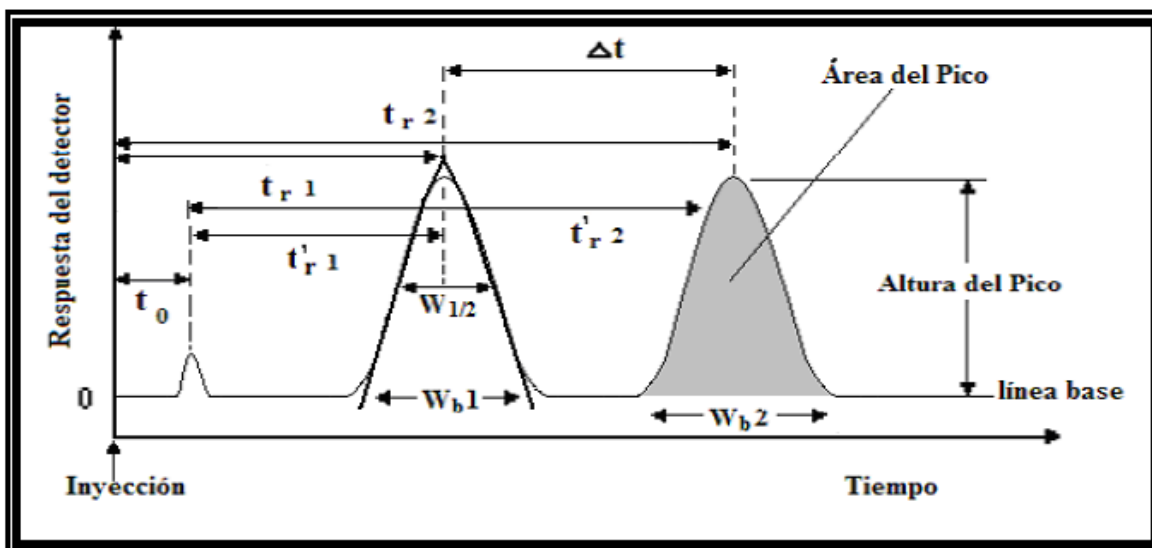


Figura 2. Cromatograma tipo y algunos parámetros de medición frecuentes. Tiempo muerto (t_0), tiempo de retención del compuesto 1 ($t_r 1$), tiempo de retención del compuesto 2 ($t_r 2$), tiempo corregido de retención del compuesto 1 ($t'_r 1$), Diferencia de tiempo de retención del compuesto 1 y 2 (Δt), ancho de la base del pico del compuesto 1 ($W_b 1$) y ancho a la mitad de la altura del pico ($W_{1/2}$).

Algunos de los parámetros cromatográficos más importantes son los siguientes:

- La eficacia de una columna, se mide en función de su número de platos teóricos (N) y se utiliza para describir el ensanchamiento de las bandas de los solutos en su movimiento a través de la columna, evaluando su “poder” separativo (Rouessac y Rouessac, 2003; Rubinson y Rubinson, 2000).
- La altura de un plato teórico (H), es el segmento de la columna que representa un plato teórico, en donde se realiza un equilibrio de distribución.
- El factor de capacidad (k'), es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases. Se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación.
- La resolución (R), es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos solutos (Rubinson y Rubinson, 2000).
- El factor de selectividad (α), permite precisar las posiciones relativas de dos picos adyacentes en un cromatograma. Por si mismo, el factor de selectividad no permite saber si la separación es realmente posible (Rouessac y Rouessac, 2003).

- La asimetría de los picos cromatográficos es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación. Los motivos que generan un pico asimétrico son separaciones pobres (deficientes) y baja precisión (Quattrocchi, et al., 1992).

Las fórmulas de los parámetros cromatograficos aparecen en el anexo 3 parte 1.

La técnica de separación cromatografía de líquidos de tipo iónico ha tomando gran importancia en el estudio de macromoléculas iónicas, sobre todo proteínas, péptidos y ácidos nucleicos en mezclas complejas, el estudio de radioisótopos en centrales nucleares, análisis de ácidos carboxílicos de cadena corta en alimentos, donde se utilizan como aditivos, análisis residual de pastos, metabolitos sencillos y polares (Haddad, 2004; García de Marina y Yusá, 2008); además del clásico análisis de compuestos iónicos sencillos, como aniones y cationes inorgánicos en aguas (Gros, et al., 2008).

2.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

La extracción en fase sólida es una potente y simple técnica de limpieza de muestras que es, al mismo tiempo, rápida y económica. Una columna de extracción en fase sólida consiste en un lecho de adsorbente de partículas gruesas mantenido entre dos discos porosos en un tubo desechable. La extracción en fase sólida permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma (Data sheet 30266U, 1999).

El principio en el que se basa la extracción en fase sólida (que es similar al de la cromatografía de líquidos) es la diferente afinidad de los analitos entre una fase sólida, que es el lecho absorbente, y una líquida, que es la fase móvil (Rouessac y Rouessac, 2003) (Fig. 3).

Las etapas de la extracción en fase sólida son cinco, las cuales se enumeran y se explican a continuación:

1. *Activación.* Se utiliza un disolvente orgánico para "humidificar" la fase.

2. *Acondicionamiento.* La fase estacionaria de la extracción en fase sólida, se acondiciona con el mismo disolvente de la matriz. Permite "alinear" la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Cualquier disolvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.
3. *Retención.* Las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de la extracción en fase sólida. Los componentes de interés han de retenerse en el adsorbente de la extracción en fase sólida mientras que la matriz y los contaminantes deben eluirse y descartarse.
4. *Eliminar interferencias.* Usando un solvente o una serie de solventes de fuerza creciente los contaminantes pueden eliminarse del adsorbente hasta que solo los analitos de interés queden atrapados.
5. *Elución.* La elución de los analitos se efectúa mediante un eluyente adecuado y a un caudal de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El adsorbente de la extracción en fase sólida y las interacciones analito-adsorbentes determinan el eluyente final de elución (Rouessac y Rouessac, 2003).

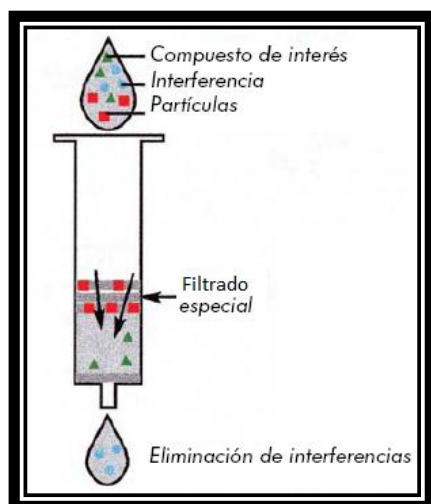


Figura 3. Diagrama del proceso de extracción en fase sólida. De manera general, el proceso consiste en hacer pasar la muestra a través del cartucho de extracción a un flujo constante, previa acondición del cartucho. La muestra contiene tres tipos de componentes: partículas (cuadrado), interferencia (círculo) y los analitos (triángulo). En el cartucho se quedan contenidos los analitos, ya que son retenidos por una resina, mientras que los compuestos de interferencia se eliminan. Es necesario lavar el cartucho para que las interferencias salgan de este y posteriormente se procede a la elución de los compuestos de interés.

Existen diferentes tipos de adsorbentes que se comercializan en forma de cartuchos o discos y que se escogen en función de los analitos que se quieren determinar (Razpothnik, et al., 2003). Se pueden diferenciar básicamente tres tipos, los adsorbentes de sílices enlazadas, los de carbón y los poliméricos (Rouessac y Rouessac, 2003).

Existen cartuchos de extracción en fase sólida para hacer extracción de una gran gama de compuestos, incluyendo aniones como los cloruros, bromuros y yoduros. En este caso, se aprovecha que la plata puede formar precipitados con los halogenuros (Razpothnik, et al., 2003). En un análisis cualitativo, el halogenuro se puede identificar por su color, siempre y cuando este en grandes cantidades (Crompton, 2002).

Los cloruros están en gran proporción en el agua de mar por lo que suelen interferir en la identificación y cuantificación de otros aniones que se encuentran en menor proporción en agua de mar. Debido a que la señal de cloruros opaca la señal del componente en menor proporción (generalmente nitritos y fluoruros), la utilización de la extracción en fase sólida es de gran ayuda para el análisis mediante cromatografía de tipo iónico (Razpothnik, et al., 2003; Gros, et al., 2008).

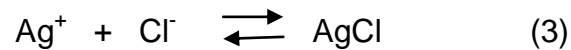
Los cartuchos de extracción en fase sólida contienen Ag^+ para separar los iones cloruro, bromuro y yoduro de la muestra, siendo la concentración de iones cloruro presentes en la muestra los que inhiben la respuesta analítica de iones en bajas concentraciones.

Se sabe que las constantes de solubilidad y pKs para los haluros de plata son los siguientes:

$$\begin{aligned} \text{pKs AgI} &= 16.08 & \text{Ks} &= 8.3 \times 10^{-17} \text{ M}^2 \\ \text{pKs AgBr} &= 12.3 & \text{Ks} &= 5.0 \times 10^{-13} \text{ M}^2 \\ \text{pKs AgCl} &= 9.74 & \text{Ks} &= 1.8 \times 10^{-10} \text{ M}^2 \end{aligned}$$

con estas constantes se puede observar que el yoduro de plata precipita antes que el bromuro de plata, y a su vez, el bromuro de plata precipita antes que el cloruro de plata. Para conocer si la alta concentración de cloruros es un factor que pueda influir en la precipitación del cloruro de plata, antes que precipite el bromuro de plata, se realizó un cálculo considerando las concentraciones reales de cada ion en el agua de mar.

Las concentraciones de iones Cl^- , Br^- y I^- en agua de mar, las cuales son aproximadamente de 19, 0.065 y $6.4 \times 10^{-5} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente (Libes, 2009) y que son equivalentes a 0.5352, 8.135×10^{-4} y $5.04 \times 10^{-7} \text{ M}$ y tomando como ejemplo el equilibrio de precipitación del AgCl , el cual, está representado en la ecuación 3.



Por lo tanto

$$K_s = [\text{Ag}^+][\text{Cl}^-] \quad (4)$$

Sustituyendo los valores conocidos de concentración de cloruros en el agua de mar y el valor de K_s en la ecuación 4, se obtiene la ecuación 5.

$$10^{-9.74} \text{ M}^2 = [\text{Ag}^+][0.5352 \text{ M}] \quad (5)$$

Despejando la concentración de Ag^+ de la ecuación 5, se obtiene la ecuación 6.

$$[\text{Ag}^+] = \frac{10^{-9.74} \text{ M}^2}{[0.5352 \text{ M}]} = 3.400 \times 10^{-10} \text{ M} \quad (6)$$

Por lo tanto

$$\text{pAg}^+ = -\text{Log}[\text{Ag}^+] = 9.46 \quad (7)$$

Si consideramos la concentración del ion Ag^+ igual a 10^{-5} M , tomando en cuenta el equilibrio de la ecuación 3, se tiene la ecuación 8

$$\text{Log} [\text{Ag}^+] = - 5.00 \quad (8)$$

Si estos cálculos se realizan para el equilibrio químico entre los iones Ag^+ y Br^- , así como entre el ion Ag^+ y el ion I^- , se obtiene el gráfico de la figura 4.

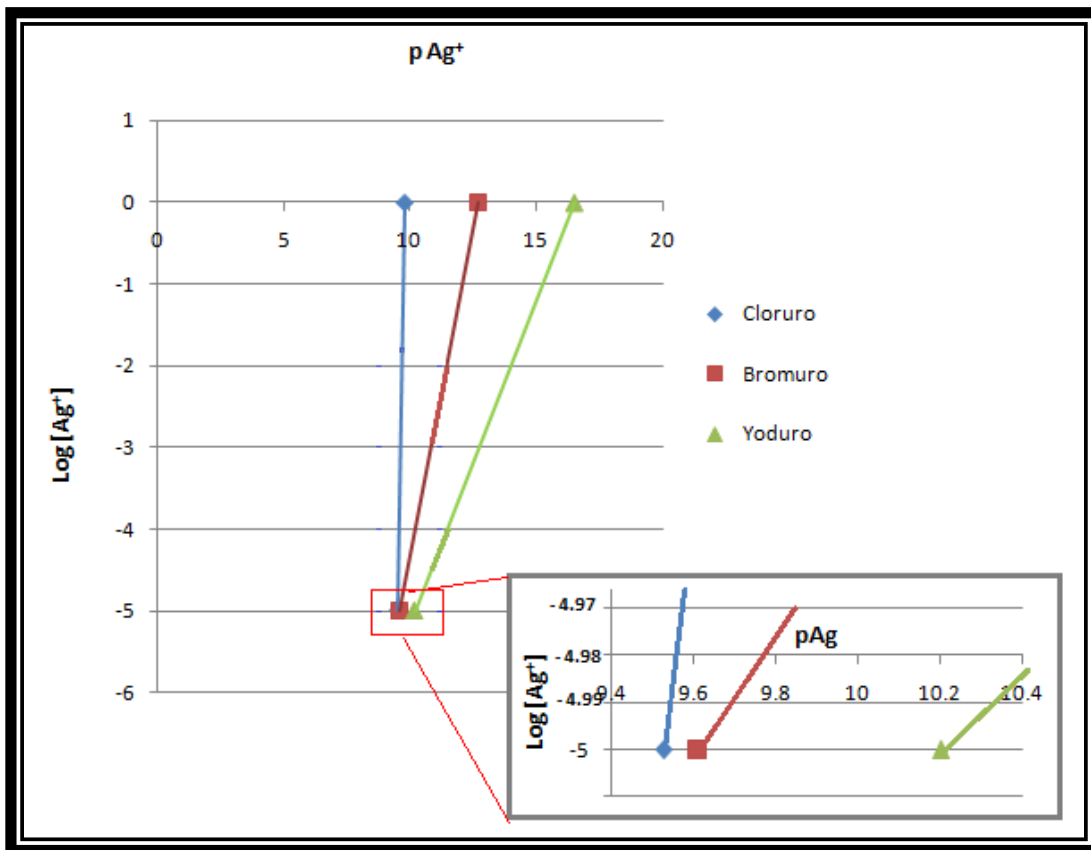


Figura 4. Gráfico $\text{Log}[\text{Ag}^+]$ en función de pAg^+ , en el que se representa el fenómeno de precipitación de los haluros (Cl^- , Br^- y I^-) en presencia de ion plata, tomando en cuenta la concentración real de cada haluro en el agua de mar.

En esta gráfica es más claro el fenómeno de precipitación de las 3 especies observando con claridad que el yoduro precipitara primero que los bromuros, pero este ultimo precipitará antes que los cloruros, por lo que en la técnica de extracción en fase sólida se extraen estos 3 aniones.

2.3 ADECUACIÓN DEL SISTEMA Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.

Antes de validar un método, es importante determinar las condiciones óptimas para el análisis, por lo que es necesario verificar que el sistema (analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico, ser evaluados en la validación y verificados de manera rutinaria al emplear el método analítico (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Para llevar a cabo cualquier análisis mediante cromatografía, es indispensable realizar la validación del método que se va a emplear. En primer lugar, se desarrolla el método, la determinación del analito de interés. Posteriormente se efectúa la validación, etapa que permite conocer las características de confiabilidad del método para su aplicación rutinaria (Montoya y Castaño, 2004) y demuestra la capacidad del método analítico, para mantener a lo largo del tiempo, los criterios fundamentales para la realización del análisis (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Validar un procedimiento de ensayo es documentar su calidad, para lo cual es necesario verificar experimentalmente que dicho procedimiento cumple los criterios de calidad establecidos por el usuario del procedimiento (Ramis y García Álvares-Coque, 2006; Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Los criterios de calidad, parámetros de la calidad o características significativas de un método analítico, se definen para la aplicación del método, a un determinado tipo de muestras (Tabla 1) y pueden ser de tres tipos: estadísticos, operativos y económicos. En este trabajo solo definiremos los criterios estadísticos.

Tabla 1. Parámetros de desempeño a estudiar en función de la aplicación analítica del método para conocer: la concentración, pruebas límite o concentración de impurezas en una muestra y/o la identificación del analito.

Parámetro de desempeño	Contenido / concentración	Pruebas de impurezas		Identificación
		Contenido / concentración	Limite	
Precisión /adecuación del sistema [#]	Si	Si	Si	*
Linealidad del sistema [#]	Si	Si	No	No
Especificidad ^{1, #}	Si	Si	Si	Si
Exactitud y repetibilidad [#]	Si	Si	No	No
Linealidad del método [#]	Si	Si	No	No
Precisión del método o precisión intermedia ^{2, #}	Si	Si	No	No
Estabilidad analítica de la muestra ²	*	*	No	No
Limite de detección [#]	No	No	Si	No
Limite de cuantificación [#]	No	Si	No	No
Robustez [#]	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

(*) Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método. (1) La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa de soporte. (2) También es definido como un estudio de tolerancia. (#) Parámetros de desempeño que se trabajaron en la metodología de cromatografía tipo intercambio iónico, una vez estudiado el tipo de muestras al que está dirigida la metodología.

Los criterios de calidad estadísticos, constituyen una aplicación importante de la estadística descriptiva y de la inferencia estadística (Ramis y García Álvares-Coque, 2006), obteniendo características de confiabilidad, las cuales comprenden seis criterios fundamentales de validación:

1. La capacidad de un método para determinar un analito, sin interferencias de impurezas, productos de degradación u otras sustancias presentes en la muestra, se relaciona con el término selectividad, que es la capacidad de un método analítico para medir e identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias

- químicas que pueden estar presentes en la muestra (cationes, compuestos orgánicos disueltos u otros aniones inorgánicos) (Montoya y Castaño, 2004).
2. La proporcionalidad entre concentración del analito y respuesta del instrumento, esta se relaciona con linealidad y rango.
 - Rango: Es el intervalo entre la concentración superior e inferior para las cuales se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método (Montoya y Castaño, 2004).
 - Linealidad: Es la capacidad para demostrar que los resultados de la prueba son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango dado (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002).
 3. La dispersión de los datos en un procedimiento analítico se relaciona con el término precisión, la cual se define como el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o referencia. Se puede estudiar a tres niveles:
 - Reproducibilidad: En la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios (Montoya y Castaño, 2004; Miller y Miller, 1993).
 - Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.
 4. Precisión intermedia: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio. Evalúa la precisión frente a variaciones de analista y día.
 - La diferencia entre el valor hallado en el análisis y el valor verdadero se relaciona con el término exactitud, que expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como verdadero o valor de

referencia y el valor encontrado experimentalmente (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002; Montoya y Castaño, 2004).

5. La veracidad del método analítico empleado se relaciona con el término robustez experimental, la cual se define como la medida de la capacidad del método analítico para permanecer inafectado por pequeñas variaciones deliberadas en el método y provee un indicio de su veracidad durante su uso normal (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002).
6. La cantidad mínima requerida para obtener un resultado significativo está relacionada con los términos límite de detección y límite de cuantificación.
 - Límite de cuantificación: Se define como la cantidad mínima de analito que puede detectarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión. Este parámetro tiene sentido y especial interés en la determinación de concentraciones bajas de analito.
 - Límite de detección: Es la cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas. La cantidad del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002; Miller y Miller, 1993).

Las formulas para calcular cada uno de los parámetros descritos en esta sección se encuentran en el anexo 3 parte 2-7 de este trabajo.

La validación completa del procedimiento requiere verificar los otros dos criterios: económicos y operativos (Ramis y García Álvares-Coque, 2006).

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos de concentración del analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método por lo que también se debe incluir el límite de cuantificación (Hu, 2004).

Con esto se pretende garantizar la calidad del análisis para las muestras de agua hidrotermal, ya que la validación del método analítico proporciona un alto grado de confianza, seguridad en el método analítico y la calidad de los resultados. Además

permite tener un conocimiento profundo del método, sus características de funcionamiento y de esta manera, disminuir el número de fallas y repeticiones, ahorro en costos y el cumplir con los plazos previstos de análisis (Ramis y García Álvares-Coque, 2006).

2.4 Trazabilidad e incertidumbre.

La trazabilidad es la propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por medio de la cual éstos pueden ser relacionados a referencias establecidas a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado.

La incertidumbre de medición es un parámetro único (usualmente una desviación estándar o un intervalo de confianza) que expresa el intervalo de posibles valores sobre la base de los resultados de medición. Una estimación de la incertidumbre de medición considera todos los efectos reconocidos que influyen en el resultado (Ramis y García Álvares-Coque, 2006).

La trazabilidad de un resultado no se podría establecer sin considerar la incertidumbre asociada a dicho resultado. El concepto de incertidumbre refleja pues, duda acerca de la veracidad del resultado obtenido una vez que se han evaluado todas las posibles fuentes de incertidumbre y que se han aplicado las correcciones oportunas. Por lo tanto, la incertidumbre nos da una idea de la indeterminación del resultado ya que nos muestra un intervalo alrededor del valor estimado dentro del cual se encuentra el valor considerado verdadero (Meyer, 2007).

2.5 Área de estudio.

La geoquímica de sistemas hidrotermales está dominada principalmente por la interacción agua-roca, de forma que la composición del fluido que circula a través de la roca, que posteriormente se manifestará ya sea en continente o en el fondo del mar, estará dada por la composición de la corteza en una determinada zona y del agua infiltrada.

En un depósito mineral hidrotermal, cada miembro se forma cuando una disolución acuosa caliente, comúnmente llamada solución hidrotermal fluye a través de un canal definido en la corteza o sobre una porción restringida de la superficie de la corteza y precipita una masa de minerales localizada en la disolución (Villanueva Estrada, 2007; Skinner, 1979).

La placa formada por la península de Baja California y la porción sur occidental del estado de California, E.U., es un ejemplo del movimiento relativo entre dos placas, la del Pacífico y la Norteamericana. Este movimiento da lugar a la formación de “cuencas de dispersión o divergencia”, tanto en el Golfo de California como en el continente. En estas cuencas el flujo de calor es elevado y pueden formarse reservorios geotérmicos importantes (Quijano León, 2007).

Los fluidos hidrotermales son altamente reactivos y por ello alteran la composición de las rocas con las que interaccionan (Villanueva Estrada, 2007). La importancia de los estudios de los sistemas hidrotermales residen en que: originan depósitos minerales importantes, tales como óxidos, sulfuros y metales preciosos, sostienen comunidades biológicas adaptadas a vivir en condiciones extremas de temperatura y oxígeno y en la generación de energía a partir de sistemas hidrotermales (Villanueva Estrada, 2007;). Para poder conocer todo lo anterior, es necesario determinar la composición del agua proveniente de la descarga.

La composición del agua hidrotermal puede ser afectada por:

- Transporte y depósito en soluciones hidrotermales
- Enfriamiento por ebullición.
- Enfriamiento por conducción.

- Mezcla con otras aguas.

Con el análisis de elementos mayores (aniones y cationes) presentes en este tipo de descargas se puede determinar el tipo de agua (Nicholson, 1993) (Fig. 5) la cual puede ser:

- Aguas ácidas sulfatadas
- Aguas neutras cloradas.
- Aguas ricas en bicarbonatos.
- Aguas ricas en sulfatos y cloruros.
- Aguas diluidas en cloruros.

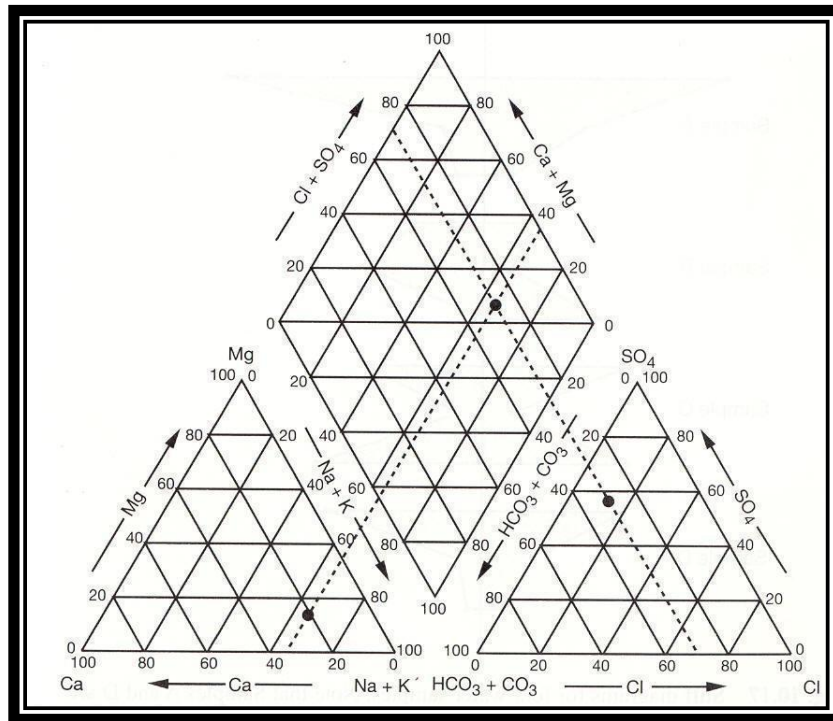


Figura 5. Los diagramas triangulares de Piper son ideales para representar tres componentes (aniones y/o cationes) en forma simultánea. Permite ver la variación existente entre análisis de distintas muestras, permitiendo ver su condición del agua.

Se tienen identificados sitios donde hay presencia de actividad hidrotermal submarina y en algunos de estos sitios hay reportados estudios geoquímicos y mineralógicos del sistema hidrotermal: Alto Golfo de California, Bahía Concepción en el estado de Baja California Sur (Prol-Ledesma, et al., 2004) y Punta de Mita en el estado de Nayarit (Prol-Ledesma, et al., 2002) (Fig.6).

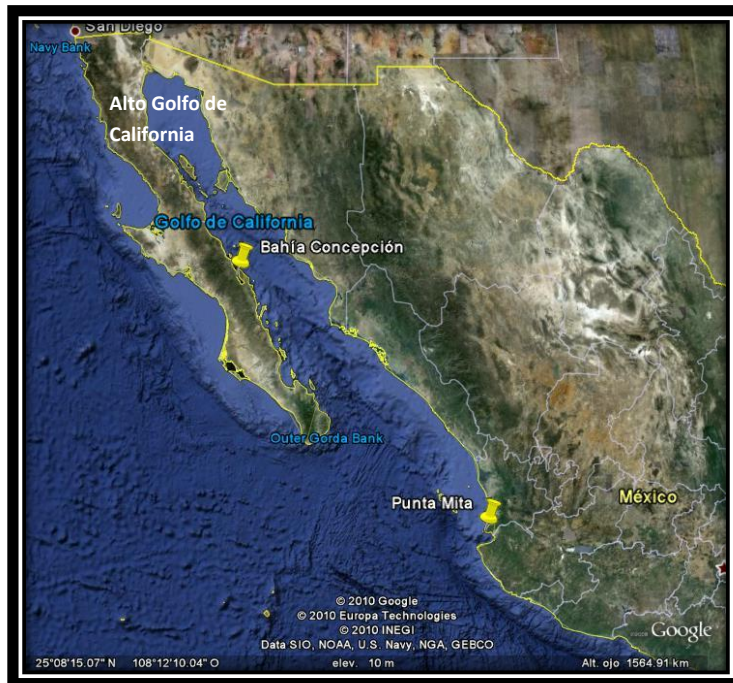


Figura 6. Imagen tomada de un satélite, en donde se muestra la localización del área de estudio. En la parte Noroeste del país, en el estado de Baja California Sur, se encuentra Bahía Concepción y en la parte Oeste del país se encuentra Punta de Mita, la cual forma parte del estado de Nayarit. La vista del mapa esta a 1564.91 km de elevación (Google Earth, 2010).

2.5.1 Bahía Concepción, Baja California Sur.

La zona estudiada se ubica en la costa este del Mar de Cortés, en la Península de Baja California, al sur este del municipio de Mulegé, Baja California Sur. Está limitada por la población de Santa Rosalía al norte, el limite municipal de Comondú y Loreto, al sur, Bahía San Nicolás y el Golfo de California, al este, y la Sierra de la Giganta, al oeste (INEGI, 2011).

Bahía Concepción presenta un clima árido debido a la interacción de factores como latitud, relieve y corrientes marinas. En 2007, la región presentaba una temperatura media anual entre 28°C y 32°C (Rodríguez Díaz, 2009)

El régimen de las lluvias es estacional, con la mayor parte de la precipitación repartida entre los meses de julio a octubre, y un periodo de mínima pluviosidad entre los meses de diciembre y febrero. Datos del 2007 muestran una precipitación de 160.4 mm

(Rodríguez Díaz, 2009). La localidad más cercana es Mulegé, la cual presenta una temperatura media anual de 22°C y la precipitación normal anual es de 120.4 mm (Servicio Meteorológico Nacional, 2011).

La actividad hidrotermal en esta zona se localiza en la parte oeste de la misma, y en ella se pueden observar manifestaciones descritas como:

- 1) Manifestaciones submarinas someras que consisten en infiltraciones difusas de fluidos gasohidrotermales a una profundidad de 5 a 15 m. La temperatura de descarga de las manifestaciones submarinas varía entre 50°C en el fondo marino y 87°C a 10 m de profundidad en el sedimento marino. Estas manifestaciones se ubican en la Ensenada Mapachitos (denominada Agua Caliente).
- 2) Manifestaciones intermareales localizadas en la zona cubierta por el agua de mar por efectos de la marea. Estas manifestaciones se ubican en la playa de Santispac (Rodríguez Díaz, 2009).



Figura 7. Ubicación de las 10 manifestaciones intermareales encontradas en la playa de Santispac en Bahía Concepción, Baja California Sur, entre La Posada y Los Sueños.

Durante el muestreo en Bahía Concepción, se localizaron 10 descargas hidrotermales a lo largo de la playa de Santispac (Fig. 7 y 8).

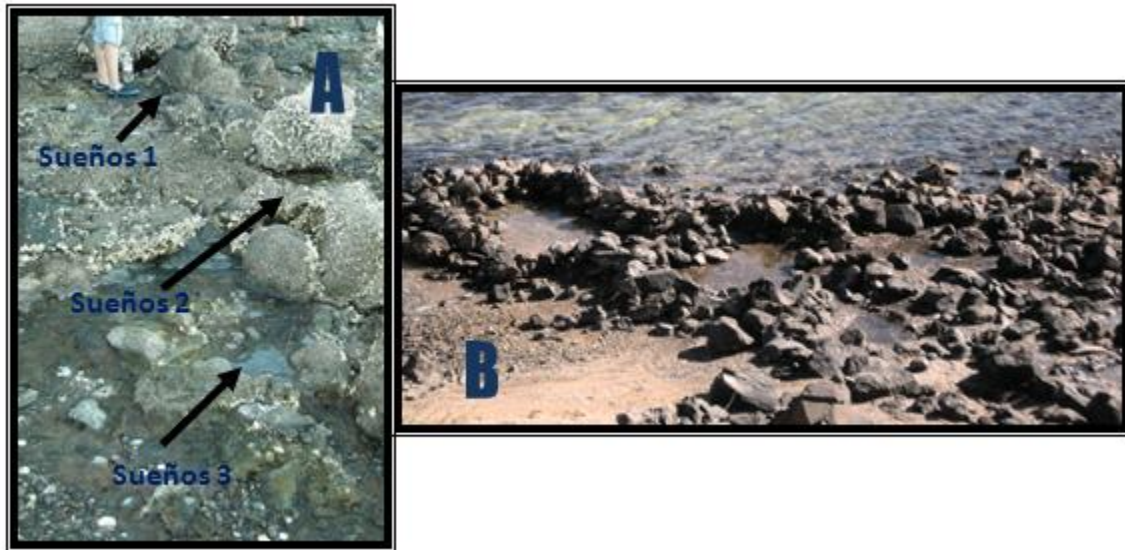


Figura 8 Fotografías de la descargas “los sueños 1,2 y 3” (A) las cuales están conectadas y de “los sueños 8” (B)

2.5.2 Punta de Mita, Nayarit.

La zona de Punta de Mita se localiza en el estado de Nayarit (Fig. 9), dentro del municipio de Bahía Banderas, cuya cabecera municipal es Valle de Banderas (Villanueva Estrada, 2007).

La zona de estudio se encuentra dentro de la subprovincia Sierra de la Costa de Jalisco y Colima de la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del Sur (Prol-Ledesma, et al., 2002). El clima que predomina en la zona de Punta de Mita es cálido húmedo con lluvias en verano. La temperatura anual es mayor a 22°C, con una precipitación media anual de 1200 a 1500 mm (INEGI, 2011).

El principal rasgo geotectónico regional es la subducción de la placa de Rivera bajo la placa Norteamericana, proceso que controla la actividad sísmica y volcánica, así como la deformación tectónica en el área.

Se tienen registros de manantiales calientes en la costa, pero el fluido que descarga en la zona submarina tiene alto contenido de metano y ácido sulfhídrico, por lo que éste sistema cobra importancia por los procesos que originan estos gases que también

influyen en la precipitación de calcita biogénica alrededor de la descarga (Villanueva Estrada, 2007).

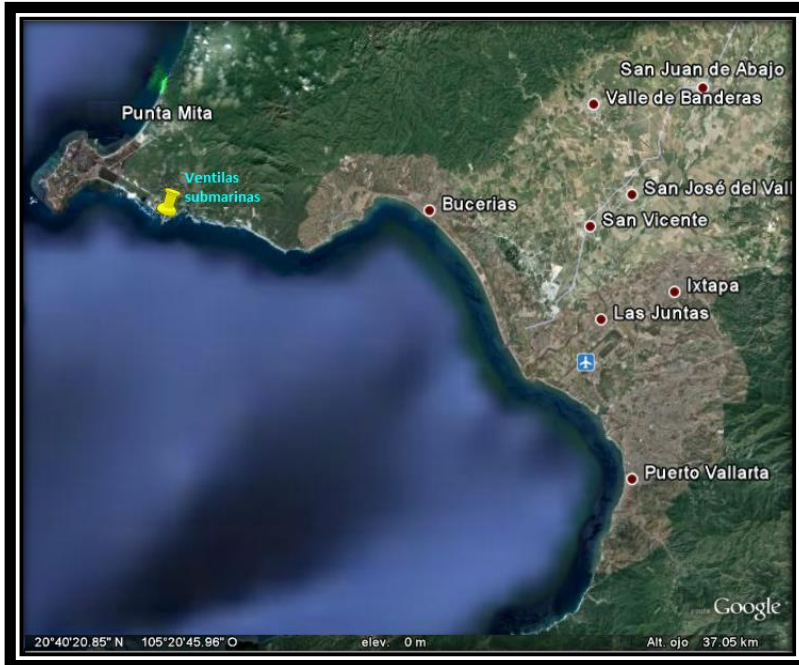


Figura 9. Mapa donde se muestra la ubicación de la zona de estudio cercana a Punta de Mita, Nayarit. Se observa un mapa tomado a 37.05 Km de elevación, en el cual se muestra la costa del estado de Jalisco y del estado de Nayarit, en la costa se identifican algunos poblados con Bucerías y Puerto Vallarta, siendo éste ultimo el punto de salida hacia las ventilas submarinas.

Las manifestaciones submarinas (Fig.10) están alineadas noroeste - sureste, misma orientación que las fracturas observadas en los basaltos en tierra (Canet, et al., 2003). Estas manifestaciones son gasohidrotermales y se descargan a una profundidad de aproximadamente 10 m (Prol-Ledesma, et al., 2002; Canet, et al., 2003).

De los minerales depositados en estas zonas de descarga hidrotermal, la calcita es la más abundante (Prol-Ledesma, et al., 2002), con crecimientos arborescentes. El tamaño relativamente pequeño de los montículos se debe a la acción de las corrientes marinas, así las manifestaciones hidrotermales más pequeñas están cubiertas de arena y solo se observan por las infiltraciones de gases que emanan del piso marino (Canet, C., et al., 2003).

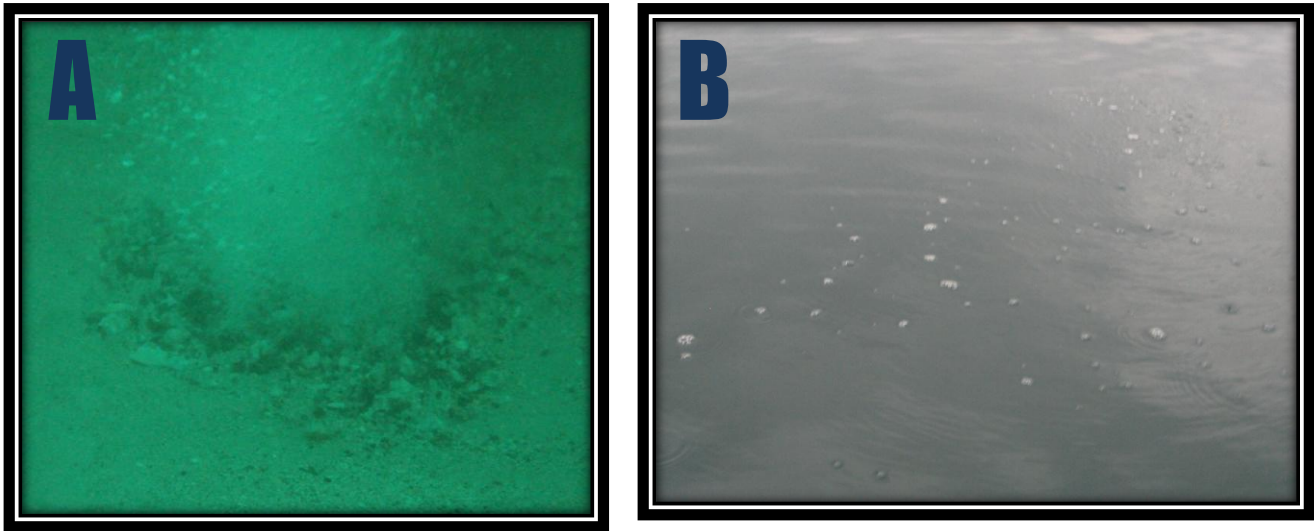


Figura 10. Descargas hidrotermales submarinas en la zona de Punta de Mita, Nayarit. En la imagen A se observa la salida de la descarga hidrotermal y en la imagen B se observan las burbujas que se ven en la superficie del mar, aproximadamente a 10 m arriba.

CAPÍTULO III.

METODOLOGÍA.

3.1 Tratamiento de la muestra en campo.

Las muestras fueron tomadas en zonas costeras y submarinas, por lo que se emplearon diferentes metodologías para la colecta de muestra, en base a la localización de la descarga y el área geográfica.

1. Muestras Submarinas.

Las muestras submarinas corresponden a Punta Mita. Para colectar la muestra a lo largo de la columna (superficie y 5 m) se utilizó una botella Niskin de capacidad de 1.0 L (Fig. 14), la cual se baja por medio de un cable previamente marcado en intervalos de metros y se manda un mensajero para cerrar la botella a la profundidad deseada. El agua de fondo se muestreó mediante buceo autónomo directamente en el sitio donde provenían las burbujas submarinas con la ayuda de un embudo invertido (Fig. 15), el cual mantenía el agua de la ventila separada del agua de mar evitando su mezcla. Al embudo se le conectó una jeringa de capacidad de 60 mL para tomar la muestra de agua proveniente de la actividad termal (Villanueva, et al., 2006)

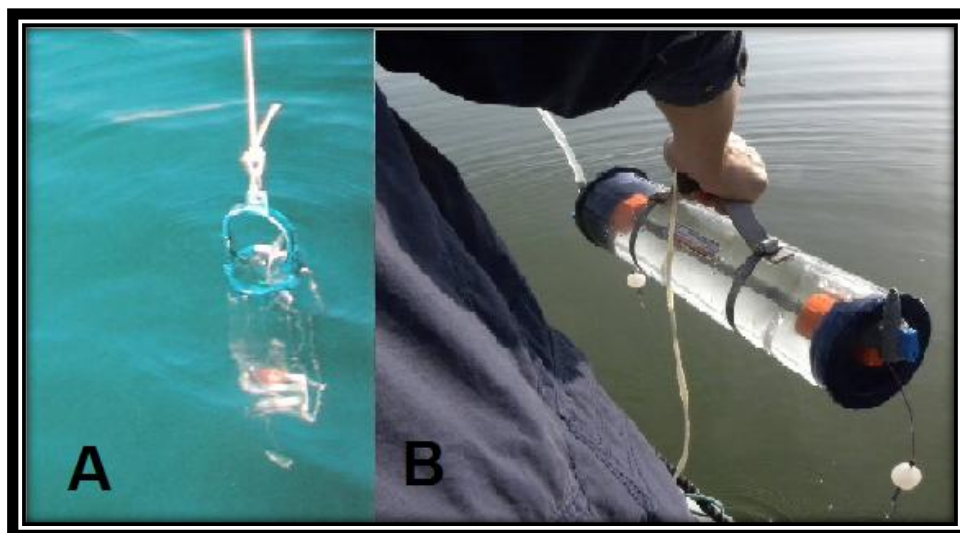


Figura 14. Fotografía de la botella Niskin empleada para la toma de muestras submarinas. Sumergiendo la botella en el mar (A). Botella ascendiendo con muestra (B).

Una vez obtenida la muestra con jeringas en superficie, a bordo de una lancha se filtró con papel Whatman de tamaño de poro $0.45 \mu\text{m}$, se cerraron los frascos contenedores, se colocó parafilm alrededor de la boca y se refrigeraron a 2°C hasta el momento de su análisis.

2. Muestras Costeras.

Las muestras corresponden a Bahía Concepción. Se tomaron 60 mL de agua hidrotermal con la ayuda de una jeringa de plástico, específicamente del punto de la emanación (Fig. 16). Ésta se sometió a un proceso de filtración empleando una membrana de papel Whatman de poro $0.45\ \mu\text{m}$ para eliminar los sólidos suspendidos mayores al tamaño de poro. Se cerraron los frascos contenedores, se colocó parafilm y se refrigeraron a 2°C hasta el momento de su análisis.



Figura 15. Fotografías de la técnica empleada para la obtención de muestras de agua termal submarina.



Figura 16. Fotografías de la metodología empleada para la obtención y preparación de muestras de agua en manifestaciones hidrotermales costeras.

3.2 Cuantificación de aniones por cromatografía de de tipo iónico.

Antes de identificar y cuantificar aniones en aguas hidrotermales por cromatografía de líquidos de tipo iónico, es necesario conocer las características del equipo con el cual se cuenta, así como acondicionarlo para obtener las óptimas condiciones de trabajo para poder validar la metodología.

3.2.1 Descripción del cromatógrafo con detector de conductividad.

El equipo utilizado para la determinación de aniones es de la marca Alltech y se constituye de las siguientes partes fundamentales (Fig. 11):

- Sistema de bombas modelo 626.
- Horno de la columna modelo 630.
- Supresor modelo 641.
- Detector de conductividad modelo 650.
- Reservorio.
- Sistema de desgasificación.
- Inyector de válvula manual.
- Computadora.
- Interface Peak Simple Chromatography Data System modelo 203.
- Regulador de energía.
- Solución limpiadora de isopropanol al 5%

El sistema de bombas de alta presión se compone de 2 cabezas de bomba de 50 mL. El ciclo de bombeo consta de dos fases: fase de bombeo y fase de relleno. Durante la operación de la bomba, uno de los pistones desplaza el fluido (fase móvil) a una velocidad constante, mientras que el otro pistón se rellena el otro cabezal de la bomba con el fluido (fase móvil). Cuando el pistón ha terminado de desplazar el fluido (fase móvil), inmediatamente el otro pistón inicia el desplazamiento. Con este ciclo se asegura un flujo de fase móvil estable y constante (Operating Manual, 2004) El horno cuenta con un sistema de regulación de temperatura. Dentro del horno se coloca la columna intercambiadora de aniones Novosep A-2, la cual separa 7 aniones comunes (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-}) y tres aniones oxihaluros (BrO_3^- , ClO_2^- y ClO_3^-). La columna está empaquetada con la fase a base de alcohol

polivinílico, basado en un intercambiador aniónico con aminas cuaternarias, con un tamaño de partícula del empaque de 5 μm y de dimensiones 250 x 4.00 mm.

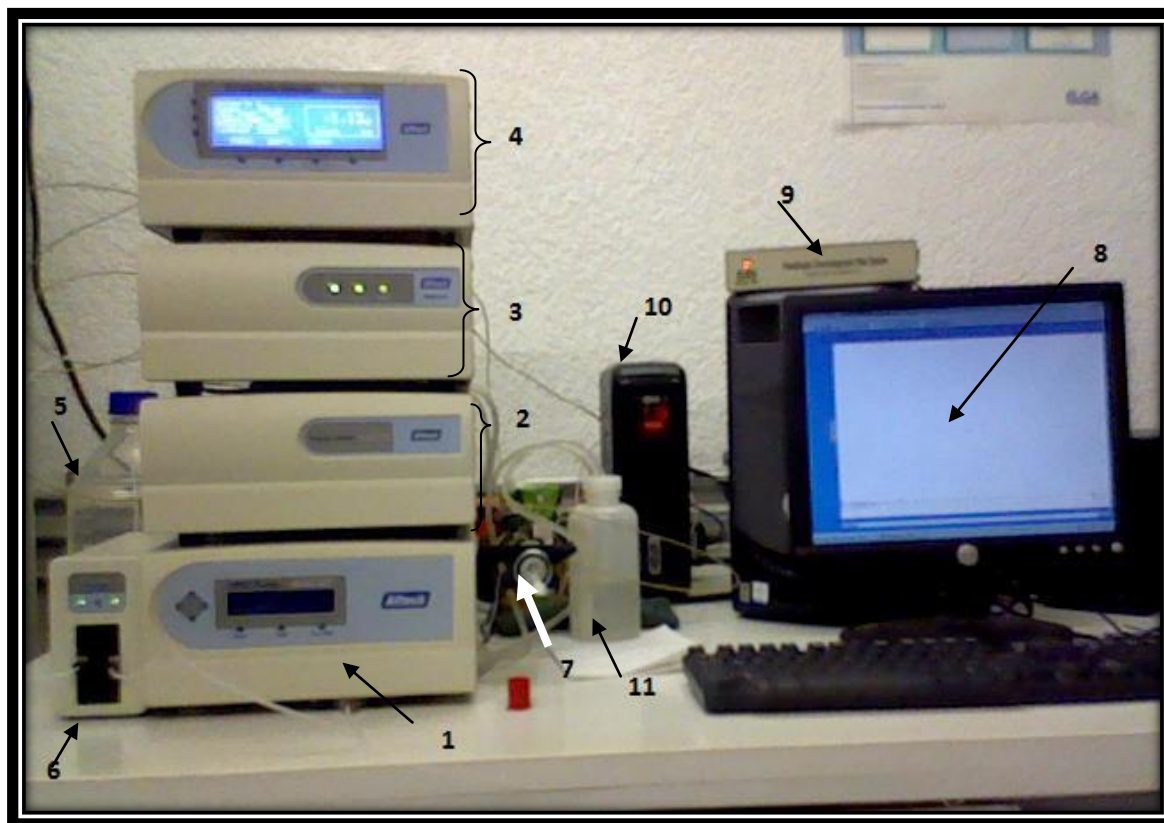


Figura 11. Equipo empleado para el análisis de las muestras de agua hidrotermal. En esta fotografía se pueden observar las partes fundamentales con las que cuenta el cromatógrafo de líquidos tipo iónico (1) Sistema de bombas, (2) horno de la columna, (3) supresor, (4) detector, (5) reservorio de fase móvil 3.6 mM de Na_2CO_3 , (6) desgasificador, (7) inyector, (8) computadora, (9) interface, (10) regulador de energía y (11) solución limpiadora de isopropanol al 5%.

Para la detección de aniones, se utiliza como fase móvil una disolución de carbonato de sodio (Na_2CO_3). La fase móvil produce enmascaramiento de las señales de los aniones, ya que al ser un electrolito fuerte, presenta una alta conductividad (Operating Manual, 2004). Esto da como consecuencia una disminución en la sensibilidad. Sin embargo para evitar esto, se utiliza un sistema supresor (parte 3 de la Fig. 11) inmediatamente después de la columna analítica de intercambio iónico modificada y antes de que lleguen los analitos en la fase móvil, al detector.

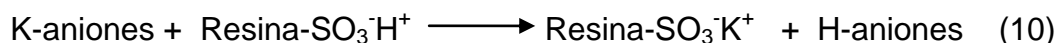
El sistema supresor utilizado tiene un relleno en forma ácida de una resina de intercambio catiónico. La función de esta resina es convertir de forma eficaz los iones presentes en la fase móvil en especies moleculares poco ionizadas sin alterar los iones de la muestra. En el sistema supresor se llevan a cabo tres procesos

simultáneos (Fig. 12): la fase móvil y las muestras de iones, provenientes de la columna analítica se someten a una reacción de neutralización ácido base. La celda esta empacada con un fuerte intercambiador de cationes a partir de iones hidrógeno. Las reacciones que ocurren en el supresor son las siguientes:

Para la fase móvil.

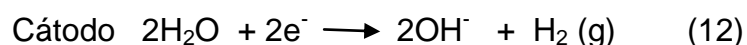
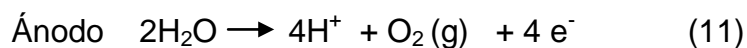


Para la muestra.



El contenido de iones Na^+ provenientes de la fase móvil es intercambiado por iones H^+ en la celda para formar ácido carbónico. Simultáneamente, el contenido de cationes provenientes de la muestra es intercambiado por iones hidrogeno en la celda. Los iones H^+ liberados, reaccionan con la muestra de aniones para formar un ácido de alta conductancia, lo que mejora la sensibilidad de la detección.

El agua en la celda sufre electrolisis:



Después de la salida de la celda, toda la vía de flujo pasa a través de la cámara desgasificadora para remover los gases. El oxígeno y el hidrógeno son removidos por las vías de flujo del ánodo y el cátodo, respectivamente.

El efluente de salida de la celda, el cual contiene la muestra de aniones y el ácido carbónico, entra a la cámara de desgasificación, el ácido carbónico es descompuesto para formar dióxido de carbono y agua. El dióxido de carbono es removido dejando agua (Operating Manual., 2004).

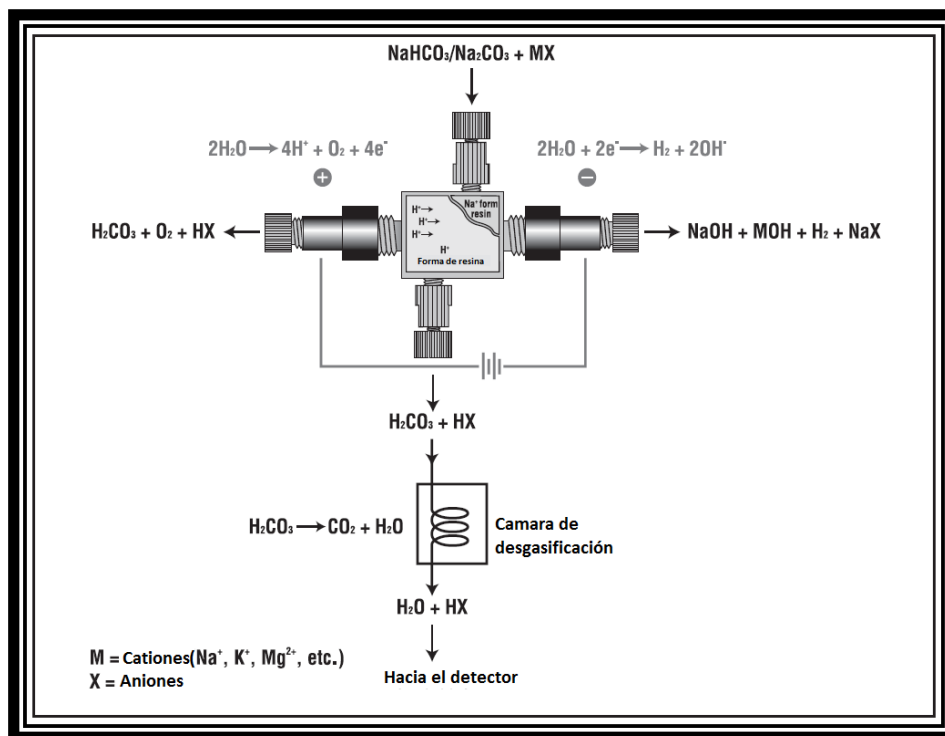


Figura 12. Diagrama del sistema supresor (Operating Manual, 2004).

Para el presente estudio, el detector empleado es un conductímetro (parte 4 de la Fig. 11).

El principio del detector de conductividad es la medición de la conductancia de la fase móvil, antes y durante la elución del ion analito. La respuesta del detector depende de la concentración del analito, grado de ionización de la fase móvil y analito y de las conductancias equivalentes. La polaridad del detector es positiva si se trabaja con un sistema de supresión para el análisis de aniones. El detector no cuenta con gradientes de sensibilidad.

El inyector es una válvula que orienta el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un loop, en el cual se introduce la muestra. La válvula es manual y está constituida por un cuerpo fijo de inyección de 6 vías, un rotor con un sello que gira y un loop de 20 µL.

Los datos son analizados por la computadora con el software Peak Simple acoplada al sistema Peak Sample chromatography data system SRI modelo 203.

3.2.2 Adecuación del sistema.

Para realizar la adecuación del sistema se evaluaron variables del sistema como composición de la fase móvil, velocidad de flujo y temperatura de la columna (Tabla 2) con el propósito de elegir la mejor combinación de condiciones para el método.

Tabla 2. Variables para la adecuación del sistema.

VARIABLE	PARÁMETRO
Temperatura de la columna	40 y 45°C
Composición de fase móvil *	Na ₂ CO ₃ 3.6 mM y Na ₂ CO ₃ 1.8 mM / NaHCO ₃ 1.7 mM
Flujo de la fase móvil	0.8, 0.9 y 1.0 mL*min ⁻¹ .

(*) Se proponen dos fase móviles debido a que en el catalogo del proveedor (Grace Davison Discovery Sciences, 2008) se recomiendan ambas fases para la separación de aniones.

Se utilizó un multiestándar de F⁻, Cl⁻, NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻ y SO₄²⁻ con concentraciones de 5.94, 30.12, 5.97, 5.97, 5.94, 6.03 mg·L⁻¹ respectivamente, partiendo de estándares certificados de la marca Alltech con una concentración de 198 ± 1, 1004 ± 2, 199 ± 1, 199 ± 1, 198 ± 1 y 201 ± 1 mg·L⁻¹ respectivamente. Se realizaron 3 repeticiones por cada cambio de variable de velocidad de flujo y temperatura y se calcularon los siguientes parámetros cromatográficos:

- Resolución.
- Número de platos teóricos.
- Factor de capacidad.
- Asimetría.

Cabe mencionar que las disoluciones empleadas en la adecuación del sistema están preparadas con agua desionizada y fueron filtradas. Las características fisicoquímicas del agua, así como la preparación de los estándares se mencionan en el punto 3.3 de esta tesis.

En el anexo 3 se encuentran las fórmulas utilizadas para el cálculo y en el anexo 4 sus respectivos valores de aceptación.

3.2.3 Validación del método analítico.

El procedimiento utilizado para la evaluación de los parámetros de desempeño en el análisis de aniones por cromatografía de líquidos de tipo iónico está basado en

métodos de estandarización (Method 300.0 EPA, 1993; ISO 10304-2:1996; Crompton, 2002), guías de validación para métodos cromatográficos (Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002) y experimentos publicados en revistas científicas de talla internacional (Gros, et al., 2008; Montoya y Castaño, 2004). A continuación se describe la metodología empleada para cada parámetro de desempeño.

A) Precisión del sistema.

Un analista preparó por quintuplicado, disoluciones a la concentración que representa el 100% de la muestra procesada (300 μL de muestra aforando a 10.0 mL con agua desionizada) para su medición. Se midió la respuesta analítica de cada una de las disoluciones, bajo las mismas condiciones. Se calculó desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV%) de la respuesta analítica.

B) Precisión intermedia.

Se analizó 3 veces una disolución (multiestándar) en tres días diferentes y por tres analistas diferentes. Se calculó la media aritmética (\bar{x}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV%) de las concentraciones leídas. El multiestándar se preparó con una concentración de analitos corresponde 3.46, 301.2, 3.48, 4.97, 3.46 y 30.15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- y SO_4^{2-} , respectivamente, la cual es la concentración promedio del agua de mar previamente procesada para su análisis.

C) Repetibilidad.

Se tomaron 3 muestras, las cuales fueron seleccionadas por ser muestras representativas de agua salada, dulce y salobre, respectivamente: agua de mar (salinidad 31.7), Mulegé (salinidad 0.9) y Los Sueños 3 (salinidad 18.5). Las últimas dos, se inyectaron al equipo de manera directa, previa filtración de la muestra; el agua de mar fue procesada para su medición por dilución de 3:100 (debido a que esta dilución permite la detección de Cl^- y la detección de Br^- sin exceder la capacidad máxima de detección para los iones Cl^-), posteriormente, se realizaron 3 lecturas consecutivas a cada muestra. Con los resultados obtenidos, se calculó el

valor de la media (\bar{x}), desviación estándar (S), desviación estándar relativa, coeficiente de variación (CV%) y el intervalo de confianza de la media (IC).

D) Exactitud.

Se empleó el método de recuperación, mediante la preparación de estándares a diferentes concentraciones de cada anión, que representan el 80, 100 y 120 % de la concentración tomando como 100% (lo correspondiente a 300 μL de aforando a 10.0 mL con agua desionizada). Se realizaron 3 inyecciones por estándar y se construyó una curva de recuperación de $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ recuperados (Y) en función de los $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ añadidos (X). Se calculó la media (\bar{x}), por medio del porcentaje de recobro (ver el anexo 3) y el coeficiente de variación (CV%) para cada nivel de concentración.

E) Linealidad del sistema.

Se evaluó con la preparación de 6 disoluciones de diferente concentración de la solución estándar, utilizando diluciones de la disolución estándar, procurando que la concentración central sea igual a la concentración que representa el 100% de la muestra procesada. Se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición para cada uno de los analitos. Se analizaron 3 veces cada una de las disoluciones, y se obtuvo un gráfico de respuesta analítica (Y) vs concentración (X). Se calculó el valor de la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC_m) al 95% de confianza.

F) Linealidad del método.

Se evaluó con la preparación de 6 disoluciones de diferente concentración de la disolución estándar (la concentración de estas 6 disoluciones entran dentro del gráfico de calibración para cada analito). Se inyectó 3 veces cada multiestándar. Se construyó una curva de calibración de concentración experimental (Y) vs concentración teórica (X) y se calculó el valor de la pendiente (m), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC_m) al 95% de confianza. También se realizó un gráfico de residuales, en el cual, el eje de las

ordenadas (Y) está representado por el valor del residual (concentración teórica menos la concentración estimada) y el eje de las abscisas (X) está representado por la concentración estimada.

G) Límite de detección y límite de cuantificación.

Se prepararon por dilución, 3 multiestándares de 0.16, 0.24 y 0.32 mg·L⁻¹ para el ion SO₄²⁻, 3 multiestándares de 0.16, 0.32 y 0.5 mg·L⁻¹ para el ion F⁻ y 3 multiestándares de 0.24, 0.32 y 0.5 mg·L⁻¹ para los iones Cl⁻, NO₂⁻, Br⁻ y NO₃⁻. Simultáneamente, se prepararon 5 blancos (agua desionizada con una resistividad de 18 MΩ·cm⁻¹). Se midió la respuesta analítica de cada uno, inyectando intercaladamente los blancos y los estándares. Para cada analito, se obtuvo un gráfico de respuesta analítica vs concentración y se calculó el valor de la pendiente (m), el coeficiente de determinación (r²) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC_m). Se calculó el límite de detección utilizando las ecuaciones presentadas en el anexo 3 de esta tesis. Utilizando los mismos datos se calculó el límite de cuantificación utilizando las ecuaciones presentadas en el anexo 3 de esta tesis.

Para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación utilizando los blancos, se calculó la desviación estándar (S) de los mismos, utilizando las ecuaciones presentadas en el anexo 3 de esta tesis.

Las concentraciones utilizadas para el caso de F⁻, NO₂⁻, Br⁻ y NO₃⁻ dan como resultado una curva de calibración en donde está contenido el 50% del límite inferior de la curva de calibración; además de presentar repetibilidad y en el caso de SO₄²⁻ y Cl⁻ por ser las mínimas concentraciones que presentan repetibilidad.

H) Selectividad.

Se llevó a cabo el seguimiento de una muestra, un multiestándar, un blanco y la mezcla del estándar puro más la muestra. Se obtuvieron cromatogramas del: 1) blanco (agua desionizada) para conocer si hay alguna interferencia o algún componente en el agua que sea detectada durante el análisis, 2) multiestándar (para cada anión, se utilizó un estándar diluido en cantidad conocida), 3) muestra (Mulegé) y 4) mezcla de la muestra, más el multiestándar en una proporción 1:3. Los diferentes cromatogramas obtenidos se compararon (tiempos de retención y

números de picos obtenidos en los cromatogramas) y se midió la respuesta analítica de los picos registrados en el cromatograma con respecto a su concentración y su relación (área bajo la curva) comparando el cromatograma de la muestra, el estándar y la mezcla de ambos.

1) Robustez.

Se analizó por triplicado un multiestándar, preparado a las concentraciones de la muestra procesada al 100% en condiciones normales de experimentación (Flujo $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de columna 40°C , fase móvil Na_2CO_3 3.6 mM y una columna Novosep A-2 con No. de lote 070724). Posteriormente, se cambió la concentración de la fase móvil a 3.0 mM y se analizó por triplicado, el mismo multiestándar. Este procedimiento se realizó nuevamente con un cambio a la temperatura de la columna (45°C), un cambio de columna (Novosep A-2 con No. de lote 040810) y por último, con un cambio de flujo ($1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Se calculó la media aritmética (\bar{x}) de la concentración de cada analito en condiciones normales, en condiciones de cambio de temperatura, de cambio de flujo, de cambio de columna y de cambio de concentración de la fase móvil. Con la media aritmética de cada variación, se calculó la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de variación con respecto a la condición normal y se calculó el porcentaje de diferencia mostrado en cada condición de variación con respecto a la condición normal.

3.2.4 Calibración del material volumétrico.

Se calculó la incertidumbre de los matraces volumétricos de 10 mL utilizados para la preparación de las muestras, la referencia y diluciones empleadas en las curvas de calibración y proceso de validación.

La calibración del material volumétrico se realizó por el método de diferencia de masas y consiste en determinar la masa del agua contenida en el matraz volumétrico. Este proceso se realizó 5 veces para cada uno de los 15 matraces aforados que se utilizaron en el experimento. Por medio de tablas de temperatura (anexo 6) se realizó la corrección de densidad del agua y se calculó el volumen real contenido en el matraz. Conociendo estos datos, se calculó la incertidumbre

absoluta, relativa, y combinada. Las fórmulas del cálculo de incertidumbre se muestran en el anexo 2 de ésta tesis.

En el caso de las 4 micropipetas y las pipetas volumétricas de 2.0 y 1.0 mL (utilizadas en el procedimiento experimental) el proceso fue similar a la calibración de los matraces, tomando en cuenta el nivel máximo de descarga de cada micropipeta. Se calculó la incertidumbre absoluta, relativa, combinada y expandida. Para estimar la incertidumbre tipo B, es necesario considerar todas las fuentes de incertidumbre que puedan ser significativas y obtener la contribución individual de cada una de ellas, por lo que para identificar su influencia en la medición de la concentración de un analito se elaboró un diagrama de Ishikawa o de causa-efecto (Fig. 13).

Esto se aplicó para calcular la concentración de cada uno de los seis analitos (Cl^- , Br^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- y SO_4^{2-}) según el tipo de muestra analizada con su incertidumbre.

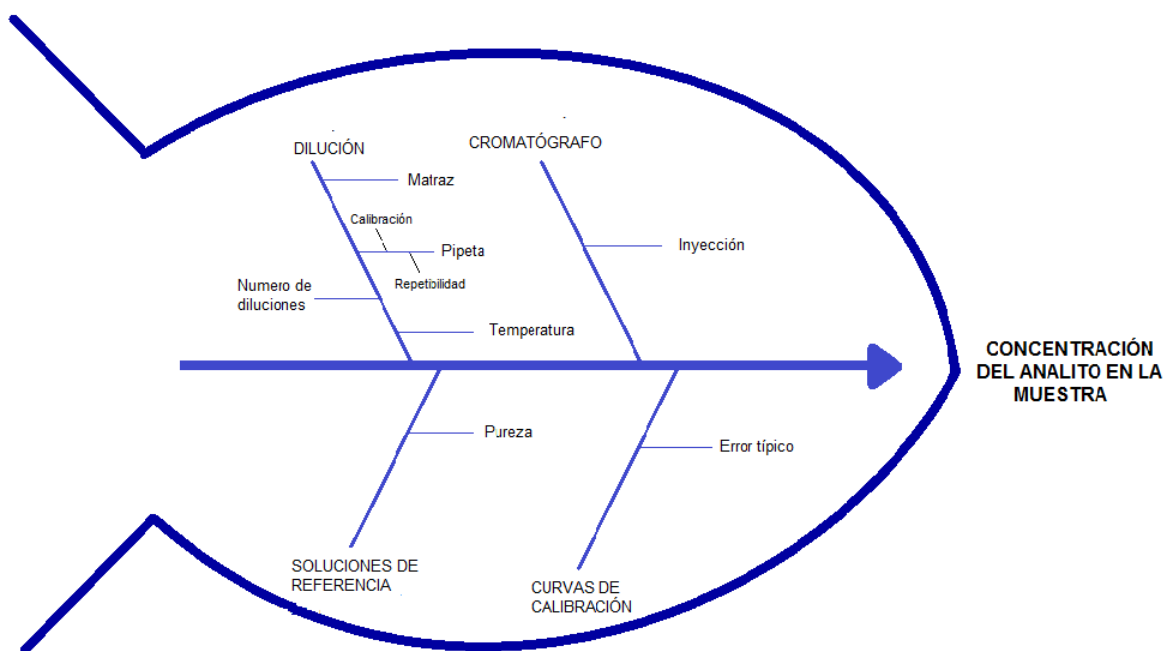


Figura 13 Diagrama de Ishikawa en el que se visualizan las fuentes de incertidumbre de la medición de la concentración de un anión en la muestra.

El cálculo de la incertidumbre tipo B se realizó evaluando el efecto combinado de todas las incertidumbres de cada una de las fuentes de incertidumbre consideradas (pipetas, diluciones, matraces, equipo). Se calcula la incertidumbre asociada a la

repetibilidad o tipo A (ver la ecuación en el anexo 2) y se sumó a la incertidumbre tipo B para obtener la incertidumbre combinada total.

Finalmente, el resultado se multiplicó por un factor de cobertura, el cual tiene un valor de 2 tomando en cuentas una distribución normal, correspondiente a un nivel de confianza del 95% y de esta manera se obtuvo la incertidumbre expandida de la concentración de cada analito.

3.3 Preparación de disoluciones estándar y de muestras.

Para validar el método analítico y cuantificar aniones en agua hidrotermal, es necesario contar con los reactivos adecuados, los cuales deben tener una pureza grado cromatográfico para poder ser utilizados y, en el caso de las diluciones, estar en una concentración mínima detectable para el equipo. A continuación se describe la preparación y utilización de cada una de las soluciones y reactivos empleados para la validación del método y cuantificación de aniones:

- Estándares: Se emplearon estándares certificados por la empresa Grace Davison Discovery Sciences. Cada uno de los seis estándares contenía una sal del anión de interés (Cl^- , Br^- , F^- , NO_3^- y SO_4^{2-} de concentración 1004 ± 2 , 199 ± 1 , 198 ± 1 , 198 ± 1 y 201 ± 1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) y agua desionizada como disolvente. Los estándares contienen sales como KCl con 99,0000%, KBr con 99,000%, NaF con 99,9900%, NaNO_2 con 99.6000%, NaNO_3 con 99,000% y K_2SO_4 con 99.0000% de pureza respectivamente. Estos estándares son utilizados para determinar los criterios estadísticos de la validación.
- Disoluciones para la curva de calibración: Se emplearon disoluciones a diferente concentración del anión de interés (Tabla 3), utilizando como disoluciones madre los estándares certificados.

Tabla 3. Concentraciones en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de los aniones Cl^- , Br^- , F^- , NO_2^- , NO_3^- y SO_4^{2-} utilizadas para la elaboración de las curvas de calibración para determinar el parámetro de linealidad.

ANIONES		F^-	Cl^-	Br^-	NO_2^-	NO_3^-	SO_4^{2-}
ESTÁNDAR	Disolución 1	0.49	100.40	0.50	0.50	0.99	10.05
	Disolución 2	0.99	200.80	0.99	0.99	4.95	20.10
	Disolución 3	2.97	301.20	9.95	2.99	14.85	30.15
	Disolución 4	4.95	401.60	24.87	4.97	24.75	40.20
	Disolución 5	7.92	502.00	29.85	7.96	29.70	50.25
	Disolución 6	9.90	602.40	39.80	9.95	39.60	60.30

- Agua desionizada: Se utilizó un equipo PURELAB UHQ II para obtener agua de alta pureza tipo I ASTM. El agua se somete a un proceso con 5 diferentes tecnologías como la osmosis reversa, adsorción, desionización, microfiltración y fotoxidación. Se obtiene un agua con una resistividad de $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ (dato proporcionado por el equipo).
- Calibradores. Se emplearon 2 soluciones certificadas (QC Check Sample), una solución que contiene cloruros y sulfatos (QC WS Minerals), y otra que contiene fluoruros (QC WP Fluoride). La solución QC WS Minerals está compuesta por 2 viales, por lo tanto, la solución que contiene cloruros y sulfatos tiene que prepararse antes de ser utilizada. Su preparación consistió en adicionar 10.0 mL de la solución del vial 1 a 900 mL de agua desionizada con una resistividad de $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, posteriormente se adicionaron 10.0 mL de la solución del vial 2 a la solución anterior y se llevó a 1.0 L con agua desionizada. La solución certificada QC WP Fluoride se preparó adicionando 10.0 mL del contenido del vial y se diluyó a un volumen de 1 L con agua desionizada de resistividad $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$. En la tabla 4 se muestra el contenido de fluoruro, sulfato y cloruro de las soluciones en mg/L , así como el resultado obtenido utilizando los métodos EPA, su desviación estándar y los límites de aceptación de dichas soluciones, siendo calculados en base a los requerimientos de la National Standards for Proficiency Testing. El certificado de análisis fue expedido por VHG Labs, Inc.

Tabla 4. Estadística de los analitos contenidos en las soluciones calibradoras.

Anión	Unidades	Valor de preparación.	NIST SRM #	Valor de certificado	Medición EPA	Desviación estándar EPA	Límites de aceptación EPA
Cloruro	mg/L	97.7	919a	98.3 ± 0.366	97.8	4.34	87.9-107
Sulfato	mg/L	35.6	3154	35.8 ± 0.386	35.4	2.48	30.4-40.3
Fluoruro	mg/L	0.2991	3183	0.3 ± 0.001	0.3	0.023	0.23-0.37

- Muestras: Se realizaron diluciones de 3:100 para procesar las muestras provenientes de Bahía Concepción y Punta de Mita, con excepción de 3 muestras de Bahía Concepción, las cuales se inyectaron directamente al cromatógrafo (debido a su baja salinidad). Para el análisis de fluoruros y nitritos, las muestras se inyectaron directamente al equipo, sometiéndolas con anterioridad a un proceso de SPE sin dilución. Se utilizó como disolvente agua desionizada.
- Referencia: Se utilizó agua de mar tratada como referencia (Tabla 5) para los parámetros de validación como exactitud, repetibilidad y linealidad del método.

Tabla 5. Clasificación de materiales presentes en el agua de mar y rangos de concentraciones aproximadas (Libes, S., 2009)

FASE	CATEGORIA	RANGO DE CONCENTRACIÓN	EJEMPLO
Solutos	Iones/Elementos mayores	>50 mM	Cl ⁻ , Na ⁺
		10 a 50 mM	Mg ²⁺ , SO ₄ ²⁻ , Ca ²⁺ , K ⁺
	Elementos menores	0.1 a 10 mM	C, Br, N ₂ (g), B ^{**} , O ₂ (g)
		0.1 a 100 µM	Si, Sr ²⁺ , F ⁻ , NO ₃ ⁻ , Li ⁺ , Ar(g), PO ₄ ³⁻ , Rb ⁺ , I ⁻ , Ba ²⁺
	Elementos traza	1 a 100 nM	V, As, U, H+, Ne (g), Ni, Kr(g), Zn, Cr, Cu, He(g), Se, Sb, Al
		<1nM	Ti, Be ²⁺ , Mn, Fe, Co, Ga, Ge, Y, Zr, Cd, Xe(g)
	Materia orgánica disuelta	ng/L a mg/L	Aminoácidos, lípidos, compuestos organometálicos
Gases moleculares	<mM	CH ₄ , CO ₂ , CO, N ₂ O	
Sólidos	Partículas orgánicas	ng/L a mg/L	Plancton (biomasa)
	Partículas inorgánicas	ng/L a mg/L	
Coloides	Coloides orgánicos		
	Coloides inorgánicos		Oxihidroxidos de hierro

C⁺ = Carbon inorganico, incluyendo HCO₃⁻ y CO₃²⁻.

B^{**} = Boro inorganico, incluyendo B(OH)₃⁰ y B(OH)₄⁻.

En base a estos datos, se decidió realizar una dilución 3:100 a la referencia utilizando 300 μL de agua de mar y aforar 10 mL con agua desionizada.

Todas las disoluciones empleadas fueron filtradas.

3.3.1 Utilización de la extracción en fase sólida.

Los cartuchos de extracción en fase sólida son de la marca Alltech, cada dispositivo consiste en 1.5 mL de base poliestireno empacada entre dos capas muy delgadas de polietileno en un molde de inyección de polipropileno. El tipo de polímero es estireno divinilbenceno, siendo el contra ión el catión plata.

Cada dispositivo contiene 2.3 miliequivalentes de Ag^+ , los cuales, bajo condiciones óptimas, son removidos en igual cantidad de haluros provenientes de la muestra, es decir los cloruros, bromuros y yoduros. El cartucho tiene la capacidad de captar 1.2 g·mL de la matriz, por lo tanto la extracción en fase sólida se utilizó únicamente cuando la concentración de fluoruros, nitratos y nitritos no se detecte en la muestra procesada (diluida).

El cartucho se acondicionó con 10 mL de agua desionizada, posteriormente, se eluyeron 2 mL de muestras a través del cartucho. Por último, se lavó con 3 mL de agua desionizada.

La muestra líquida se filtró con un filtro de papel Whatman de 0.2 μm de tamaño de poro y se inyectó al cromatógrafo para cuantificar fluoruros, nitritos y nitratos. En algunas muestras fue necesario añadir una cantidad conocida de los aniones mencionados anteriormente, debido a que la concentración de estos analitos en la muestra era menor al punto inferior de la curva de calibración, como método de adición estándar.

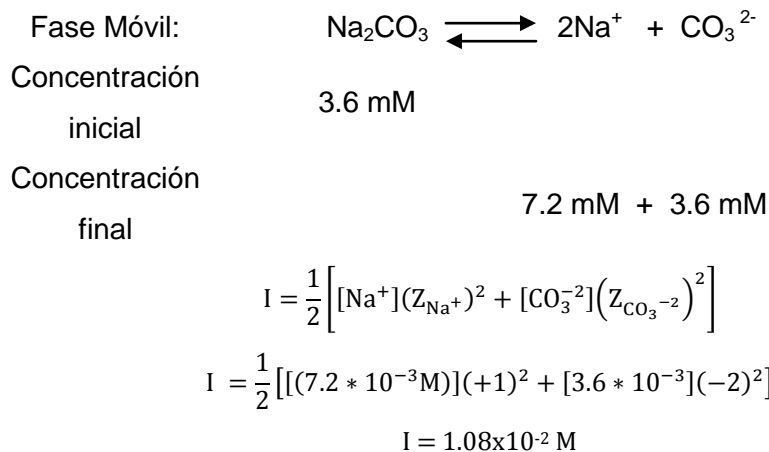
El cartucho se lavó con una disolución de Na_2CO_3 1.8 mM y NaHCO_3 1.7 mM para eliminar los iones cloruro y bromuro del cartucho.

CAPÍTULO IV.

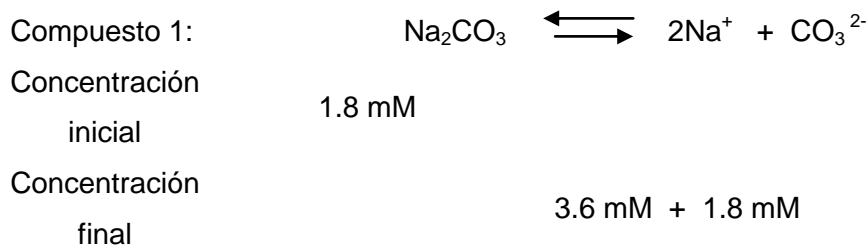
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

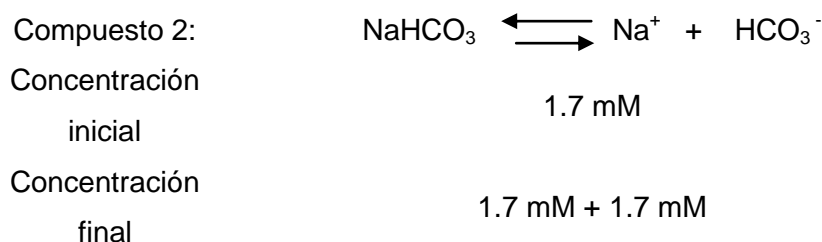
4.1 Adecuación del sistema.

Para la adecuación del sistema se realizaron pruebas para elegir una fase móvil que permita una buena separación de los analitos de interés. Se probaron 2 fases móviles: la primera fase compuesta por la mezcla de Na_2CO_3 1.8 mM y NaHCO_3 1.7 mM y una segunda fase de Na_2CO_3 3.6 mM. Ambas fases se probaron a una temperatura de 40° C y a un flujo de $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ por ser las condiciones intermedias de temperatura y flujo. Comparando parámetros cromatográficos (Fig. 17 y tabla 6) se puede observar que ambas fases separan los analitos de interés, pero la fase móvil $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ requiere de mayor tiempo de análisis en comparación con la fase de Na_2CO_3 3.6 mM, esto debido a que la fase compuesta únicamente de carbonatos tiene una mayor fuerza iónica que la fase móvil $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ como se observa en las siguientes ecuaciones:



La fase móvil compuesta de la mezcla de carbonatos y bicarbonatos se muestra a continuación:





$$I = \frac{1}{2} \left[[\text{Na}^+](Z_{\text{Na}^+})^2 + [\text{CO}_3^{2-}](Z_{\text{CO}_3^{2-}})^2 + [\text{Na}^+](Z_{\text{Na}^+})^2 + [\text{HCO}_3^-](Z_{\text{HCO}_3^-})^2 \right]$$

$$I = \frac{1}{2} [(3.6 \times 10^{-3}\text{M})(+1)^2 + [1.8 \times 10^{-3}]\text{M}(-2)^2 + (1.7 \times 10^{-3}\text{M})(+1)^2 + [1.7 \times 10^{-3}]\text{M}(-1)^2]$$

$$I = 7.1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Con base en estos cálculos, se puede observar que la fuerza iónica de la fase móvil compuesta por Na_2CO_3 es mayor, por lo tanto los aniones eluyen con mayor rapidez en la columna, provocando un tiempo de análisis menor (Quattrocchi, et al., 1992).

Tabla 6. Parámetros cromatográficos correspondientes a la prueba de dos fases móviles para la identificación y cuantificación de aniones.

FASE MÓVIL Na_2CO_3 1.8 mM y NaHCO_3 1.7 mM						
Anión	Tiempo de retención	Platos teóricos	Factor de capacidad	Asimetría	Resolución	Selectividad
Fluoruro	6.23	211	0.76 [#]	2.50 [#]	-	-
Cloruro	10.50	248	1.97	5.06 [#]	1.95	2.59
Nitrito	13.17	2685	2.73	0.11	1.45	1.38
Bromuro	16.74	495	3.74	2.29 [#]	1.77	1.37
Nitrato	19.82	1741	4.61	2.18 [#]	1.25 [#]	1.23
Sulfato	39.70	2964	10.25	1.40	8.25	2.22
FASE MÓVIL Na_2CO_3 3.6 mM						
Anión	Tiempo de retención	Platos teóricos	Factor de capacidad	Asimetría	Resolución	Selectividad
Fluoruro	5.42	246	0.53 [#]	1.85	-	-
Cloruro	8.85	347	1.51	2.50 [#]	2.09	2.81
Nitrito	10.60	2219	2.00	0.20	1.25 [#]	1.33
Bromuro	12.80	481	2.63	1.97	1.36 [#]	1.31
Nitrato	15.90	1400	3.50	1.84	1.54	1.33
Sulfato	23.42	2123	5.63	1.33	4.03	1.61

(#)Valores que exceden el criterio de aceptación. La resolución reportada está calculada con respecto al compuesto de la parte superior.

A pesar de presentar una resolución baja entre los aniones cloruro, nitrito y bromuro empleando la fase móvil de Na_2CO_3 3.6 mM, en la práctica, no tendrá mucha importancia, ya que los nitritos normalmente están en muy bajas concentraciones con respecto a los iones cloruro y bromuro en las muestras, por lo que se

cuantificarán utilizando un pretratamiento de SPE, que elimina a los cloruros y bromuros.

Para la mayoría de los picos que representan a los aniones de interés, el factor de capacidad, la asimetría y selectividad disminuyen. Mientras más baja sea la asimetría en los picos, disminuye la pérdida de precisión del método (Quattrocchi, et al., 1992). Por éste motivo, la fase de Na_2CO_3 3.6 mM se utilizó para el proceso de validación, identificación y cuantificación de aniones.

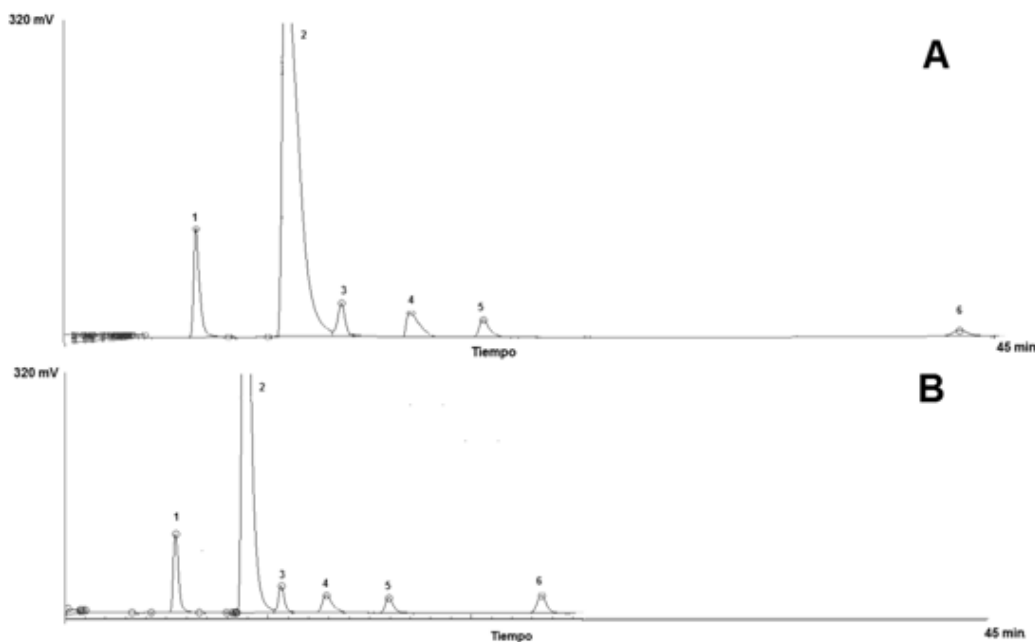


Figura 17. Cromatogramas correspondientes a la prueba de dos fases móviles para la identificación y cuantificación de aniones. (A) Cromatograma de la fase móvil $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 1.8, 1.7 mM respectivamente. (B) Cromatograma de la fase móvil Na_2CO_3 3.6 mM (pico 1: F^- , pico 2: Cl^- , pico 3: NO_2^- , pico 4: Br^- , pico 5: NO_3^- y pico 6: SO_4^-).

La posición de los picos se utiliza para identificar al analito (anión) que contiene la muestra (Fig. 17).

Probando ambas fases, se observó que los iones SO_4^{2-} (pico 6) interaccionan fuertemente con la fase estacionaria. Un gradiente de elución puede ser una alternativa para la reducción del tiempo de análisis de los aniones, ya que al incrementar la concentración de Na_2CO_3 la competencia por los grupos cargados de la fase estacionaria es mayor, provocando que el anión SO_4^- quede menos tiempo retenido en la fase estacionaria y su señal aparezca en un menor tiempo, reduciendo con esto el tiempo de análisis por muestra (Gros, et al., 2008). Un inconveniente

técnico es que el equipo utilizado no tiene la capacidad de realizar un gradiente de elución.

Para fijar las condiciones de temperatura de la columna y flujo de la fase móvil se realizaron diversos experimentos empleando la fase móvil Na_2CO_3 3.6 mM. Comparando los resultados de las tablas 7, 8 y 9, y los parámetros cromatográficos utilizando la fase móvil Na_2CO_3 3.6 mM (Tabla 6), se pudo observar que la variación de temperatura de la columna (Fig. 18) y el flujo de la fase móvil no modificaron en gran manera el tiempo total de análisis, pero la resolución y asimetría de los picos si cambiaron de manera significativa, siendo éste el primer filtro para descartar la condición de 35°C de temperatura de la columna al presentar 3 y 2 analitos con picos que excedieron el valor mínimo de aceptación para el parámetro de asimetría empleando un flujo de 0.9 y 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ respectivamente (ver anexo 4).

Tabla 7. Parámetros cromatográficos a condiciones de temperatura de columna de 35°C.

FLUJO DE LA FASE MÓVIL 0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$					
Anión	Tiempo de retención	Platos teóricos	Factor de capacidad	Asimetría	Resolución
Fluoruro	5.37	230	0.52 [#]	2.17 [#]	-
Cloruro	8.98	317	1.54	2.95 [#]	2.10
Nitrito	10.80	287	2.06	0.31	0.80 [#]
Bromuro	13.25	516	2.75	1.97	1.00 [#]
Nitrato	16.55	1077	3.69	2.05 [#]	1.52
Sulfato	22.85	2054	5.47	1.44	3.12
FLUJO DE LA FASE MÓVIL 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$					
Anión	Tiempo de retención	Platos teóricos	Factor de capacidad	Asimetría	Resolución
Fluoruro	5.93	229	0.68 [#]	2.08 [#]	-
Cloruro	9.88	313	1.80	2.72 [#]	2.08
Nitrito	12.02	1910	2.40	1.35	1.28 [#]
Bromuro	14.57	624	3.13	1.97	1.48 [#]
Nitrato	18.42	857	4.22	2.00	1.59
Sulfato	25.50	1757	6.22	1.38	2.86

(#)Valores que exceden el criterio de aceptación. La resolución reportada está calculada con respecto al compuesto de la parte superior.

Un caso similar se presenta en la condición de 45°C de temperatura de la columna, aunado a una baja resolución en la separación de los analitos bromuro y nitrato a un flujo de 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; y los iones cloruro, nitrito, bromuro a un flujo de 0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, obteniendo una separación de analitos menor al 98%.

Comparando los resultados de la tabla 9 y los parámetros cromatográficos utilizando la fase móvil Na_2CO_3 3.6 mM (Tabla 6) se observó que, en ambos casos, dos aniones no cumplen con el criterio de aceptación de resolución, al igual que en condiciones de temperatura de 45°C y flujo de $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tabla 8. Parámetros cromatográficos a condiciones de temperatura de columna de 45°C .

FLUJO DE LA FASE MÓVIL $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$					
Anión	Tiempo de retención	Platos teóricos	Factor de capacidad	Asimetría	Resolución
Fluoruro	5.29	273	0.48 [#]	2.19 [#]	-
Cloruro	8.12	215	1.28	2.68 [#]	1.62
Nitrito	9.87	1731	1.77	0.34	1.11 [#]
Bromuro	13.12	506	2.68	2.02 [#]	3.67
Nitrato	14.52	922	3.08	1.90	0.66 [#]
Sulfato	22.75	952	5.39	1.43	3.38
FLUJO DE LA FASE MÓVIL $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$					
Anión	Tiempo de retención	Platos teóricos	Factor de capacidad	Asimetría	Resolución
Fluoruro	5.40	232	0.53 [#]	2.08 [#]	-
Cloruro	8.80	362	1.49	2.53 [#]	2.08
Nitrito	10.48	2339	1.97	0.23	1.24 [#]
Bromuro	12.57	464	2.56	1.97	1.31 [#]
Nitrato	15.52	1791	3.39	1.89	1.55
Sulfato	23.72	2250	5.72	1.39	4.73

(#)Valores que exceden el criterio de aceptación. La resolución reportada está calculada con respecto al compuesto de la parte superior.

Tabla 9. Parámetros cromatográficos a condiciones de temperatura de columna de 40°C .

FLUJO DE LA FASE MÓVIL $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$					
Anión	Tiempo de retención	Platos teóricos	Factor de capacidad	Asimetría	Resolución
Fluoruro	4.98	229	0.41 [#]	2.08 [#]	-
Cloruro	8.12	351	1.30	2.65 [#]	2.06
Nitrito	9.70	2257	1.75	0.23	1.24 [#]
Bromuro	10.87	347	2.08	1.97	0.74 [#]
Nitrato	14.50	1164	3.11	1.94	1.42 [#]
Sulfato	21.33	1882	5.04	1.46	3.72
FLUJO DE LA FASE MÓVIL $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$					
Anión	Tiempo de retención	Platos teóricos	Factor de capacidad	Asimetría	Resolución
Fluoruro	5.93	239	0.68 [#]	2.00	-
Cloruro	9.82	339	1.78	2.53 [#]	2.12
Nitrito	11.82	2235	2.35	0.20	1.28 [#]
Bromuro	14.76	640	3.18	1.97	1.76
Nitrato	17.80	1333	4.04	1.95	1.80
Sulfato	25.85	2544	6.32	1.41	4.02

(#)Valores que exceden el criterio de aceptación. La resolución reportada está calculada con respecto al compuesto de la parte superior.

También se observó en la tabla 9, que la asimetría de picos fue baja; sin embargo, los valores reportados a un flujo de $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y temperatura de 40°C fueron aun más bajos que a un flujo de 1.0 y $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

El factor de capacidad para cinco de los seis analitos a cuantificar, es mayor al valor mínimo de aceptación (ver anexo 4) para ambas condiciones de flujo (0.9 y $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). La diferencia del tiempo de análisis fue de aproximadamente 2 minutos, por lo que se decidió utilizar un flujo de $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, tomando como base los valores de asimetría presentados; y una temperatura de columna de 40°C debido a que es un valor intermedio de temperatura de uso que el proveedor recomienda (a una temperatura mayor de 50°C , la fase estacionaria no es estable).

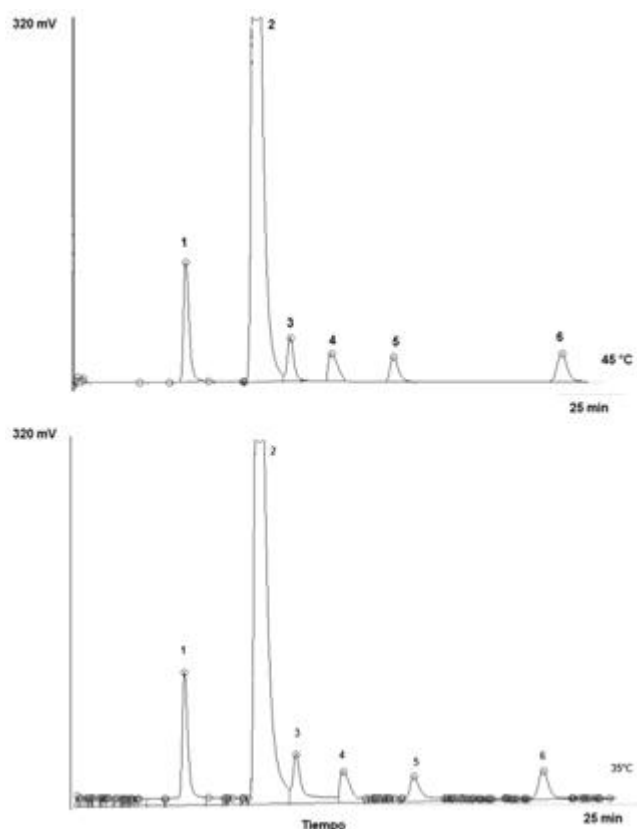


Figura. 18. Comparación de la separación de los seis aniones de interés: pico 1: F^- , pico 2: Cl^- , pico 3: NO_2^- , pico 4: Br^- , pico 5: NO_3^- y pico 6: SO_4^{2-} . Los cromatogramas muestran una separación a una temperatura de 45°C (parte superior) y de 35°C (parte inferior) en la columna, ambas a un flujo de $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

La elección de las condiciones experimentales son las siguientes:

- Sensibilidad $100 \mu\text{S}$.
- Temperatura de columna 40°C .
- Fase móvil Na_2CO_3 3.6 mM .
- Flujo $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Polaridad positiva.
- Temperatura de celda 35°C .

- Conductividad total 2 μS .
- Conductividad basal -1.13 μS .
- Presión 2163 psi.

4.2 Validación del método analítico.

a) Linealidad.

En la tabla 10 se muestran los datos estadísticos que verifican la linealidad del sistema empleado, evaluando con la t de Student con un nivel de confianza del 95%. Se obtuvo un coeficiente de determinación aceptable entre la concentración (X) y la señal analítica (Y), la cual nos permitió cuantificar los aniones F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- y SO_4^- en muestras.

Si el área bajo la curva o bajo el pico de cada analito es proporcional a la concentración del mismo, se obtendrá una correlación entre estas dos variables, la cual podemos ver gráficamente en la figura 19, en la cual se demuestra que para los seis aniones (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- y SO_4^-) existe una tendencia lineal entre la concentración y la respuesta analítica (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de la evaluación del parámetro de desempeño linealidad del sistema.

Anión	Rango de la curva ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ordenada al origen	Pendiente	Coefficiente de determinación	IC_m
Fluoruro	0.495 – 9.9	-21.26	312.77	0.9998	313.88, 311.66
Cloruro	100.4 – 602.4	695.21	192.91	0.9994	193.96, 191.86
Nitrito	0.497 – 9.95	11.67	95.35	0.9951	97.95, 92.75
Bromuro	0.497 – 39.8	-48.93	67.74	0.9968	68.95, 66.53
Nitrato	0.99 – 39.6	-58.37	107.53	0.9995	108.22, 106.84
Sulfato	10.05 – 60.3	-142.97	139.96	0.9999	140.29, 139.63

IC_m = Intervalo de confianza de la pendiente

Como se observa en la tabla 10, los valores de IC_m (intervalo de confianza de la pendiente) corroboran que existe una pendiente significativamente distinta de cero para un nivel de confianza del 95%, ya que el intervalo no incluye el cero y los valores de coeficiente de determinación son muy cercanos a 1. Los criterios de aceptación de los parámetros r^2 e IC_m se cumplen para los seis analitos, siendo el ion nitrito el que mostró un coeficiente de determinación más bajo comparado con los otros cinco analitos, pero lo suficientemente alto para entrar dentro de los criterios de aceptación.

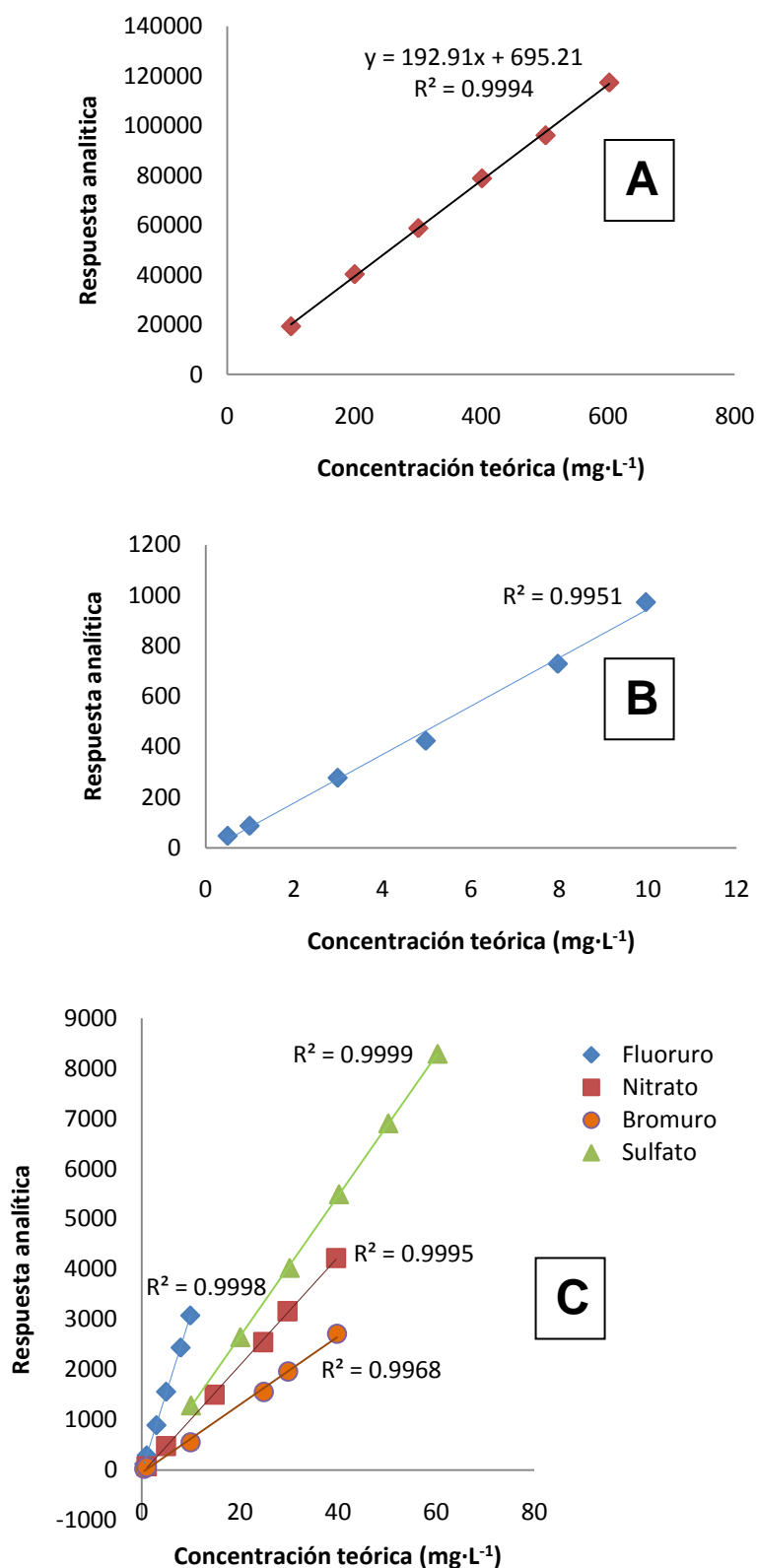


Figura 19. Gráficos de calibración empleadas para la validación y cuantificación de aniones. Gráfico A: Gráfica de calibración del ion cloruro con un rango de concentración de 100.4 mg·L⁻¹ a 602.4 mg·L⁻¹. Gráfico B: Gráfica de calibración del ion nitrito con un rango de concentración de 0.4975 mg·L⁻¹ a 9.95 mg·L⁻¹. Gráfico C: Gráfica de calibración de los iones fluoruro (rombo), nitrato (cuadrado), sulfato (triángulo) y bromuro (círculo) las cuales presentan un rango de concentración de 0.495 a 9.90 mg·L⁻¹, 0.99 a 39.6 mg·L⁻¹, 10.05 a 60.3 mg·L⁻¹ y 0.4975 a 39.8 mg·L⁻¹, respectivamente.

En la evaluación de la linealidad del método se encontró que un comportamiento lineal entre la concentración teórica y la concentración estimada. Los valores de pendiente y ordenada al origen que forman parte de las ecuaciones que describen el método para cada analito, se muestran en la tabla 11.

Al igual que en el parámetro de linealidad del sistema, los valores de IC_m (intervalo de confianza de la pendiente) corroboran que existe una pendiente significativamente distinta de cero para un nivel de confianza del 95%, ya que en el intervalo no se incluye el cero.

Tabla 11. Resultados de la evaluación del parámetro de desempeño linealidad del método.

Anión	Rango de la curva ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación	IC_m	IC_b	CV regresión
Fluoruro	0.99 – 9.90	1.00	-0.008	0.9991	1.013, 0.996	0.039, 0.055	1.18
Cloruro	100.40–602.40	194.70	249.060	0.9997	195.39, 194.01	525.3, 27.17	0.47
Nitrito	0.50 – 10.50	0.99	-0.036	0.9970	1.016, 0.977	0.071, 0.142	2.34
Bromuro	2.98 – 39.80	1.00	-0.198	0.9993	1.010, 0.995	0.001, 0.362	1.16
Nitrato	4.95 – 39.60	1.00	0.104	0.9990	1.012, 0.993	0.329, 0.122	1.11
Sulfato	10.05 – 60.30	1.00	0.404	0.9977	1.012, 0.990	0.922, 0.114	1.43

IC_m = Intervalo de confianza de la pendiente, IC_b = Intervalo de confianza de la ordenada al origen.

El intervalo de confianza de la ordenada al origen (IC_b) incluye el cero, por lo que es estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido ($\alpha=0.025$) y los valores de coeficiente de determinación son mayores a 0.98 para cada gráfico, por lo tanto, se cumplió con todos los criterios de aceptación (ver anexo 4) para el parámetro de linealidad del método aplicado a los seis aniones (F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- y SO_4^{2-}), demostrando estadísticamente la linealidad del método.

b) Precisión.

En la tabla 12 se muestran los valores de precisión: repetibilidad y precisión del sistema. Se evaluó la diferencia entre ensayos debido al método y/o a la naturaleza de la muestra. Los valores de repetibilidad utilizando muestras representativas de agua dulce (Mulege), salina (agua de mar) e hidrotermal (sueños 3) reflejan que la naturaleza de la muestra repercute en la precisión del sistema. A mayor cantidad de sales la precisión disminuye, con excepción de los sulfatos, lo cual indica que muestras con gran cantidad de sales serán más difíciles de cuantificar.

Debido a la cantidad de aniones presentes en el agua hidrotermal y agua de mar, así como a la complejidad de la matriz, es necesario para fijar un criterio de aceptación específico para este tipo de muestras por lo que se empleó la fórmula de Horwitz (Horwitz y Albert, 1994):

$$CV (\%, \text{previsto}) = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

Donde CV es coeficiente de variación y C es concentración.

Si se toma en cuenta que las cantidades de fluoruro y nitrato presentes en el agua de mar son del orden de 10^{-5} M obtenemos un coeficiente de variación de 11.3%, pero si consideramos que la concentración de bromuros y sulfatos presentes en el agua de mar es del orden de 10^{-4} M obtenemos un coeficiente de 8.0% y considerando al ion cloruro se obtiene un coeficiente de 2.2%.

Se consideraron estos coeficientes de variación como criterios de aceptación para cada anión. Los valores mostrados en la tabla 12 están por debajo del criterio de aceptación correspondiente al ion.

Los valores de precisión del sistema entran dentro de los criterios de aceptación (ver anexo 4), demostrando que no hay diferencia entre ensayos.

Tabla 12. Resultados de la evaluación del parámetro de desempeño precisión del sistema y repetibilidad.

ANIÓN	PRECISIÓN DEL SISTEMA		REPETIBILIDAD					
			Mulegé		Agua de mar		Sueños 3	
	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%
Fluoruro	0.017	1.8	0.004	1.7	0.032	3.4	0.012	2.1
Cloruro	6.124	1.3	3.323	0.7	6.125	1.3	3.690	0.7
Nitrito	0.011	1.6	-	-	-	-	-	-
Bromuro	0.015	0.9	0.023	1.1	0.044	2.4	0.026	1.3
Nitrato	0.024	1.1	0.011	0.1	0.059	2.8	0.022	0.8
Sulfato	0.475	0.9	0.509	0.9	0.412	0.7	0.104	0.3

(-) No se encontró la presencia del anión en la muestra.

En la tabla 13 se observa que el CV para cada uno de los iones es menor al CV% correspondiente en los 3 días de análisis.

Tabla 13. Resultados de la evaluación del parámetro de desempeño precisión del método o precisión intermedia.

Anión	DIA 1		DIA 2		DIA 3	
	DE	CV%	DE	CV%	DE	CV%
Fluoruro	0.014	0.4	0.013	0.4	0.017	0.5
Cloruro	1.329	0.4	2.690	0.9	3.477	1.1
Nitrito	0.027	0.9	0.029	1.0	0.043	1.5
Bromuro	0.040	1.0	0.041	1.0	0.027	0.7
Nitrato	0.031	0.8	0.040	1.0	0.017	0.4
Sulfato	0.022	0.1	0.099	0.3	0.402	1.3

Relacionando los resultados obtenidos en el parámetro de linealidad, coincide que el ion fluoruro presenta una mejor linealidad que el ion nitrito, siendo éste último el que tiene un menor comportamiento lineal con respecto a los otros cinco analitos. Para los 3 niveles de precisión (precisión del sistema, repetibilidad y precisión del método o intermedia), se cumple con los criterios de aceptación.

c) Exactitud

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del parámetro de desempeño exactitud. Se observó que la recuperación de cada uno de los analitos fue satisfactoria, siendo el de menor porcentaje de recuperación el analito fluoruro (98.2%) y el de mayor porcentaje de recuperación el analito nitrito (102.6%). Estos datos se analizaron con una prueba *t* de Student, con la cual, se demostró que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% ($t_{teórica} = 1.860$) con un nivel de confianza del 95%. Todos los porcentajes de recobro entran dentro del criterio de aceptación (ver anexo 4).

Tabla 14. Resultados de la evaluación del parámetro de desempeño exactitud.

Anión	Estándar al 80%		Estándar al 100%		Estándar al 120%		μ
	[E]	% R	[E]	% R	[E]	% R	
Fluoruro	0.687	99.2	0.875	98.2	1.116	102.5	99.96
Cloruro	317.05	98.7	394.46	98.2	481.28	99.8	98.90
Nitrito	0.715	102.6	0.882	98.4	1.086	99.1	100.03
Bromuro	1.197	100.3	1.487	99.6	1.792	100.1	100.00
Nitrato	1.587	100.2	1.986	100.3	2.368	99.7	100.07
Sulfato	40.36	100.4	49.99	99.5	60.18	99.8	99.90

[E] = Concentración experimental. % R = Porcentaje de recobro. μ = recuperación media para cada analito.

d) Robustez.

Para evaluar el parámetro de robustez del método analítico se modificaron 4 variables (Tabla 15). Se determinaron los porcentajes de diferencia absoluta de las variables con respecto a las condiciones normales de trabajo, tomando en cuenta la concentración del estándar, el cual fue preparado a la misma concentración para todos los experimentos.

Se observó que el método fue robusto para todos los analitos cuando hay cambios de temperatura de la columna menores a 5°C, cambios de flujo de fase móvil a + 0.1 mL·min⁻¹ unidades y cambios de concentración hasta de 0.6 unidades por debajo de la concentración utilizada para el análisis.

Tabla 15. Variables para la evaluación de robustez del método analítico. Diferencia mostrada en porcentaje (%)

Anión	Normal	TC 35°C	Cambio de columna	Flujo 1.0 mL·min ⁻¹	FM Na ₂ CO ₃ 3.0 mM
Fluoruro	0.860	3.2	8.5	4.8	4.7
Cloruro	389.632	1.0	0.4	2.4	1.6
Nitrito	0.739	0.7	6.4	3.1	1.1
Bromuro	1.284	3.5	7.9	0.9	1.3
Nitrato	2.183	2.3	4.7	4.3	1.6
Sulfato	49.474	0.8	3.2	1.4	3.4

TC = Temperatura de columna, FM = Fase móvil.

Cuando se cambia la columna por una nueva (conservando el tipo de fase estacionaria), es necesario hacer una revalidación debido a que este cambio no mostró una robustez en la mitad de los analitos de estudio. Con un cambio de columna el método no es robusto para los aniones fluoruro, bromuro y nitrito. El criterio de aceptación para este parámetro de desempeño se puede ver en el anexo 4.

e) Selectividad.

Para evaluar el parámetro de selectividad se compararon los cromatogramas obtenidos para el blanco (agua desionizada), un multiestándar (F⁻, Cl⁻, NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻ y SO₄⁻), una muestra procesada (Mulegέ) y la mezcla de la muestra con el estándar con una proporción 1:3.

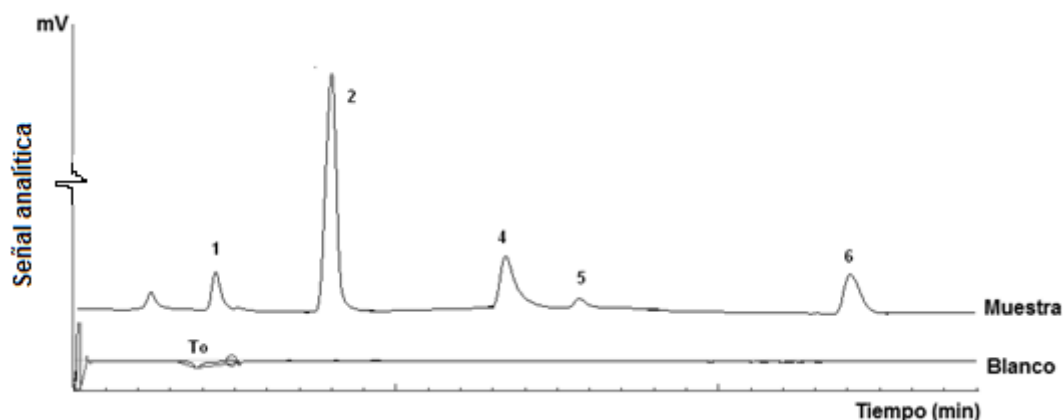


Figura 20. Comparación de 2 cromatogramas para la evaluación del criterio de selectividad del método: muestra y blanco. La señal analítica por la parte inferior presenta una escala para F^{-} (1), Br^{-} (4) y NO_3^{-} (5) de 20 mV a -8 mV, La señal analítica por la parte superior presenta una escala para Cl^{-} (2) y SO_4^{-2} (6) de 5000 mV a -8 mV.

En la figura 20 se observan 2 cromatogramas, siendo la parte inferior de la figura el cromatograma correspondiente al blanco, en el cual no se observa ningún pico, solo una línea recta, lo cual nos indica que el agua empleada para el procesamiento de las muestras y lavado del material está libre de iones. En la parte superior de la misma figura, se observa el cromatograma correspondiente a la muestra (Mulegé). En este cromatograma solo se pueden observar 5 picos, siendo la señal de los nitritos la que no se aparece debido a que no hay iones nitrito en cantidades detectables en la muestra. Los picos correspondientes al cloruro y sulfato se observan a una escala de 5000 mV a -8 mV, mientras que los aniones restantes están en una escala de 20 mV a -8 mV, debido a que los aniones cloruro y sulfato están en mayor proporción con respecto a los cuatro restantes, opacando su señal en el cromatograma. Sin embargo se ponen en el mismo gráfico para efectos de una mejor comparación.

En la figura 21 (parte A2 y B2) se observan los 6 aniones de interés. El pico que representa al ion nitrito (3) en el cromatograma de la figura 21 A2 es ligeramente menos intenso en comparación con el cromatograma de la figura 21 B2, debido a que la muestra no contiene el ion nitrito y la cantidad de nitritos presentes en el multiestándar se ve afectada por la dilución, por lo tanto el pico solo muestra lo contenido en el multiestándar.

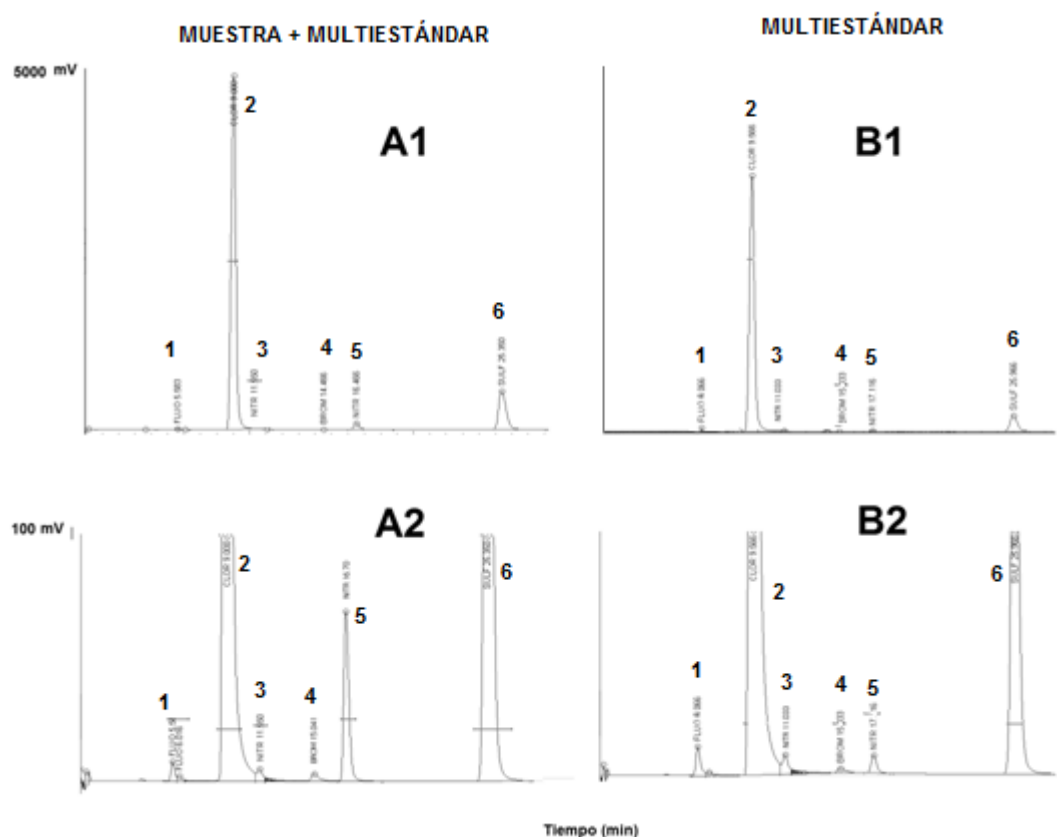


Figura 21. Cromatogramas para la evaluación del criterio de selectividad del método. Cromatogramas A1 y A2 (acercamiento): mezcla de muestra y el multiestándar. Cromatogramas B1 y B2 (acercamiento): multiestándar.

También se puede observar en la figura 21 A1 y B1 que los picos representados por los iones cloruro (2), bromuro (4), nitrato (5) y sulfato (6) presentan un aumento en la respuesta analítica, es decir, los picos son más altos en el cromatograma de la mezcla (Fig. 21 A1 y A2) que en el cromatograma de la muestra (Fig. 20) y el estándar (Fig. 21 B1 y B2) por separado.

En el caso del ion fluoruro (1) se ve una disminución en la señal analítica en la mezcla del multiestándar y la muestra debido a la baja concentración del ion en la muestra y el efecto de la dilución (Fig. 21 A2 y B2).

Con estos resultados se puede afirmar que el método es selectivo para los analitos fluoruro, cloruro, nitrito, nitrato, bromuro y sulfato, debido a que la matriz y el blanco no contienen otros componentes que interfieran en la cuantificación de dichos aniones. Por lo tanto la metodología nos permite cuantificar e identificar simultáneamente los aniones de interés.

f) Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección y el límite de cuantificación fueron determinados mediante 2 métodos: regresión lineal y medición de blancos. Como se aprecia en las tablas 16 y 17 los resultados del límite de detección y el límite de cuantificación en cada método no muestran diferencia.

Tabla 16. Resultados de la evaluación del parámetro de límite de detección.

Anión	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación	IC _m	DE _{blanco}	LD1 (mg·L ⁻¹)	LD2 (mg·L ⁻¹)
Fluoruro	262.91	-10.20	0.9907	264.82, 261.00	7.44	0.038	0.038
Cloruro	223.30	-22.38	0.9954	224.41, 222.19	13.64	0.10	0.10
Nitrito	136.43	-19.97	0.9927	136.97, 135.89	5.54	0.07	0.07
Bromuro	79.77	-12.29	0.9905	80.23, 79.32	1.71	0.13	0.13
Nitrato	134.92	-29.98	0.9882	137.49, 132.35	1.44	0.22	0.22
Sulfato	106.65	-2.49	0.9839	107.45, 105.84	9.70	0.09	0.09

Se utilizaron 2 métodos para la medición del límite: por regresión lineal (LD 1) y por medición de blancos (LD 2). IC_m = intervalo de confianza para la pendiente. DE_{blanco} = desviación estándar de blancos

En la tabla 16 se observa que todos los valores de IC_m (intervalo de confianza de la pendiente) entran dentro del criterio de aceptación (anexo 4) y corroboran que existe una pendiente significativamente distinta de cero para un nivel de confianza del 95.0%, ya que en el intervalo no se incluye el cero.

Tabla 17. Resultados de la evaluación del parámetro de límite de cuantificación.

Anión	LC1 (mg·L ⁻¹)	LC2 (mg·L ⁻¹)
Fluoruro	0.039	0.039
Cloruro	0.10	0.10
Nitrito	0.08	0.08
Bromuro	0.13	0.13
Nitrato	0.22	0.22
Sulfato	0.10	0.10

Se utilizaron 2 métodos para la medición del límite: por regresión lineal (LC1) y por medición del blancos (LC2).

En la figura 22 se observan las curvas de calibración utilizadas para la determinación de límite de detección y límite de cuantificación. Cada una de las curvas presenta una linealidad la cual está representada por el coeficiente de determinación, el cual es mayor o igual a 0.98, siendo el ion sulfato y el ion nitrato los que presentan una linealidad menor pero lo suficientemente alta para considerar que existe una relación lineal entre la concentración y la señal dada por el equipo.

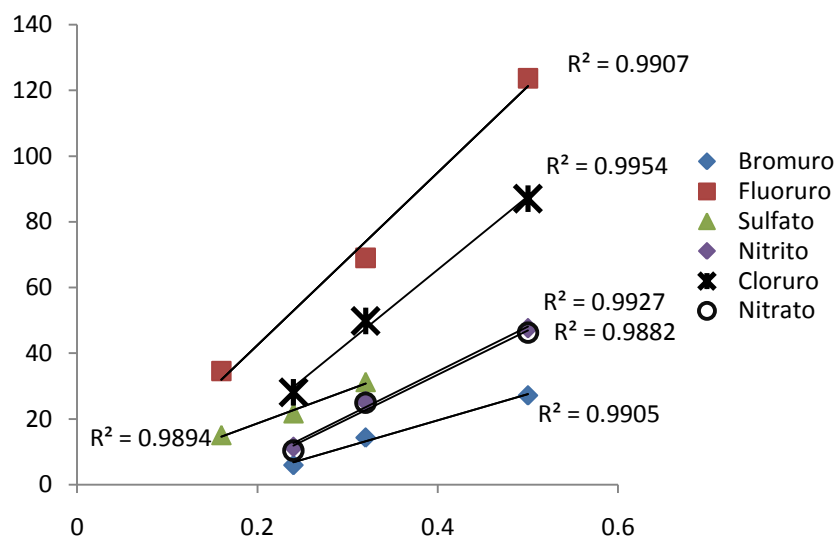


Figura 22. Gráfico que muestra las curvas de calibración utilizadas para determina el límite de detección y límite de cuantificación para cada uno de los analitos de interés.

Todas las curvas de calibración que se realizaron para la cuantificación de los aniones F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- y SO_4^{2-} presentan puntos de concentración mayores a los límites de cuantificación y detección.

4.3 Incertidumbre.

Se calculó la incertidumbre de cuatro micropipetas y los matraces utilizados para la cuantificación de aniones en agua hidrotermal y la preparación de estándares para la validación de la metodología. Los resultados se muestran en la tabla 18, en la cual se puede observar que a mayor variación en el volumen, la incertidumbre se incrementa.

Tabla 18. Resultados de incertidumbre de las micropipetas y matraces utilizados en los experimentos.

Material	Capacidad (mL)	Incertidumbre absoluta	Incertidumbre combinada	Incertidumbre expandida (mL)
Micropipeta Hamilton	0.100	1.17×10^{-3}	1.17×10^{-3}	2.35×10^{-3}
Micropipeta Transferpette	0.200	2.75×10^{-4}	2.75×10^{-4}	5.50×10^{-4}
Micropipeta Hamilton	1.000	1.17×10^{-3}	1.17×10^{-3}	2.35×10^{-3}
Micropipeta Transferpette	1.000	2.69×10^{-3}	2.69×10^{-3}	5.38×10^{-3}
Matraz A	10.0	5.0×10^{-4}	1.38×10^{-3}	2.77×10^{-3}
Matraz B	10.0	9.78×10^{-3}	9.78×10^{-3}	1.94×10^{-2}

La letra A de los matraces indica la precisión del mismo, estos cuentan con ± 0.02 mL de variación en el volumen. Los matraces con la letra B cuentan con ± 0.04 mL de variación en el volumen.

Tabla 19. Resultados de la incertidumbre para la muestra Los Sueños 1.

Anión	Incertidumbre tipo B			Incertidumbre tipo A	Incertidumbre expandida (mg·L ⁻¹)
	Regresión	Matraz	Pipeta	Repetibilidad	
Fluoruro	1.21 x10 ⁻⁸	-	3.02 x10 ⁻⁵	1.80 x10 ⁻⁴	±0.019
Cloruro	2.31 x10 ⁻⁸	7.67 x10 ⁻⁸	6.13 x10 ⁻⁵	0.1637	±3.48
Nitrato	1.66 x10 ⁻⁷	-	6.13 x10 ⁻⁵	2.94 x10 ⁻⁵	±0.01
Sulfato	2.41 x10 ⁻⁷	7.67 x10 ⁻⁸	6.13 x10 ⁻⁵	5.26 x10 ⁻⁴	±0.54

(-) Factor que no se tomó en cuenta para calcular la incertidumbre de la concentración de ese analito.

En la tabla 19 se muestra el resultado de la incertidumbre de la concentración de cada analito presente en la muestra Los Sueños 1. La incertidumbre varía según el tipo de agua y analito que se va a cuantificar, ya que no todas las muestras presentan el mismo tratamiento para realizar el análisis, es decir, algunas muestras fueron preparadas mediante diluciones, adición de estándar o bien fueron analizadas inyectando directamente la muestra con previa filtración.

4.4 Utilidad de la extracción en fase sólida.

La cromatografía iónica aplicada al análisis de agua de mar presenta algunos inconvenientes; uno de ellos es la alta concentración de cloruros que causa una cercanía de los picos de cloruro y nitrito, ya que la amplitud del pico de cloruros no permite determinar con precisión la concentración de los nutrientes como el nitrito (Bruno, et al., 2003), por este motivo es necesario aplicar un pretratamiento de extracción en fase sólida.

Tomando en cuenta que la técnica de extracción en fase sólida es empleada en la determinación de pesticidas y otros contaminantes (Lohumi, et al; 2004) se utilizó para la preparación de las muestras de agua de mar y descargas hidrotermales para cuantificar iones fluoruro, nitrito y nitrato.

Se realizaron pruebas para conocer el funcionamiento de la extracción en fase sólida (Fig. 23 A) en las cuales se pueden identificar la aparición de un pico negativo el cual representa a un compuesto de menor conductividad que la fase móvil (Montoya y Castaño, 2004), este compuesto probablemente proviene de la muestra, ya que en las pruebas realizadas para eliminar los iones cloruro en un estándar no aparece el pico negativo (Fig. 23 A y B).

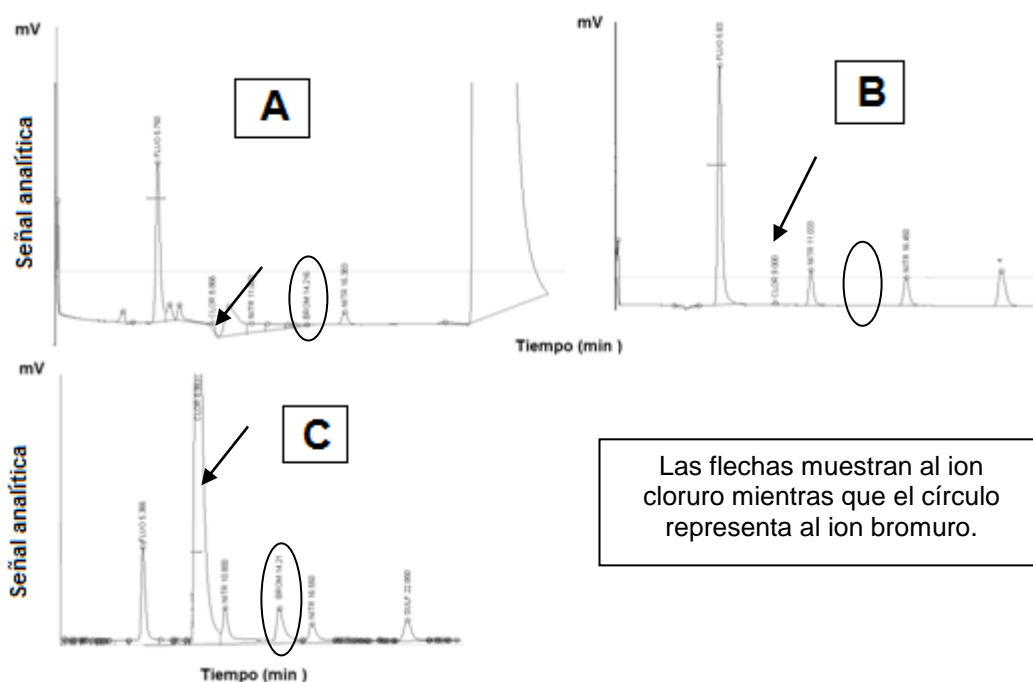


Figura 23. Cromatogramas para ver el funcionamiento de la extracción en fase sólida. Cromatograma A: Agua de mar después de un tratamiento de extracción en fase sólida. Cromatograma B: Multiestándar después de un tratamiento de extracción en fase sólida. Cromatograma C: Multiestándar antes de un tratamiento de extracción en fase sólida.

También se observa que el cloruro disminuye considerablemente después de aplicar tratamiento de extracción en fase sólida (Fig. 23 A), al quedar prácticamente eliminado de la muestra. Debido al tipo de intercambiador, el cartucho también elimina a los iones bromuro, ya que estos también tienen la capacidad de formar precipitados con los iones Ag^+ que se encuentran en el cartucho (ver cálculo de precipitación de AgCl , AgBr y AgI en el marco teórico). De manera que se tiene que cuantificar al mismo tiempo los iones cloruro y bromuro ya que una vez hecho el pretratamiento de la muestra con una extracción en fase sólida para eliminar cloruros, también se eliminarán los bromuros y no habrá manera de cuantificarlos. El principal problema del manejo de muestras naturales es la alta cantidad de iones inorgánicos que pueden sobrecargar la capacidad de los adsorbentes utilizados en la extracción en fase sólida.

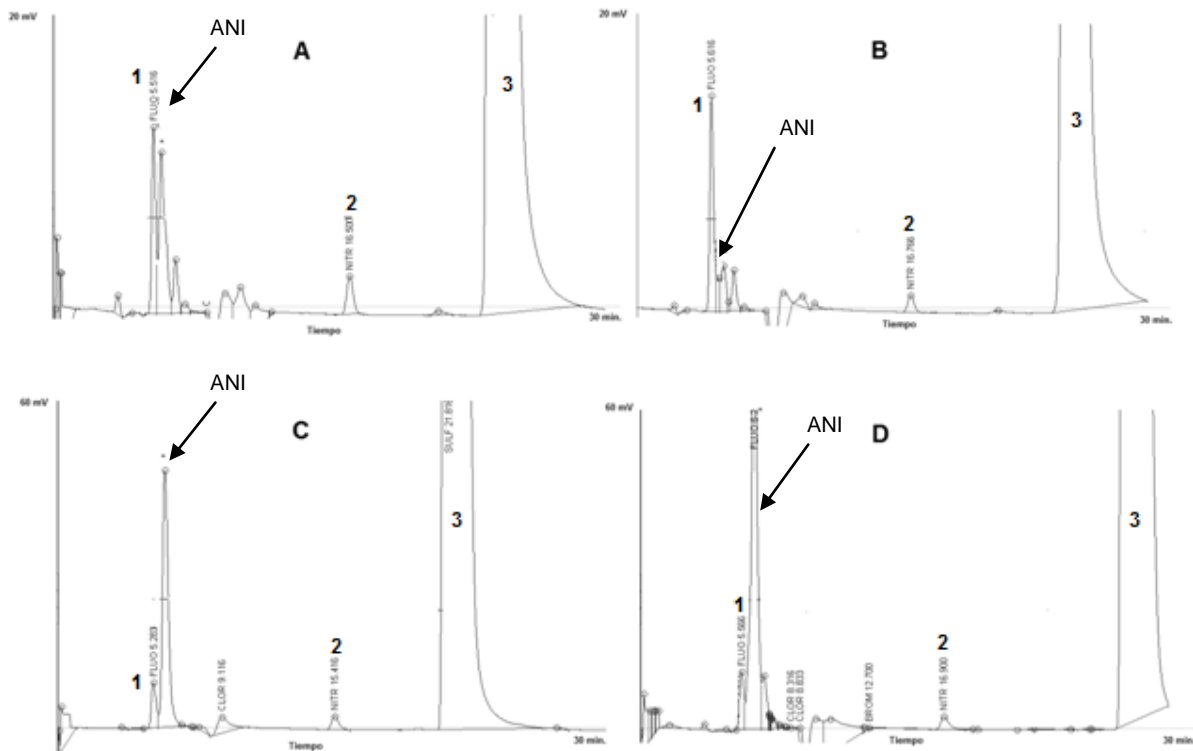


Figura 24. Cromatogramas de las muestras Los Sueños 6 (A), Los Sueños 8 (B), Los Sueños 3 (C) y Los Sueños 1 (D) después de una extracción en fase sólida. Anión no identificado (ANI). Fluoruro (1). Nitrato (2). Sulfato (3).

En la figura 24 se muestran los cromatogramas de 4 descargas hidrotermales, provenientes de Bahía Concepción, Baja California Sur, las cuales fueron procesadas mediante una extracción en fase sólida. En los cromatogramas A, C y D, es evidente la aparición de un anión no identificado. Este anión se encuentra en una mayor cantidad en comparación con el ion fluoruro. Debido al cambio de pH (alrededor de 7 a casi 3) de la muestra después de la extracción en fase sólida, es probable que se origine un oxihaluro, probablemente una especie ClO_2^- con el remanente de cloruro que estuviera presente en la muestra. Esto es más evidente cuando el cartucho se ha reutilizado, lo cual nos indica que hay una sobrecarga en el adsorbente (Bruno, et al., 2003). Por tanto, el uso de los cartuchos deberá ser más frecuente (aproximadamente 2 cartuchos por muestra) tomando en cuenta la alta concentración de cloruros en la muestra.

Para poder cuantificar estos aniones se disminuyó la concentración de la fase móvil, utilizando una fase de 3.0 mM de Na_2CO_3 (en vez de 3.6 mM usada inicialmente), condición experimental que mostro ser válida para cuantificar iones fluoruro, nitrito y

nitrate (see part 4.2 paragraph "d" of this chapter). The separation of the peaks improves, but the analysis time increases to 30 minutes.

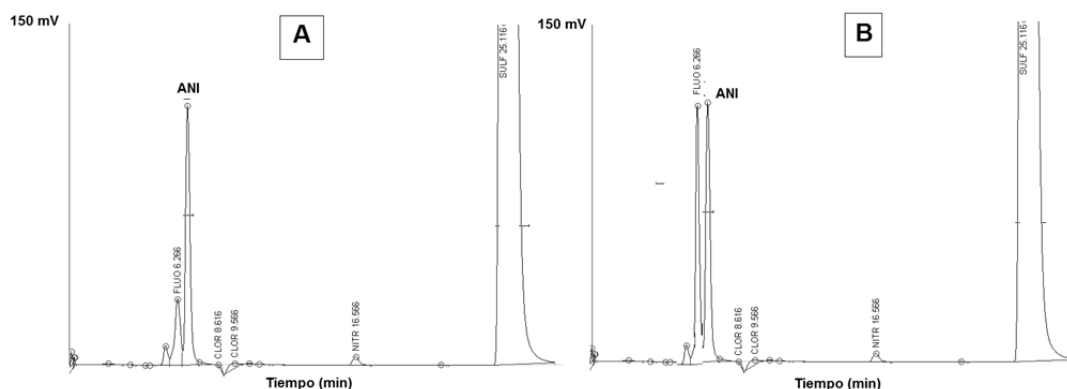


Figure 25. Chromatogram of the sample Los Sueños 4 with a solid phase extraction pretreatment. Chromatogram A: Sample. Chromatogram B: Sample plus the addition of a fluoride ion standard. ANI = unidentified anion. FLUO = fluoride ion. NITR = nitrate ion. SULF = sulfate ion.

To identify if the peak identified as "FLUO" corresponded to the fluoride ion, a standard fluoride ion was added to a processed sample (Fig. 25), which confirmed that the peak identified as "FLUO" indeed corresponds to the fluoride ion.

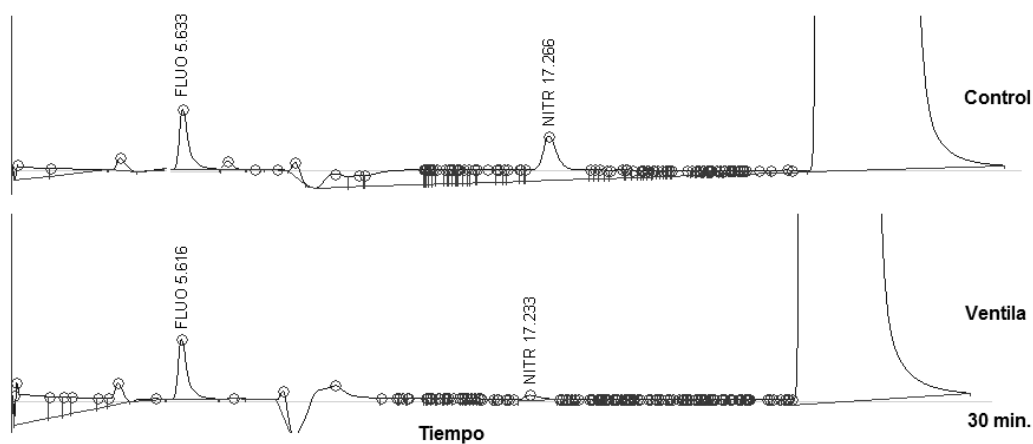


Figure 26. Chromatograms of samples from Punta de Mita, Nayarit prepared with SPE. Upper part: control sample (sea water taken at 500 m distance from the vent). Lower part: vent sample (hydrothermal water). FLUO = fluoride ion. NITR = nitrate ion.

For the samples from Punta de Mita, Nayarit, it was not convenient for the quantification of fluorides and nitrates using solid phase extraction (Fig. 26) achieving an improvement in the signal intensity of fluorides and nitrates.

En las 14 muestras analizadas mediante la técnica de cromatografía de tipo iónico y extracción en fase sólida no se detectaron iones nitrito. No se puede asegurar la ausencia de estos iones en las muestras ya que el límite de detección del método para el análisis de nitritos es de $0.074 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo que existe la posibilidad de que los iones nitrito se encuentren en menor cantidad en las muestras, pero por éste método no se puede cuantificar.

Cabe resaltar que la metodología utilizada para la determinación de aniones en agua hidrotermal y agua de mar es útil pero presenta algunos inconvenientes como la cantidad de cloruro y sulfatos presentes en las muestras pueden afectar el funcionamiento de la columna. Debido a las altas concentraciones de cloruros en las muestras solo se pensó en eliminar a éste analito de la muestra, pero como se observa en la figura 26, la cantidad de sulfatos también es un problema si no se hace una dilución a la muestra, por lo que se tendría que utilizar extracción en fase sólida para eliminar sulfatos, provocando con ello que la metodología sea más costosa.

4.5 Cuantificación de aniones de las descargas naturales en Bahía Concepción, Baja California Sur y Punta de Mita, Nayarit.

Los parámetros fisicoquímicos del agua hidrotermal ayudan en la identificación del tipo de agua que proviene de la descarga, siendo de gran importancia los sólidos totales disueltos, pH, conductividad y salinidad, ya que éstos parámetros están relacionados con la composición de sales (aniones) presentes en el agua. En la tabla 20 se muestran los resultados de los cinco parámetros de cada una de las descargas en Bahía Concepción y Punta de Mita, así como del agua de mar y muestras representantes de agua dulce.

La salinidad es la cantidad total en gramos de las sustancias sólidas contenidas en un kilogramo de agua del mar (Libes, 2009). Para el agua de mar oscila entre 33 y 37. En la tabla 20 se puede observar que la salinidad del agua de mar fue de 34.1 lo cual, coincide con el resultado esperado, pero las descargas hidrotermales costeras de Bahía Concepción, presentaron una salinidad menor al 24, lo cual es un indicativo de un fenómeno de dilución en el agua presente en las descargas.

Tabla 20. Parámetros fisicoquímicos de cada una de las descargas encontradas en Bahía Concepción y Punta de Mita.

Área de estudio	Muestra	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (mS·cm ⁻¹)	TDS (g·L ⁻¹)	Salinidad	
Bahía Concepción, Baja California Sur	Agua hidrotermal	Los Sueños 1	56.1	7.69	34.5	17.27	21.7
		Los Sueños 2	56.4	6.80	36.6	18.28	23.1
		Los Sueños 3	52.3	6.33	29.9	14.93	18.5
		Los Sueños 4	55.7	6.83	35.1	17.56	22.1
		Los Sueños 5	50.9	7.18	35.1	17.48	22.0
		Los Sueños 6	50.1	6.76	36.8	18.40	23.3
		Los Sueños 7	40.6	7.32	34.7	17.35	21.8
		Los Sueños 8	57.4	7.36	36.3	18.14	22.9
		Los Sueños 9	42.5	7.33	35.0	17.50	23.9
	Agua de mar	La Posada	49.2	7.25	35.0	17.35	21.9
			23.0	8.06	47.4	23.7	31.8
Agua dulce	Mulegé	19.0	8.00	1.9	0.94	0.9	
	San Ignacio	19.0	7.99	1.3	0.64	0.6	
	La trinidad	19.0	8.54	2.4	1.21	1.2	
Punta de Mita, Nayarit	Agua de mar	5 metros de profundidad	29.2	8.20	40.1	20.1	34.6
	Agua hidrotermal	Ventila	29.6	8.13	36.7	18.33	32.2

TDS = Sólidos totales disueltos.

Los parámetros fisicoquímicos de conductividad, sólidos totales disueltos y salinidad (Tabla 20) guardan una relación con la cantidad de cloruros encontrada en las diferentes descargas (Tablas 21 y 22) esto se debe a que el 98.0% de la sal contenida en el agua de mar, es NaCl y el 2.0% restante corresponde a otras sales (Gros, et al; 2008), por lo tanto, las características de conductividad del agua y salinidad estarán dadas por la cantidad de cloruro contenida en cada una de las muestras.

Tabla 21. Resultados de la cuantificación de aniones en agua hidrotermal, dulce y salina en Bahía Concepción.

Muestra	Concentración (mg·L ⁻¹)					
	Fluoruro	Cloruro	Bromuro	Nitrato	Sulfato	
Agua hidrotermal	Los Sueños 1	0.585±0.019	7412.88±3.48	ND	1.13±0.01	376.69±0.54
	Los Sueños 2	0.618±0.011	11305.62±3.11	ND	1.15±0.09	685.57±1.23
	Los Sueños 3	0.534±0.008	17100.82±10.00	60.54±0.09	1.13±0.01	987.33±3.59
	Los Sueños 4	0.488±0.020	12627.52±5.80	48.79±0.17	1.33±0.17	686.08±3.59
	Los Sueños 5	0.453±0.002	8491.60±4.57	45.41±0.74	1.72±0.03	456.83±0.45
	Los Sueños 6	0.624±0.023	17528.83±9.93	60.14±0.05	1.09±0.06	1008.90±0.40
	Los Sueños 7	0.363±0.064	16105.64±6.12	55.63±0.61	0.70±0.09	669.81±0.20
	Los Sueños 8	0.733±0.112	16800.11±7.52	58.27±0.41	0.81±0.12	860.78±0.50
	Los Sueños 9	0.673±0.039	18288.67±4.79	61.94±0.29	1.70±0.03	1181.80±0.34
	La posada	0.645±0.023	11742.63±7.80	46.55±0.86	19.46±1.13	603.23±1.35
Agua dulce	Mulegé	0.243±0.013	454.69±4.11	2.06±0.63	32.80±0.94	164.15±1.42
	San Ignacio	0.334±0.188	233.51±5.84	1.15±0.10	5.94±0.20	41.96±5.61
	La trinidad	1.365±0.051	542.27±2.45	1.86±0.08	1.01±0.25	238.75±8.93
Agua de mar		0.717±0.533	20956.46±3.57	53.41±0.91	1.59±0.88	2824.43±4.81

ND = Anión que no pudo ser detectado.

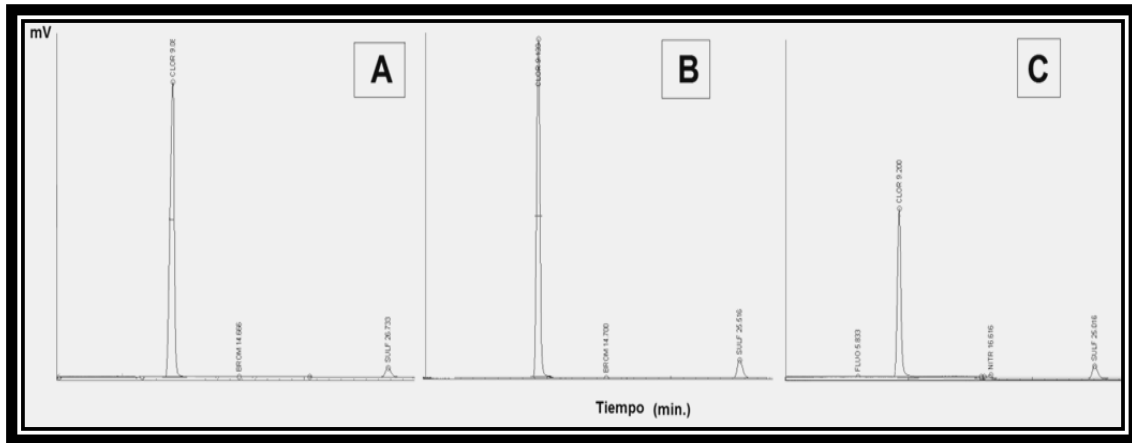


Figura 27. Cromatogramas de las muestras provenientes de Bahía Concepción, Baja California Sur. Agua hidrotermal: Los Sueños 3 con factor de dilución de 1:33 (A). Agua de mar con un factor de dilución de 1:33 (B). Agua dulce: San Ignacio sin diluciones (C).

El agua de mar es la que presenta una mayor cantidad de cloruros (Fig. 27 A) y la que tiene mayor conductividad, sólidos totales disueltos y salinidad. Por el contrario, la muestra proveniente de San Ignacio presentó la más baja cantidad de cloruros (Fig. 27 B), por lo tanto, también es la que presentó la más baja conductividad, sólidos totales disueltos y salinidad en comparación con las 18 muestras analizadas. Estas dos muestras son un ejemplo de agua salina y agua dulce (Fig. 27 C), respectivamente.

El agua dulce es aquella que tiene cantidades mínimas de sales disueltas, por lo tanto su salinidad es muy baja (Fig. 28).

Para saber si hay una diferencia entre las descargas se aplicó una prueba estadística ANOVA utilizando como estadígrafo la F de Fisher. Se pudo concluir que las diez manifestaciones hidrotermales de Bahía Concepción son significativamente iguales al 95% de confianza con base a la composición de aniones mayoritarios, pH, conductividad, salinidad, sólidos totales disueltos y temperatura de descarga (ver tabla 1 del anexo 5).

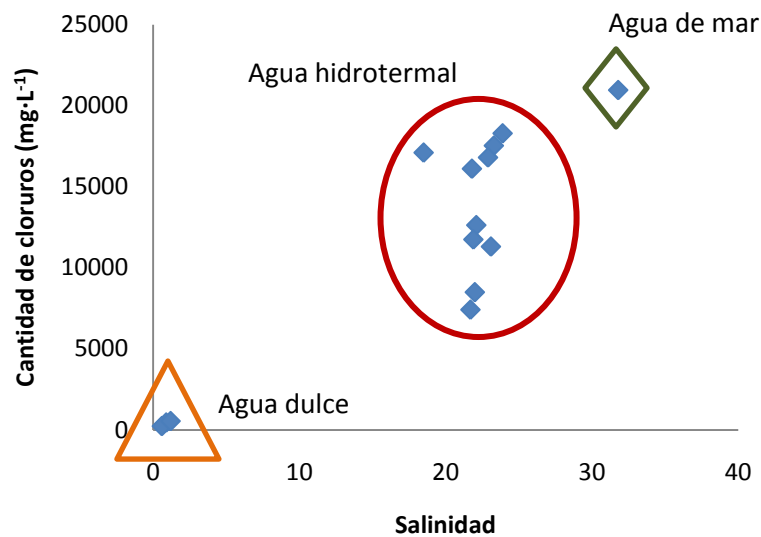


Figura 28. Gráfico en donde se puede observar como varía la salinidad con respecto a los iones cloruro de las muestras provenientes de Bahía Concepción. Se pueden distinguir 3 tipos de agua: dulce (triángulo), hidrotermal (círculo) y agua de mar (rombo).

Normalmente, el ion bromuro se encuentra en niveles muy bajos en fluidos geotérmicos, excepto cuando hay mezcla de fluido hidrotermal con agua de mar.

Si comparamos el agua hidrotermal, el agua dulce y el agua de mar se observó que no existe diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza entre tipo de agua, con base a la composición de aniones mayoritarios, pH, conductividad, salinidad, sólidos totales disueltos y temperatura de descarga (ver tabla 2 del anexo 5).

En el caso del sistema hidrotermal submarina localizado en Punta de Mita, Nayarit, no se puede determinar si la cantidad de cloruros proviene únicamente de la descarga o bien si existe una combinación de agua de mar y agua hidrotermal producto de la mezcla con agua de mar en el muestreo (Tabla 22 y fig. 29), ya que los datos obtenidos no son estadísticamente significativos (ver tabla 3 del anexo 5). Los parámetros fisicoquímicos tampoco presentan una diferencia significativa después de aplicar una prueba *F* de Fisher con una confiabilidad del 95%.

Tabla 22. Resultados de la cuantificación de aniones en agua hidrotermal y salina en Punta de Mita.

Muestra		Concentración (mg·L ⁻¹)				
		Fluoruro	Cloruro	Bromuro	Nitrato	Sulfato
Agua de mar	Superficie	0.230±0.025	14987.01±4.42	71.20±0.77	0.24±0.06	1960.26±0.26
	5 metros de profundidad	0.210±0.039	22151.54±14.43	91.08±0.78	0.43±0.03	2860.05±4.87
	Control	1.239±0.053	19587.88±3.57	85.35±0.91	0.90±0.16	2268.24±4.81
Agua hidrotermal		1.053±0.072	18081.42±8.14	309.55±1.02	5.78±0.88	71.50±0.25

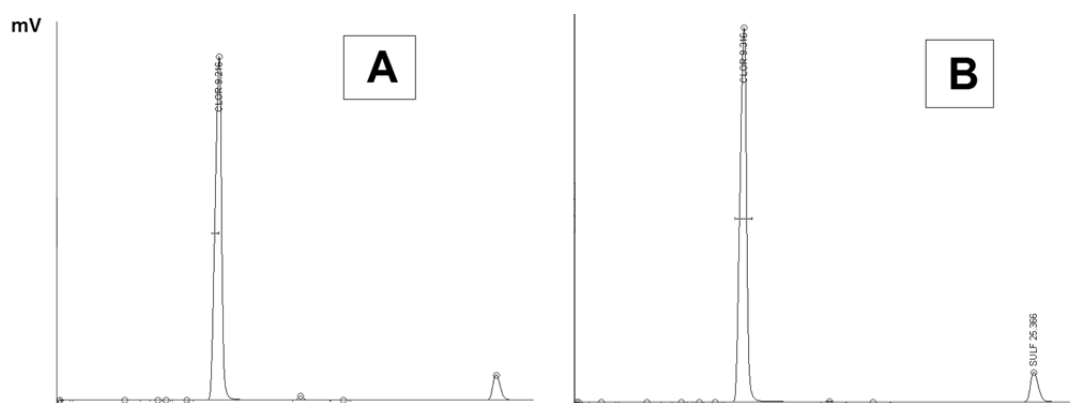


Figura 29. Cromatogramas de las muestras provenientes de Punta de Mita, Nayarit. Agua hidrotermal (A). Agua de mar: Control (B).

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES.

El método de extracción en fase sólida mejoró la respuesta analítica de los iones fluoruro y nitrato en muestras con alta concentración de iones cloruro. La desventaja es cuando las muestras presentan alta salinidad (mayor a 20), se utilizaron mas cartuchos de extracción en fase sólida provocando que el costo del análisis se eleve, y por lo tanto es recomendable el uso dependiendo de la naturaleza de la muestra; además es necesario cuantificar los iones bromuro y cloruro empleando una dilución, ya que el pretratamiento de extracción en fase sólida elimina a ambos aniones.

En la etapa de validación, se obtuvo evidencia estadística suficiente para comprobar que el método propuesto es apto para cuantificar aniones mayores en aguas de diferente salinidad, presentando precisión, exactitud, linealidad dentro de los intervalos de concentración estudiados para los seis aniones estudiados y selectividad. El método presentó robustez solo para los iones Cl^- , NO_3^- y SO_4^{2-} al ser evaluado con cambios de temperatura, columna, concentración y flujo de fase móvil; sin embargo, en el caso de los aniones NO_2^- , Br^- y F^- , es necesario revalidar el método cuando existiere un cambio de columna.

Esta metodología se recomienda para el análisis de Br^- , Cl^- , NO_3^- , NO_2^- y SO_4^{2-} , siendo una buena alternativa para el análisis de aniones mayores en aguas naturales; también puede utilizarse para F^- pero con ciertas limitaciones, ya que en el caso de matrices desconocidas, por la dificultad de medir bajas concentraciones y presencia de ciertos compuestos que eluyen muy próximos a los fluoruros, complican la cuantificación de iones fluoruro.

El tipo de agua proveniente de la zona de estudio de Bahía Concepción, es una mezcla de agua de mar y meteórica, debido a la relación de la concentración de cloruros y bromuros que presentan. En cambio, no se puede definir si la composición química de las descargas hidrotermales submarinas provenientes de Punta de Mita presenta el fenómeno de mezcla, debido a que las concentraciones de iones cloruro son muy cercanas entre la descarga hidrotermal y la zona control (500 m de distancia de la

ventila), donde está presente únicamente el agua de mar, lo que nos indica que el muestreo es una etapa importante para la obtención de un resultado confiable.

Cabe mencionar que esta técnica es utilizada como una técnica alternativa para la cuantificación de iones en agua natural y potable, debido a que en México solo existen normas nacionales que permiten la cuantificación de estos iones empleando métodos volumétricos, nefelométricos y potenciométricos.

Se ha probado la técnica de cromatografía de líquidos de tipo iónico para analizar agua de mar pero, por sí sola, no da buenos resultados; sin embargo, si se complementa con otra técnica de separación como la extracción en fase sólida, el análisis de muestras naturales se realiza de manera rápida, precisa, con menor cantidad de muestra y menos interferencias durante el análisis en comparación con las técnicas empleadas en las normas nacionales.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

1. Alltech, 2004, Operator's manual. HPLC, 71 pp.
2. Bruno, P., Caselli, M., De Gennaro, G., De Tommaso, B., Lastella, G., Mastrolitti, S., 2003, Determination of nutrients in the presence of high chloride concentrations by column-switching ion chromatography, *J. Chromatography A*, 1003: 133-141.
3. Canet, C., Prol-Ledesma, R. M., Melgarejo, J.C., Reyes, A., 2003, Methanerelated carbonates formed at submarine hidrothermal spring: a new setting for microbially-derives carbonates?, *Marine Geology*, 199: 245-261.
4. Comisión de Validación de Métodos Analíticos, 2002, Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de químicos Farmacéuticos Biólogos, México, 123 pp.
5. Crompton, T.R., 2002, Determination of anion in natural and treated waters, Spon Press, Great Britain, 828 pp.
6. Data sheet 30266U., 1999, IC-Ag and IC- Ag Plus Devices. Alltech, July 16th.
7. García de Marina, A., Yusá, J. D., 2008, HPLC fundamental, Universidad Politecnica de Valencia, 377 pp.
8. Grace Davison Discovery Sciences, 2008, Chromatography products, Applications, 512 pp.
9. Gros, N., Camoes, M. F., Oliveira, C., Silva, M. C. R., 2008, Ionic composition of seawaters and derived saline solutions determined by ion chromatography and its relation to other wáter quality parameters, *J. Chromatography A*, 1210: 92–98.
10. Haddad, P. R., 2004, Ion Chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379: 341-343.
11. Horwitz, W., Albert, R., 1995, Precision in analytical measurements: expected values and consequences in geochemical analyses, *J. Analytical Chemistry*, 351:507-513.
12. Hu W., Haddad, P. R., Tanaka, K., Sato, S., Mori, M., Xu, Q., Ikedo, M., Tanaka, S., 2004, Determination of monovalent inorganic anions in high-ionic-strength samples by electrostatic ion chromatography with suppressed conductimetric detection, *J. Chromatography A*, 1039: 59-62.

13. Huang, Y., Mou, S. F., Liu, K. N., Rivielo, J. M., 2000, Simplified column-switching technology for the determination of traces of anions in the presence of high concentrations of other anions, *J. Chromatography. A*, 884: 53–59.
14. INEGI <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?ent=18>
[consulta: 04 de Abril del 2011]
15. ISO 10304-2:1996, Agosto 1996, Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía iónica en fase líquida. Parte 2: Determinación de bromuro, cloruro, nitrato, nitrito, ortofosfato y sulfato en aguas residuales. Comité Europeo de Normalización, 24 pp.
16. Libes, S., 2009, *Introduction to Marine Biogeochemistry*, 2da edition, Elsevier, USA, 909 pp.
17. Lohumi, N., Gosain, S., Jain, A., Gupta, V.K., Verna, K.K., 2004, Determination of nitrate in environmental water samples by conversion into nitrophenols and solid phase extraction-spectrophotometry, liquid chromatography or gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 505: 231-237.
18. Mendoza-Salgado, R.A., Lechuga-Devéze, C.H., Ortega-Rubio, A., 2006 Influence of rainfall on a subtropical arid zone coastal system, *Journal of Arid Environments*, 66: 247- 256.
19. Method 300.0, August 1993, Determination of Inorganic anions by ion chromatography, Environmental Protection Agency, Ohio, USA.
20. Meyer, V. R., 2007, Measurement uncertainty, *J. Chromatography A*, 1158: 15-24
21. Miller, J. C., Miller, J. N., 1993, *Estadística para Química Analítica*, 2da edición, Addison-Wesley Iberoamericana, USA, 211 pp.
22. Montoya, P., Castaño, J. G., 2004, Validación de un método cromatográfico y determinación de sulfatos en productos de corrosión atmosférica del zinc expuesto en ambientes de SO₂ y NO₂, *Rev. Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquía*, 33: 84-96.
23. Nicholson, K., 1993, *Geothermal fluids: Chemistry and exploration techniques*, Springer-Verlag, Germany, 263 pp.

24. NMX-AA-116-SCFI-2001, Abril 2001, Análisis de agua. Guía de solicitud para la presentación de métodos alternos. Secretaría de Economía DGN, México, 20 pp.
25. Prol-Ledesma, R.M., Canet, C., Melgarejo, J.C, Tolson, G., Rubio-Ramos, M.A., Cruz-Ocampo, J.C., Ortega-Osorio, A. Torres-Vera, M.A., Reyes, A., 2002, Cinnabar deposition in submarine coastal hidrothermal vents. Pacific Margin of Central México, Economic Geology, 97: 1331-1340.
26. Prol-Ledesma, R.M., Canet, C., Torres-Vera, M.A., Forrest, M.J, Armienta, M.A., 2004, Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hidrothermal system, Baja California Sur, México, J. Volcanology and Geothermal Research, 137: 311-328.
27. Quattrocchi, O.A., De Andrizzi, S.A., Laba, R.F., 1992, Introducción a la HPLC. Aplicaciones y práctica, Argentina, 407 pp.
28. Quijano León, J. L., Manual de Geotermia, Asociación Geotérmica Mexicana, 2007, <http://www.geotermia.org.mx/geotermia/?p=223> [consulta: 28 de Julio del 2010]
29. Razpothnik, P., Turšič, J., Veber, M., Novič, M., 2003, Efficiency and characteristics of solid-phase (ion exchange) extraction for removal of Cl⁻ matrix, J. Chromatography A, 991: 23-29.
30. Ramis Ramos, G., García Álvares-Coque, M.C., 2006, Quimiometría, España, Síntesis, 238 pp.
31. Rodríguez Díaz, Augusto Antonio, 2009, Metalogenia del área mineralizada en manganeso de Bahía Concepción, Baja California Sur. Tesis (Maestría en Ciencias de la Tierra), D. F., México, UNAM, Instituto de Geofísica, 208 pp.
32. Rouessac, F., Rouessac, A., 2003, Análisis químico. Métodos y técnicas instrumentales modernas. Teoría y ejercicios, España, McGraw-Hill/Interamericana, 441 pp.
33. Rubinson, K.A., Rubinson, J.F., 2000, Análisis Instrumental, Trad. Luis Larrauri Ros, España, Prentice Hall, 847 pp.
34. Servicio Meteorológico Nacional <http://smn.cna.gob.mx/> [consulta: 04 de Abril del 2011]

35. Skinner, B.J., 1979, The Many Origins of Hydrothermal Mineral Deposits, Geochemistry Hydrothermal Ore Deposits. Barnes H.L., A Wiley-Interscience Publication, 798 pp.
36. Villanueva Estrada, Ruth Esther, 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 (Doctorado en Ciencias de la Tierra), D.F., México, UNAM, Instituto de Geofísica, 123 pp.
37. Villanueva, R.E., Prol-Ledesma, R.M., Torres-Vera, M.A., Canet, C., Armienta, M.A., de Ronde, C.E.J., 2006, Comparative study of sampling methods and in situ and laboratory analysis for shallow-water submarine hydrothermal systems, J. of Geochemical Exploration, 89: 414 - 419.

ANEXOS.

ANEXO 1. GLOSARIO.

Adecuación del sistema: Verificación de que el sistema opera con base a criterios preestablecidos que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Agua natural: Se define como agua natural el agua cruda, subterránea, de lluvia, de tormenta, residual y superficial.

Agua hidrotermal: Agua caliente que circula por la corteza.

Agua salobre: Agua con mayor salinidad que el agua dulce, pero menor que el agua de mar

Analito: Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

Blanco: Agua reactivo o matriz equivalente a la que no se le aplica ninguna parte del procedimiento analítico y sirve para evaluar la señal de fondo.

Calibración: Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada y los valores correspondientes de la magnitud, realizados por los patrones, efectuando una corrección del instrumento de medición para llevarlo a las condiciones iniciales de funcionamiento.

Descarga: Acción de verter, infiltrar, depositar o inyectar aguas a un cuerpo receptor en forma continua, intermitente o fortuita.

Disolución estándar: Disolución de concentración conocida preparada a partir de un patrón primario.

Disolución madre: Corresponde a la disolución de máxima concentración en un análisis. A partir de esta disolución se preparan las disoluciones de trabajo.

Exactitud: Proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mensurando.

Fluido hidrotermal: Agua caliente y/o gas que circula por la corteza.

Incertidumbre de medición: Parámetro asociado con el resultado de esa medición, que caracteriza la dispersión de los valores que se podrían atribuir razonablemente al mensurando.

Incertidumbre estándar: Incertidumbre del resultado de una medición expresado como una desviación estándar.

Incertidumbre tipo A: Incertidumbre proveniente del análisis estadístico de una serie de observaciones.

Incertidumbre tipo B: Incertidumbre proveniente de medios distintos al análisis estadístico de una serie de observaciones.

Incertidumbre estándar combinada: Incertidumbre estándar del resultado de una medición cuando el resultado se obtiene de los valores de otras cantidades, y es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos, los cuales son las varianzas o covarianzas de estas otras cantidades ponderadas de acuerdo a cómo el resultado de la medición varía con cambios en estas cantidades.

Incertidumbre expandida: Cantidad que define un intervalo alrededor del resultado de una medición, y que se espera abarque una fracción grande de la distribución de valores que se podrían atribuir razonablemente al mensurando.

Intervalo: Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito, para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

Límite de cuantificación: Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de detección: Concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Linealidad: Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Mensurando: Magnitud particular sujeta a medición.

Método analítico: Descripción de la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Parámetro de calidad: Variable que se utiliza como referencia para determinar la calidad de agua.

Parámetro de desempeño: Parámetro a estudiar en un protocolo de validación.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento analítico se aplica repetidamente a diferentes alícuotas o porciones de una muestra homogénea.

Precisión intermedia: Concordancia relativa entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio por diferentes analistas, en distintos días.

Recobro: Cantidad del analito determinada en la muestra adicionada o solución estándar adicionada, empleando el método analítico.

Repetibilidad: Grado de concordancia obtenido entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones operativas (analista, tiempo, equipo, etc.)

Robustez: Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros normales de operación del método.

Sistema hidrotermal: Conjunto de descargas de fluido gasohidrotermal (gas y/o agua) que se manifiestan superficialmente en la zona costera de las playas o en el fondo del mar.

Trazabilidad: Propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por la cual pueda ser relacionado a referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas las incertidumbres determinadas.

Validación del método analítico: Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

ANEXO 2. CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE.

La incertidumbre tipo B considera todas las fuentes de incertidumbre que puedan ser significativas, por lo tanto, se debe obtener la contribución individual de cada una de ellas, considerando el número de mediciones. La fórmula para el cálculo de la incertidumbre combinada es:

$$U_c = \sqrt{(U_i)^2 + (U_i)^2} \quad (1)$$

Donde U_c es la incertidumbre del mensurando y U_i es la incertidumbre individual por variable que afecte la medición del mensurando. El valor calculado es el que se deberá utilizar para el parámetro considerado.

La incertidumbre combinada total se calcula evaluando el efecto combinado de todas las fuentes de incertidumbre, utilizando el método de propagación de incertidumbres. Si la expresión matemática de y es

$$y = p \pm q \pm r \pm \dots$$

la fórmula para calcular la incertidumbre de y es

$$U_c(y) = \sqrt{U(p)^2 + U(q)^2 + U(r)^2 + \dots} \quad (2)$$

Con la ecuación 2 se calcula la incertidumbre absoluta.

Pero si la expresión matemática de y es

$$y = \frac{p \cdot q \cdot r \cdot \dots}{m \cdot n \cdot \dots}$$

la fórmula para calcular la incertidumbre de y es

$$\frac{U_c(y)}{y} = \sqrt{\left(\frac{U(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{U(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad (3)$$

Donde $U_c(y)$ es la incertidumbre asociada a la medida y , en tanto que $U(p)$ y $U(q)$ son las asociadas a las diferentes mediciones de (p) y (q) requeridas para llegar al cálculo de y . La ecuación 3 nos permite conocer la incertidumbre relativa

Por tanto, la relación entre la incertidumbre combinada del valor y y la incertidumbre de parámetros independientes p, q, \dots, z de los cuales depende ésta es:

$$U_c(y(p, q \dots z)) = y * \sqrt{\left(\frac{U(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{U(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad (4)$$

Para calcular la incertidumbre debida a la regresión lineal se utiliza la ecuación 5, en donde b_1 es la pendiente de la curva de calibración, n el numero de datos de la calibración X_i es el i -ésimo valor del calibrante, x_{pred} el valor obtenida con la curva de calibración, x_{med} la media de los n valores x_1, x_2, \dots de los calibrantes, S la desviación estándar de los residuales, p el numero de replicas de la muestra y $var(x_{pred})$ es la varianza del valor obtenido con la curva de calibración.

$$var(x_{pred}) = \frac{S^2}{b_1^2} \left(\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \left(\frac{(x_{pred} - x_{med})^2}{\frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}{n}} \right) \right) \quad (5)$$

La incertidumbre tipo A se calcula con el número de repeticiones efectuadas y con la desviación estándar de las mismas, utilizando la formula que se indica a continuación:

$$U_A = y * \sqrt{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad (6)$$

En donde n es el numero de determinaciones efectuadas y “ s ” la desviación estándar.

Esta incertidumbre también deberá ser introducida en la ecuación 4 dado que la repetibilidad es también un componente de la incertidumbre combinada total.

$$U_c(y(p, q \dots z) + rep) = y * \sqrt{\left(\frac{U(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{U(q)}{q}\right)^2 + \dots + \left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad (7)$$

Finalmente se multiplica la incertidumbre combinada por un factor K según el nivel de confianza con el que se pretenda presentar el resultado, con lo cual se obtiene la incertidumbre expandida.

$$\text{Resultado} = y \pm K * U_c(y(p, q \dots z) + U_A) \quad (8)$$

Generalmente el valor para el factor K (factor de cobertura) es de 2 para un 95% de confianza.

A continuación se muestra un ejemplo del cálculo de incertidumbre de sulfuros para la muestra Los sueños 1.

Debido a que la concentración de cloruros presenta una relación de tipo lineal con la señal generada por el equipo. La ecuación que representa este fenómeno es

$$y = mx + b$$

Por lo tanto, la expresión matemática para el cálculo de la concentración de iones cloruro es:

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

Donde x es la concentración, y es el área bajo la curva, b es la ordenada al origen y m es la pendiente.

La muestra de Los Sueños 1 fue procesada mediante una dilución (300 µL de la muestra aforado a 10.0 mL con agua desionizada) para la cuantificación de cloruros utilizando un matraz y micropipeta para la dilución. Con base en el diagrama de Ishikawa (capítulo III, fig. 13 de esta tesis) y a la expresión matemática del cálculo de concentración, la incertidumbre tipo B se calcula de la siguiente manera

$$U_B(y) = y * \sqrt{\left(\frac{U(\text{regresión})}{\text{Concentración}}\right)^2 + \left(\frac{U(\text{micropipeta})}{\text{vol. empleado}}\right)^2 + \left(\frac{U(\text{matraz})}{\text{vol. de aforo}}\right)^2} \quad (9)$$

La incertidumbre tipo A se calcula con el número de repeticiones efectuadas de la muestra y con la desviación estándar de las mismas.

$$U_A = y * \sqrt{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad (10)$$

Para calcular la incertidumbre combinada total se unen la incertidumbre tipo A y B en una sola expresión matemática.

$$U_c(y) = y * \sqrt{\left(\frac{U(\text{regresión})}{\text{Concentración}}\right)^2 + \left(\frac{U(\text{micropipeta})}{\text{vol. empleado}}\right)^2 + \left(\frac{U(\text{matraz})}{\text{vol. de aforo}}\right)^2 + \left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2} \quad (11)$$

Donde $U_{(\text{regresión})}$ la incertidumbre de la regresión lineal, $U_{(\text{micropipeta})}$ es la incertidumbre obtenida de los resultados de calibración de la micropipeta, $U_{(\text{matraz})}$ es la incertidumbre obtenida de los resultados de calibración del matraz, y es la concentración del ion en la muestra tratada, s es la desviación estándar y n el número de repeticiones de la muestra.

Sustituyendo los valores de cada una de las variables obtenemos la siguiente expresión:

$$U_c(y) = y * \sqrt{\left(\frac{2.07 \cdot 10^{-7} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}}{11.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}}\right)^2 + \left(\frac{2.77 \cdot 10^{-3} \text{ mL}}{0.300 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{2.35 \cdot 10^{-3} \text{ mL}}{10.0 \text{ mL}}\right)^2 + \left(\frac{0.032}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad (12)$$

$$U_c(y) = y * \sqrt{1.83 \cdot 10^{-8} + 6.13 \cdot 10^{-5} + 7.6 \cdot 10^{-8} + 5.26 \cdot 10^{-4}} \quad (13)$$

$$U_c(y) = y * 0.024 \quad (14)$$

En donde y es igual a la concentración de sulfatos para la muestra Los Sueños 1 (11.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). El resultado se multiplica por el factor de cobertura 2 para un 95% de confianza, obteniendo como resultado.

$$U_c(y) = \pm 0.54$$

ANEXO 3. FORMULAS EMPLEADAS EN LA ADECUACIÓN Y VALIDACIÓN DEL SISTEMA Y MÉTODO ANALITICO.

1) Adecuación del sistema.

PARÁMETRO	FÓRMULA
Media aritmética	$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$
Desviación Estándar	$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$
Coefficiente de Variación	$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$
Platos Teóricos	$N = 16 \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2$
Resolución	$R_s = \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{1/2 (W_{b1} + W_{b2})}$
Factor de Coleo.	$A_{s5\%} = \frac{\beta}{x}$
Factor de Capacidad.	$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$
Selectividad	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$

2) Precisión (repetibilidad, intermedia y del sistema).

PARÁMETRO	FÓRMULA
Media Aritmética	$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$
Desviación Estándar	$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$
Coefficiente de Variación	$CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$

3) Exactitud.

PARÁMETRO	FÓRMULA
% de Recobro	$\% R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} * 100$

4) Robustez.

PARÁMETRO	FÓRMULA	OBSERVACIÓN
Media Aritmética	$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$	\bar{y} = concentración media a condiciones normales
Diferencia Absoluta	$ d_i = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $	\bar{y}_i = concentración media a condición variable \bar{y}_0 = concentración media a condiciones normales

5) Linealidad (sistema y método).

PARÁMETRO	FÓRMULA
Pendiente	$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Ordenada al Origen	$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$
Coefficiente de Determinación	$r^2 = \frac{(n \sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$
Intervalo de Confianza para la Pendiente	$IC(m) = m \pm t_{0.975, n-1} S_{b1}$
	$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$
Intervalo de Confianza para la Ordenada al Origen	$IC(b) = b \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$
Coefficiente de Variación de Regresión.	$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$
	$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100$
	$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$

6) Limite de detección.

PARÁMETRO	FÓRMULA
Pendiente	$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Ordenada al Origen	$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$
Coefficiente de Determinación	$r^2 = \frac{(n \sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$
Intervalo de Confianza para la Pendiente	$IC(m) = m \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$
	$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$
Desviación Estándar	$S_{blanco} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$
Limite de Detección	$LOD1 = \frac{3.3 * S_m}{m}$
	$LOD = \frac{3.3 * S_{blanco}}{m}$

El límite de detección se estima por 4 procedimientos, en los cuales, las formulas de la tabla anterior se tienen que utilizar con los valores adecuados, según la base del cálculo, la cual puede ser la señal de ruido, curva de calibración y desviación estándar de los blancos.

7) Limite de cuantificación.

PARÁMETRO	FÓRMULA
Pendiente	$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Ordenada al Origen	$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$
Coficiente de Determinación	$r^2 = \frac{(n \sum xy - (\sum x)(\sum y))^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$ $IC(m) = m \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$
Intervalo de Confianza para la Pendiente	$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$
Desviación Estándar	$S_{blanco} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$
Limite de Cuantificación	$LOQ1 = \frac{10 * S_m}{m}$ $LOQ2 = \frac{10 * S_{blanco}}{m}$

El límite de cuantificación se estima por 4 procedimientos, en los cuales, las formulas de la tabla anterior se tienen que utilizar con los valores adecuados, según la base del cálculo, la cual puede ser la señal de ruido, curva de calibración y desviación estándar de los blancos.

ANEXO 4. TABLA DE CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA VALIDACION DEL SISTEMA Y MÉTODO ANALÍTICO.

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	OBSERVACIÓN
Asimetría	$A \leq 2.00$	
Resolución	$R > 1.50$	
Platos Teóricos	Mayor numero de platos teóricos	
Factor de Capacidad	$k' > 1.00$	
Selectividad	$\alpha \geq 1$	
Precisión	$CV \leq 11.3\%$	Para fluoruro, nitrito y nitrato
(sistema, método y repetibilidad)	$CV \leq 8.0\%$	Para bromuro y sulfato
	$CV < 2.2\%$	Para cloruro
	$r^2 \geq 0.9800$	
Linealidad del sistema y método	IC(m) no debe incluir el cero IC(b) incluye el cero	
Selectividad	Respuesta del método debida únicamente al analito.	
Límite de detección	$r^2 \geq 0.9800$	Debe ser menor a la concentración mínima de la curva de calibración para cada analito.
	IC(m) no debe incluir el cero	
Límite de cuantificación	$r^2 \geq 0.9800$	Debe ser menor a la concentración mínima de la curva de calibración para cada analito.
	IC(m) no debe incluir el cero	
Robustez	$ d_i \leq 5.0\%$ de la concentración normal	
Exactitud	$94.0\% \leq \% \text{recobro analito} \leq 106.0\%$	

ANEXO 5. APLICACIÓN DE UN ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA.

Las manifestaciones hidrotermales se pueden caracterizar grosso modo mediante la concentración de aniones mayores, pH, conductividad, temperatura, sólidos totales disueltos y salinidad y poder establecer diferencias significativas entre manifestaciones hidrotermales. Las hipótesis planteadas son:

$$H_0: \mu_{s1} = \mu_{s2} = \mu_{s3} = \mu_{s4} = \mu_{s5} = \mu_{s6} = \mu_{s7} = \mu_{s8} = \mu_{s9} = \mu_{\text{posada}}$$

$$H_a: \mu_{s1} \neq \mu_{s2} \neq \mu_{s3} \neq \mu_{s4} \neq \mu_{s5} \neq \mu_{s6} \neq \mu_{s7} \neq \mu_{s8} \neq \mu_{s9} \neq \mu_{\text{posada}}$$

en donde la hipótesis nula (H_0) establece que las manifestaciones hidrotermales de Bahía Concepción son iguales en un 95% de confianza y la hipótesis alterna (H_a) establece lo contrario a lo que establece la hipótesis nula.

Los tratamientos son cada uno de las manifestaciones hidrotermales y las variables dependientes de aniones mayoritarios, pH, conductividad, temperatura, sólidos totales disueltos y salinidad fueron utilizadas para describir cada tratamiento y poder establecer diferencias significativas entre las manifestaciones hidrotermales.

Los resultados de la aplicación del modelo de ANOVA empleando una prueba F de Fisher se muestran a continuación:

Tabla 1. Resultados de la aplicación del estadígrafo F de Fisher utilizando las 10 manifestaciones hidrotermales costeras de Bahía Concepción como tratamientos.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Cuadrado medio (CM)	F calculada	α	F teórica	Criterio	Decisión
Entre tratamientos	15890737.8	9	1765637.54	0.088	0.05	1.986	Sí $F_c < F_t$	Ho se acepta
Dentro de tratamientos	1803538717	90	20039319.1				Sí $F_c > F_t$	Ho se rechaza

α = Nivel de confianza al 95%

Se puede ver que F calculada es menor a F teórica, por lo tanto se acepta H_0 y se puede concluir que las diez manifestaciones son significativamente iguales al 95% de

confianza con base a la composición de aniones mayoritarios, pH, conductividad, salinidad, sólidos totales disueltos y temperatura de descarga.

Para realizar conocer si hay diferencias estadísticamente significativas entre los diversos tipos de agua provenientes de Bahía Concepción (agua de mar, agua dulce y agua hidrotermal) se plantean las siguientes hipótesis:

$$H_0: \mu_{s1} = \mu_{s2} = \mu_{s3} = \mu_{s4} = \mu_{s5} = \mu_{s6} = \mu_{s7} = \mu_{s8} = \mu_{s9} = \mu_{\text{posada}} = \mu_{\text{LT}} = \mu_{\text{M}} = \mu_{\text{SI}} = \mu_{\text{AM}}$$

$$H_a: \mu_{s1} \neq \mu_{s2} \neq \mu_{s3} \neq \mu_{s4} \neq \mu_{s5} \neq \mu_{s6} \neq \mu_{s7} \neq \mu_{s8} \neq \mu_{s9} \neq \mu_{\text{posada}} \neq \mu_{\text{LT}} \neq \mu_{\text{M}} \neq \mu_{\text{SI}} \neq \mu_{\text{AM}}$$

en donde la hipótesis nula (H_0) establece que las manifestaciones hidrotermales, el agua de mar y el agua dulce proveniente de Bahía Concepción son iguales en un 95% de confianza y la hipótesis alterna (H_a) establece lo contrario a lo que establece la hipótesis nula.

Los resultados de la aplicación del modelo de ANOVA empleando una prueba F de Fisher se muestran a continuación:

Tabla 2. Resultados de la aplicación del estadígrafo F de Fisher utilizando las 14 muestras provenientes de Bahía Concepción como tratamientos. Comparación de diversos tipos de aguas: agua de mar, agua dulce y agua hidrotermal.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Cuadrado medio (CM)	F calculada	α	F teórica	Criterio	Decisión
Entre tratamientos	-6238311.9	9	-693145.7				Sí $F_c < F_t$	Ho se acepta
Dentro de tratamientos	2276046617	130	17508050.9	-0.039	0.05	1.96	Sí $F_c > F_t$	Ho se rechaza

α = Nivel de confianza al 95%

Se puede ver que F calculada es menor a F teórica, por lo tanto se acepta H_0 y se puede concluir que las catorce muestras son significativamente iguales al 95% de confianza con base a la composición de aniones mayoritarios, pH, conductividad, salinidad, sólidos totales disueltos y temperatura de descarga.

Para realizar conocer si hay diferencias estadísticamente significativas entre los diversos tipos de agua provenientes de Punta de Mita (agua de mar y agua hidrotermal) se plantean las siguientes hipótesis:

$$H_0: \mu_{\text{control}} = \mu_{\text{superficie}} = \mu_{5 \text{ m profundidad}} = \mu_{\text{ventila}}$$

$$H_a: \mu_{\text{control}} \neq \mu_{\text{superficie}} \neq \mu_{5 \text{ m profundidad}} \neq \mu_{\text{ventila}}$$

en donde la hipótesis nula (H_0) establece que las manifestaciones hidrotermales de Bahía Concepción son iguales en un 95% de confianza y la hipótesis alterna (H_a) establece lo contrario a lo que establece la hipótesis nula.

Los resultados de la aplicación del modelo de ANOVA empleando una prueba F de Fisher se muestran a continuación:

Tabla 3. Resultados de la aplicación del estadígrafo F de Fisher utilizando las 4 muestras provenientes de Punta de Mita como tratamientos. Comparación de agua de mar y agua hidrotermal.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (gl)	Cuadrado medio (CM)	F calculada	α	F teórica	Criterio	Decisión
Entre tratamientos	414629266	4	103657316	1.541	0.05	5.86	Sí $F_c < F_t$	Ho se acepta
Dentro de tratamientos	1008868530	15	67257902				Sí $F_c > F_t$	Ho se rechaza

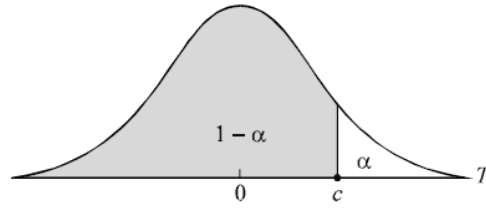
α = Nivel de confianza al 95%

Se puede ver que F calculada es menor a F teórica, por lo tanto se acepta H_0 y se puede concluir que las cuatro muestras provenientes de Punta de Mita son significativamente iguales al 95% de confianza con base a la composición de aniones mayoritarios, pH, conductividad, salinidad, sólidos totales disueltos y temperatura de descarga.

ANEXO 6. FACTORES PARA CALCULAR EL VOLUMEN CALIBRADO EN PIPETA Y MATRAZ A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Temperatura T (° C)	Densidad del agua (g/ cm)	Volumen de 1 g de agua (cm ³) a la temperatura indicada	Corregido a 20°C
10	0.99997026	1.001 4	1.001 5
11	0.99996084	1.001 5	1.001 6
12	0.9995004	1.001 6	1.001 7
13	0.9993801	1.001 7	1.001 8
14	0.999247 4	1.001 8	1.001 9
15	0.999102 6	1.002 0	1.002 0
16	0.998946 0	1.002 1	1.002 1
17	0.998777 9	1.002 3	1.002 3
18	0.998598 6	1.002 5	1.002 5
19	0.998408 2	1.002 7	1.002 7
20	0.998207 1	1.002 9	1.002 9
21	0.997995 5	1.003 1	1.003 1
22	0.997773 5	1.003 3	1.003 3
23	0.997541 5	1.003 5	1.003 5
24	0.997299 5	1.003 8	1.003 8
25	0.997047 9	1.004 0	1.004 0
26	0.99799678	1.004 3	1.004 2
27	0.997516 2	1.004 6	1.004 5
28	0.997236 5	1.004 8	1.004 7
29	0.995947 8	1.005 1	1.005 0
30	0.995650 2	1.005 4	1.005 3

ANEXO 7. TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT.



$1 - \alpha$

n	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

ANEXO 8. TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN F DE FISHER.

1 - $\alpha = 0.95$

1 - $\alpha = P (F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$

$v_2 \backslash v_1$	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	40	50	60	70	80	90	100	200	500	1000
1	248.307	248.579	248.823	249.052	249.260	249.453	249.631	249.798	249.951	250.096	251.144	251.774	252.196	252.498	252.723	252.898	253.043	253.676	254.062	254.186
2	19.448	19.450	19.452	19.454	19.456	19.457	19.459	19.460	19.461	19.463	19.471	19.476	19.479	19.481	19.483	19.485	19.486	19.491	19.494	19.495
3	8.654	8.648	8.643	8.638	8.634	8.630	8.626	8.623	8.620	8.617	8.594	8.581	8.572	8.566	8.561	8.557	8.554	8.540	8.532	8.529
4	5.795	5.787	5.781	5.774	5.769	5.763	5.759	5.754	5.750	5.746	5.717	5.699	5.688	5.679	5.673	5.668	5.664	5.646	5.635	5.632
5	4.549	4.541	4.534	4.527	4.521	4.515	4.510	4.505	4.500	4.496	4.464	4.444	4.431	4.422	4.415	4.409	4.405	4.385	4.373	4.369
6	3.865	3.856	3.849	3.841	3.835	3.829	3.823	3.818	3.813	3.808	3.774	3.754	3.740	3.730	3.722	3.716	3.712	3.690	3.678	3.673
7	3.435	3.426	3.418	3.410	3.404	3.397	3.391	3.386	3.381	3.376	3.340	3.319	3.304	3.294	3.286	3.280	3.275	3.252	3.239	3.234
8	3.140	3.131	3.123	3.115	3.108	3.102	3.095	3.090	3.084	3.079	3.043	3.020	3.005	2.994	2.986	2.980	2.975	2.951	2.937	2.932
9	2.926	2.917	2.908	2.900	2.893	2.886	2.880	2.874	2.869	2.864	2.826	2.803	2.787	2.776	2.768	2.761	2.756	2.731	2.717	2.712
10	2.764	2.754	2.745	2.737	2.730	2.723	2.716	2.710	2.705	2.700	2.661	2.637	2.621	2.609	2.601	2.594	2.588	2.563	2.548	2.543
11	2.636	2.626	2.617	2.609	2.601	2.594	2.588	2.582	2.576	2.570	2.531	2.507	2.490	2.478	2.469	2.462	2.457	2.431	2.415	2.410
12	2.533	2.523	2.514	2.505	2.498	2.491	2.484	2.478	2.472	2.466	2.426	2.401	2.384	2.372	2.363	2.356	2.350	2.323	2.307	2.302
13	2.448	2.438	2.429	2.420	2.412	2.405	2.398	2.392	2.386	2.380	2.339	2.314	2.297	2.284	2.275	2.267	2.261	2.234	2.218	2.212
14	2.377	2.367	2.357	2.349	2.341	2.333	2.326	2.320	2.314	2.308	2.266	2.241	2.223	2.210	2.201	2.193	2.187	2.159	2.142	2.136
15	2.316	2.306	2.297	2.288	2.280	2.272	2.265	2.259	2.253	2.247	2.204	2.178	2.160	2.147	2.137	2.130	2.123	2.095	2.078	2.072
16	2.264	2.254	2.244	2.235	2.227	2.220	2.212	2.206	2.200	2.194	2.151	2.124	2.106	2.093	2.083	2.075	2.068	2.039	2.022	2.016
17	2.219	2.208	2.199	2.190	2.181	2.174	2.167	2.160	2.154	2.148	2.104	2.077	2.058	2.045	2.035	2.027	2.020	1.991	1.973	1.967
18	2.179	2.168	2.159	2.150	2.141	2.134	2.126	2.119	2.113	2.107	2.063	2.035	2.017	2.003	1.993	1.985	1.978	1.948	1.929	1.923
19	2.144	2.133	2.123	2.114	2.106	2.098	2.090	2.084	2.077	2.071	2.026	1.999	1.980	1.966	1.955	1.947	1.940	1.910	1.891	1.884
20	2.112	2.102	2.092	2.082	2.074	2.066	2.059	2.052	2.045	2.039	1.994	1.966	1.946	1.932	1.922	1.913	1.907	1.875	1.856	1.850
21	2.084	2.073	2.063	2.054	2.045	2.037	2.030	2.023	2.016	2.010	1.965	1.936	1.916	1.902	1.891	1.883	1.876	1.845	1.825	1.818
22	2.059	2.048	2.038	2.028	2.020	2.012	2.004	1.997	1.990	1.984	1.938	1.909	1.889	1.875	1.864	1.856	1.849	1.817	1.797	1.790
23	2.036	2.025	2.014	2.005	1.996	1.988	1.981	1.973	1.967	1.961	1.914	1.885	1.865	1.850	1.839	1.830	1.823	1.791	1.771	1.764
24	2.015	2.003	1.993	1.984	1.975	1.967	1.959	1.952	1.945	1.939	1.892	1.863	1.842	1.828	1.816	1.808	1.800	1.768	1.747	1.740
25	1.995	1.984	1.974	1.964	1.955	1.947	1.939	1.932	1.926	1.919	1.872	1.842	1.822	1.807	1.796	1.787	1.779	1.746	1.725	1.718
26	1.978	1.966	1.956	1.946	1.938	1.929	1.921	1.914	1.907	1.901	1.853	1.823	1.803	1.788	1.776	1.767	1.760	1.726	1.705	1.698
27	1.961	1.950	1.940	1.930	1.921	1.913	1.905	1.898	1.891	1.884	1.836	1.806	1.785	1.770	1.758	1.749	1.742	1.708	1.686	1.679
28	1.946	1.935	1.924	1.915	1.906	1.897	1.889	1.882	1.875	1.869	1.820	1.790	1.769	1.754	1.742	1.733	1.725	1.691	1.669	1.662
29	1.932	1.921	1.910	1.901	1.891	1.883	1.875	1.868	1.861	1.854	1.806	1.775	1.754	1.738	1.726	1.717	1.710	1.675	1.653	1.645
30	1.919	1.908	1.897	1.887	1.878	1.870	1.862	1.854	1.847	1.841	1.792	1.761	1.740	1.724	1.712	1.703	1.695	1.660	1.637	1.630
40	1.826	1.814	1.803	1.793	1.783	1.775	1.766	1.759	1.751	1.744	1.693	1.660	1.637	1.621	1.608	1.597	1.589	1.551	1.526	1.517
50	1.771	1.759	1.748	1.737	1.727	1.718	1.710	1.702	1.694	1.687	1.634	1.599	1.576	1.558	1.544	1.534	1.525	1.484	1.457	1.448
60	1.735	1.722	1.711	1.700	1.690	1.681	1.672	1.664	1.656	1.649	1.594	1.559	1.534	1.516	1.502	1.491	1.481	1.438	1.409	1.399
70	1.709	1.696	1.685	1.674	1.664	1.654	1.646	1.637	1.629	1.622	1.566	1.530	1.505	1.486	1.471	1.459	1.450	1.404	1.374	1.364
80	1.689	1.677	1.665	1.654	1.644	1.634	1.626	1.617	1.609	1.602	1.545	1.508	1.482	1.463	1.448	1.436	1.426	1.379	1.347	1.336
90	1.675	1.662	1.650	1.639	1.629	1.619	1.610	1.601	1.593	1.586	1.528	1.491	1.465	1.445	1.429	1.417	1.407	1.358	1.326	1.314
100	1.663	1.650	1.638	1.627	1.616	1.607	1.598	1.589	1.581	1.573	1.515	1.477	1.450	1.430	1.415	1.402	1.392	1.342	1.308	1.296
200	1.609	1.596	1.583	1.572	1.561	1.551	1.542	1.533	1.524	1.516	1.455	1.415	1.386	1.364	1.346	1.332	1.321	1.263	1.221	1.205
500	1.577	1.563	1.551	1.539	1.528	1.518	1.508	1.499	1.490	1.482	1.419	1.376	1.345	1.322	1.303	1.288	1.275	1.210	1.159	1.138
1000	1.566	1.553	1.540	1.528	1.517	1.507	1.497	1.488	1.479	1.471	1.406	1.363	1.332	1.308	1.289	1.273	1.260	1.190	1.134	1.110