



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ANIONES
MAYORITARIOS POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA DE
IONES CON DETECCIÓN CONDUCTIMÉTRICA EN
MUESTRAS AMBIENTALES.”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

ILSE ITZEL RAMÍREZ BARBOSA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2018





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: GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI**

VOCAL: **Profesor: OLIVIA ZAMORA MARTÍNEZ**

SECRETARIO: **Profesor: CAROLINA FLORES ÁVILA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: SILVIA CITLALLI GAMA GONZÁLEZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: JOAQUÍN PREZA DE LA VEGA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Ciencias Ambientales y del Suelo del Instituto de Geología y Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía-LANGEM de la UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Olivia Zamora Martínez

SUSTENTANTE (S):

Ilse Itzel Ramírez Barbosa

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al laboratorio de Cromatografía del Departamento de Ciencias Ambientales y del Suelo del Instituto de Geología y al Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía-LANGEM de la UNAM, por el uso de sus instalaciones, equipos y materiales.

A la Ing, Caridad Hernández por el apoyo en el mantenimiento y la revisión del sistema eléctrico del laboratorio.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El camino ha sido largo, ahora puedo reconocer que todas las innumerables desveladas han valido la pena, quisiera agradecer con todo mi corazón a todas aquellas personas que han contribuido a que este logro sea posible.

Primero, a mis padres que con todo el corazón han podido implantar en mi el coraje de poder estudiar una carrera. Quisiera agradecerles que tuvieran esa esperanza de que yo pudiera ser una mujer de bien. A mi madre, quisiera agradecerle que cuidara de mi a través de todos las desmañanadas que se daba al prepararme comida para llevar, de poder ayudarme con mi ropa cuando yo no podía, de preocuparse por mi cuando no llegaba a tiempo a casa por culpa del tránsito, gracias por decirme unas palabras cuando yo sentía que ya no podía, gracias por alentarme. Aunque no lo creas causaste un efecto positivo en mí, no sabes como te admiro por la gran mujer que eres, te amo tanto mamá que no se como pagarte lo buen madre que has sido, dios te bendiga por siempre, espero algún día ser un poco de lo grande que tu eres.

A ti papá, gracias por todo ese tiempo invertido en las charlas que me diste desde que llegue a la adolescencia, gracias por salir cada día de casa e ir a trabajar para proveernos alimentos y un hogar. Gracias por haber invertido en mi educación, por todas las facilidades que me brindaste, y por preocuparte por mí desde que entre al C.C.H. Esas desmañanadas para ir a dejarme a salvo al metro o a la avenida. Recuerdo que una de las tantas charlas que tuvimos fue aquella de que en la vida siempre tenía que tener un equilibrio, no todo debe ser estudios o trabajo, tenemos que tener un balance con la vida social y el amor. Gracias por dedicarme tiempo para poder crecer. A ti te admiro por el gran hombre que eres, por enseñarme que siempre hay que ser humilde, que no sirve de nada una persona estudiada si no es humilde. Te amo tanto papá y de igual manera no se como pagarte todo lo que me has brindado, dios te bendiga por siempre y también espero poder ser un poco de lo grande que tu eres. Para mi fueron, son y serán los mejores padres del mundo. Siempre seré tu caramelito.

A mis hermanos, los marmotas. Los quiero mucho hermanos, gracias por de hacer mi estancia en la casa la más agradable posible, gracias por apoyarme en todas mis decisiones y por estar ahí cuando más los he necesitado, tengo recuerdos que jamás podré borrar y quisiera hacer válido ese pacto que hicimos un día cuando eramos pequeños, de no enojarnos y dejarnos de hablar. Ahora que somos adultos sólo me queda decirles, siempre contarán conmigo, los amo.

A mi ahora esposo, gracias por todo lo que hemos pasado, gracias por esperar todo el tiempo posible para poder hacer nuestra vida. Mejor compañero de vida no pude haber encontrado, gracias por estar para mí en todas las develadas que me dí, gracias por dejarme hacer tarea cuando nos veíamos y sobre todo gracias por respetar mi carrera. Y te adelanto los agradecimientos por todos los retos que quiero cumplir. Por último, gracias por no limitarme y dejarme crecer en lo profesional como en lo sentimental. Tú completas mi equilibrio, ese equilibrio que dijo mi papá que debía tener. Te amo Luis.

A ti Vivi (la moncha), te convertiste en una de mis mejores amigas, gracias por acompañarme en el camino de mi tesis y en mi vida.

A mi tutora, gracias por tener una paciencia enorme y por brindarme mucho conocimiento y oportunidades a lo largo de este camino por terminar mi tesis, se que me demoré mucho por concluir esta etapa y por eso que estoy tan agradecida. De corazón, muchas gracias Doctora Olivia Zamora.

Por último quisiera recordar a todas aquellas personas que ya no están aquí pero que recuerdo con mucho cariño. A mis abuelitos maternos, Eva y Faustino que con su humildad me enseñaron a que no siempre la felicidad esta en lo material. A mi tío Rafa que con todo y su carácter se que me deseaba lo mejor. A mi abuelita Vidala que sin lugar a duda sus palabras nunca las olvidaré, para mi fue un honor hacerla sentir orgullosa por ser la primer mujer estudiada de la familia y estoy segura que si siguiera conmigo estaría aun más orgullosa. Siempre los llevaré conmigo, los amo.

*Dedicado con mucho cariño a mis padres,
hermanos y esposo. Sin ustedes mi
equilibrio no existiría, los amo.*

ABREVIATURAS

Administración de alimentos y medicamentos	FDA
Altura a la mitad del pico	$h_{1/2}$
Altura de un plato teórico	H o AEPT
Ancho a la mitad del pico	$W_{1/2}$
Ancho de pico	W_b
Caudal o flujo	C
Coefficiente de variación	Cv
Coulombs ⁻¹	1/C
Cromatografía de iones	IC o CI
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	CLAR
Desviación estándar	s_i
Desviación relativa	D_R
Dióxido de carbono	CO ₂
Dispersión lineal	σ_L
Factor de capacidad	k'
Fase Estacionaria	FS
Fase Móvil	FM
Grados centígrados	°C
Ion bicarbonato	HCO ₃ ⁻
Ion bromuro	Br ⁻
Ion calcio	Ca ²⁺
Ion cloruro	Cl ⁻
Ion fosfato	PO ₄ ³⁻
Ion magnesio	Mg ²⁺
Ion nitrato	NO ₃ ⁻
Ion potasio	K ⁺
Ion sodio	Na ⁺

Ion sulfato	SO_4^{2-}
Ion yoduro	I^-
Kilopascal	kPa
Límite de cuantificación	LOQ
Límite de detección	LOD
Longitud de columna	L
Microlitros	μL
Microsiemens	μS
Milímetros	mm
Miliohms	$\text{m}\Omega$
Nitrógeno molecular	N_2
Número de platos teóricos o eficiencia teórica	N
Octadecilsilano	ODS o C_{18}
Oxígeno molecular	O_2
Ozono	O_3
Partes por billón	ppb
Partes por millón	ppm
Partes por trillón	ppt
Porcentaje de variabilidad o coeficiente de Variabilidad porcentual	%Cv
Promedio	\bar{x}
Resolución o factor de resolución entre dos picos	R o R_s
Selectividad o factor de separación	α
Tiempo de retención	t_R
Tiempo de retención corregido o tiempo reducido	t_R'
Tiempo muerto	t_0 ó t_M
Varianza	σ^2 ó σ^2_L
Volumen de fase estacionaria	V_s

Volumen de retención
Volumen muerto

V_R
 V_M

Tabla de contenido	pág.
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	18
CAPÍTULO I. OBJETIVOS	20
1.1 Objetivo general	21
1.2 Objetivos particulares.....	21
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	22
2.1 AGUA	23
2.1.1 Generalidades	23
2.1.2 Regulación del agua en la naturaleza: ciclo del agua.....	24
2.1.3 Tipos de agua	25
2.2 Agua residual	28
2.2.1 Características fisicoquímicas del agua dulce.....	28
2.3 Importancia del monitoreo ambiental en el agua	29
2.4 Cromatografía de líquidos.....	30
2.4.1 Generalidades	30
2.4.2 Conceptos teóricos de la cromatografía	32
2.4.3 Parámetros de retención.....	34
2.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución	37
2.5.1 Clasificación de las técnicas de CLAR	38
2.6 Cromatografía de intercambio de iones	42
2.6.1 Fundamento teórico	43
2.6.2 Instrumentación de un sistema cromatográfico iónico	45
2.6.3 Fase móvil	46
2.6.4 Bomba	46
2.6.5 Inyector	47
2.6.6 Fase estacionaria o columna.....	49
2.6.7 Detector.....	50
2.6.8 Detector de conductividad.....	50

2.6.9 Supresor de iones	51
2.6.10 Integrador	51
2.7 Métodos analíticos	51
2.7.1 Definición	51
2.7.2 Recopilación de información	52
2.7.3 Elección del método de análisis.....	52
2.8 Validación de métodos analíticos.....	53
2.8.1 Estabilidad de la muestra	54
2.8.2 Linealidad.....	54
2.8.3 Intervalo lineal	54
2.8.4 Límite de cuantificación	55
2.8.5 Límite de detección	55
2.8.6 Exactitud.....	55
2.8.7 Precisión.....	56
2.8.8 Repetibilidad.....	57
2.8.9 Reproducibilidad	57
2.8.10 Robustez	57
CAPÍTULO III. EXPERIMENTACIÓN	59
3.1 Instrumentación	60
3.1.2 Equipo y materiales.....	60
3.1.3 Reactivos y disolventes	60
3.2 Desarrollo del método cromatográfico	61
3.2.1 Condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de <i>HCO₃⁻, Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻</i>	61
3.2.2 Preparación de la fase móvil	61
3.2.3 Preparación de las disoluciones estándar para las curvas de calibración	62
3.3 Validación del método cromatográfico.....	62
3.3.1 Intervalo lineal y de trabajo	62
3.3.2 Precisión	63

3.3.3 Exactitud	63
3.3.4 Limite de cuantificación	64
3.3.5 Limite de detección	63
3.4 Aplicación del método cromatográfico	64
3.4.1 Recobros.....	64
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1 Desarrollo del método cromatográfico	68
4.1.1 Condiciones cromatográficas	68
4.1.2 Parámetros cromatográficos.....	68
4.2 Validación de la metodología propuesta.....	72
4.2.1 Evaluación del blanco de trabajo	72
4.2.2 Intervalo lineal	73
4.2.3 Limite de detección y de cuantificación	79
4.2.4 Precisión	80
4.2.5 Exactitud	81
4.3 Aplicación del método desarrollado.....	83
4.3.1 Recobros.....	83
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO I	88

Índice de figuras	pág.
Figura 2.1. El ciclo hidrológico. SEMARNAT (2016).....	25
Figura 2.2. Representación de algunos parámetros cromatográficos.	34
Figura 2.3. Valores de resolución entre dos picos cromatográficos	37
Figura 2.4. Esquema ilustrativo de las etapas de intercambio sucesivas en el contacto de una fase estacionaria amonio para aniones, entre un anión A ⁻ y un contraanión E ⁻ de la fase móvil.....	44
Figura 2.5. Esquema de un equipo para cromatografía de líquidos de alta resolución.....	45
Figura 3.1. Localización de los sitios de muestreo de agua residual del canal de riego en Las palmas, LPC (imagen tomada de Guedrón,2014).	64
Figura 4.1. Cromatograma obtenido con las condiciones de trabajo para una concentración de 100 mg/L de cada anión de interés.	69
Figura 4.2. Cromatograma del blanco de trabajo obtenido bajo las condiciones óptimas de trabajo.....	72
Figura 4.3. Cromatogramas de las curvas de calibración. Cada uno de los picos representan los aniones de estudio, donde: a) fluoruro, b) bicarbonato, c) cloruro, d) bromuro, e) nitrato, f) fosfato y g) sulfato.	73
Figura 4.4. Curvas de calibración de los aniones bicarbonato (arriba) y cloruro (abajo).....	75
Figura 4.5. Curvas de calibración de los aniones bromuro (arriba) y nitrato (abajo).....	76
Figura 4.6. Curvas de calibración de los aniones fosfato (arriba) y sulfato (abajo).	77

Índice de Tablas

pág.

Tabla 2.1. Parámetros recomendados a evaluar según el tipo de método de análisis a utilizar	58
Tabla 4.1. Condiciones de trabajo del método propuesto.....	68
Tabla 4.2. Parámetros cromatográficos del método desarrollado.....	70
Tabla 4.3 Resultados del análisis de regresión lineal	75
Tabla 4.4. Valores de LOD y LOQ para los seis analitos de estudio (n=7).....	76
Tabla 4.5. Coeficiente de variabilidad del área de pico para tres niveles de concentración (n=3).....	77
Tabla 4.6. Valores de exactitud determinados con el sistema de análisis para los aniones de estudio.....	79
Tabla 4.7. Valores de concentración determinados como los fortificados de las muestras de agua residual.....	80
Tabla 4.8. Recobros obtenidos para los seis analitos de trabajo en muestras de agua residual.....	82

Índice de ecuaciones

pág.

Ec. 2.1 $H = LN$	32
Ec. 2.2 $\sigma = H \cdot L$	33
Ec. 2.3 $N = L^2/\sigma^2$	33
Ec. 2.4 $N = 16 (t_R^2/\omega^2)$	33
Ec. 2.5 $VR = t_R \cdot C$	35
Ec. 2.6 $VM = t_M \cdot C$	35
Ec. 2.7 $k = t_R - t_{t0}$	35
Ec. 2.8 $\alpha = t_R^{2'}/t_R^{1'}$	36
Ec. 2.9 $R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2}$	36
Ec. 2.10 $A_{FM}^- + [HCO_3]_{FS}^- \rightarrow [HCO_3]_{FM}^- + A_{FS}^-$	44
Ec. 2.11 $[HCO_3]_{FM}^- + A_{FS}^- \rightarrow A_{FM}^- + [HCO_3]_{FS}^-$	44
Ec. 2.12 $\frac{[A^-]_{FS} \cdot [HCO_3^-]_{FM}}{[A^-]_{FM} \cdot [HCO_3^-]_{FS}} = Cte$	44
Ec. 2.13 Límite de cuantificación = $y_B + 10s_B$	55
Ec. 2.14 Límite de detección = $y_B + 3s_B$	55
Ec. 2.15 % error = $[\text{Conc. teórica} - \text{Conc. experimental} / \text{Conc. teórica}] * 100$...	56
Ec. 2.16 $CV = DR = 100s/x$	56
Ec. 2.17 % Recobro = $100 - \left[\frac{\text{Conc. teórica} - \text{Conc. experimental}}{\text{conc. teórica}} \right]$	57

RESUMEN

Frecuentemente el agua residual es utilizada como agua de riego en la agricultura y es esta la forma en la que llega al consumo humano. A estos tipos de muestras ambientales se les considera matrices complejas, ya que, además de contener especies de origen orgánico, pueden presentar contenidos variables de especies inorgánicas, dentro de las cuales, se pueden encontrar diversos aniones, como son: bicarbonato, cloruro, bromuro, nitrato, sulfato y fosfato, los cuales tienen un impacto significativo en la salud humana cuando se encuentran en concentraciones elevadas. Las especificaciones del contenido de aniones en agua potable se presentan en la Norma Oficial Mexicana, NOM-127-SSA1-1994, donde se establecen los límites máximos permisibles de las especies disueltas en el agua potable y, dado que son concentraciones del orden de mg/L, en el presente trabajo se propone una metodología analítica, lo suficientemente sensible y selectiva, para la determinación simultánea de estas especies en muestras de agua residual, utilizando la técnica de cromatografía de intercambio iónico con detección conductimétrica. Con este fin se optimizaron los parámetros cromatográficos de la técnica, desarrollando el método con un sistema cromatográfico constituido de 2 bombas binarias, utilizando como fase móvil una mezcla de 12 % acetonitrilo, 2 % butanol, 2 % de un concentrado gluconato/borato de sodio en medio acuoso, con un flujo de 1 mL/min en modo isocrático. Como fase estacionaria se utilizó una columna analítica IC-Pak Anion HR Waters® con dimensiones de 4.6 x 75 mm empacada con partículas de 5 µm. Bajo estas condiciones se logró la cuantificación simultánea de los 6 aniones en un tiempo de análisis de aproximadamente 15 minutos. Con el objetivo de obtener resultados confiables y de conocer los alcances de la metodología propuesta se realizó su validación, evaluando los parámetros típicos como son: intervalo lineal y de trabajo, límites de detección y de cuantificación, exactitud y precisión, así como robustez.

Los intervalos lineales y de trabajo obtenidos para cada uno de los aniones de estudio, se encuentran entre 1 y 100 mg/L para cloruro y sulfato, entre 5 y 100 mg/L

para bromuro, nitrato y fosfato, mientras que para el bicarbonato este se encuentra entre 50 y 1000 mg/L. Los valores de precisión se realizaron para tres niveles de concentración, para cloruro y sulfato fueron 1, 50 y 70 mg/L, para bromuro, nitrato y fosfato se trabajó con 5, 50 y 70 mg/L, mientras que para el ion bicarbonato fueron 50, 200 y 500 mg/L, los valores de los coeficientes de variabilidad porcentual (%CV) obtenidos para los 6 aniones analizados se encuentran dentro del intervalo establecido en la Guía Eurachem, que establece que deben ser menores al 3%. En cuanto a los valores de exactitud porcentual, estudiada a tres niveles de concentración, se encontró que eran cercanos a 100 % por lo que se considera que el sistema desarrollado también es exacto. Analizando los límites de detección, se tiene que los valores comprenden desde 0.6 mg/L hasta los 15.9 mg/L, correspondientes al cloruro y bicarbonato respectivamente, por lo tanto, el HCO_3^- es el anión que presenta la menor sensibilidad. Con respecto a los límites de cuantificación, el más bajo corresponde al ion sulfato con 1.1 mg/L, mientras que el más alto es para el ion bicarbonato, con 16.7 mg/L. Una vez diseñado, montado y validado el método, éste se aplicó para el análisis de 26 muestras de agua residual provenientes del valle del Mezquital, obteniéndose valores de recobro muy cercanos al 100 %, lo que indica que se cuenta con una metodología libre de interferencias para la determinación de cada uno de los aniones de trabajo presentes en este tipo de muestras.

INTRODUCCIÓN ¹⁻⁵

Durante las últimas décadas, la degradación ambiental ha sido reconocida como un problema a nivel mundial. Los sistemas acuáticos son los más propensos a sufrir cambios que ponen en riesgo su disponibilidad para la población, comprometiendo con ello la salud humana. Para poder mantener y asegurar una calidad de este tipo de sistemas, es importante llevar un control sobre su contenido ya que, de manera general, se encuentran diversos tipos de materia orgánica (grasas animales, aceites, pesticidas, residuos agrícolas, fenoles, vertidos industriales, proteínas, hormonas, agentes tensoactivos, etc.) y materia inorgánica (especies neutras, cationes y aniones).

Dentro del contenido de materia inorgánica, los aniones mayoritarios más comunes son: bicarbonato, cloruro, bromuro, nitrato, fosfato y sulfato. En la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, se muestra que estas especies tienen relevancia en la salud humana cuando se encuentran en concentraciones excesivas dentro del cuerpo de agua de estudio. Por ejemplo, el consumo excesivo del anión bromuro puede causar daños al sistema nervioso y a algunos órganos vitales, por ello es importante mantener un control de este ion y se pide mantener una concentración por debajo de los 6 mg/L. Por otro lado, la presencia de iones nitrato y fosfato puede ser utilizada como un monitor de contaminación en ciertos cuerpos de agua. Mientras que los iones bicarbonato y sulfato están más asociados con la dureza de un tipo de agua. Debido a que muchas veces las concentraciones presentes de estos iones son del orden de las partes por millón, se requiere de métodos sensibles para poder lograr su cuantificación, es aquí donde la cromatografía de iones juega un papel fundamental, ya que esta técnica de análisis puede determinar concentraciones de este orden de magnitud (mg/L) de manera simultánea. Por lo que la propuesta del presente trabajo está enfocada en el desarrollo de una metodología que permita la determinación de los aniones mayoritarios en muestras de agua de interés ambiental por medio de la técnica de cromatografía iónica con detección conductimétrica.

Ya que se tiene en cuenta que una metodología de análisis tiene como objetivo generar resultados de calidad, es importante que se realice un procedimiento de validación para demostrar que ésta cumple con los requisitos particulares para su uso específico previsto. Para llevar a cabo esta tarea, se debe realizar una serie de ensayos que eluciden las figuras típicas de un procedimiento de validación tales como: precisión, límites de detección y de cuantificación, robustez, intervalo de trabajo, sensibilidad, recobros, incertidumbre, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y especificidad.



CAPÍTULO I.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Desarrollar, validar e implementar una metodología por medio de la cromatografía de iones con detección conductimétrica, para la determinación simultánea de los aniones mayoritarios presentes en muestras de agua residual.

1.2 Objetivos particulares

- Determinar los parámetros que caracterizan el sistema cromatográfico de estudio como son: retención, selectividad y eficiencia.
- Determinar los parámetros típicos de validación para el método de análisis propuesto, en lo que se incluyen: los intervalos lineales y de trabajo, exactitud, precisión y los límites de detección y de cuantificación para los seis analitos de estudio.
- Evaluar la robustez del método propuesto.
- Aplicar el método para el análisis de muestras de agua residuales provenientes del Valle del Mezquital, estado de Hidalgo.



ΚΑΠΪΤΥΛΟ ΙΙ.

MARCO

ΤΕΌΡΙΚΟ

2.1 AGUA

2.1.1 Generalidades ^{1,2}

El agua es uno de los elementos más comunes en la Tierra. En estado líquido se halla en lagos, ríos, presas, depósitos subterráneos (llamados acuíferos), mares y océanos circundantes; en estado gaseoso se presenta como vapor de agua en la atmósfera; y en estado sólido cubre las regiones polares y las montañas más altas en forma de hielo o nieve. De acuerdo con las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud y del Programa Conjunto de Monitoreo, en el planeta existen 1400 millones de km³ de agua, de los cuales el 97.5 % es agua salada contenida en los mares y los océanos y tan sólo el 2.5 % es la llamada agua dulce, se le llama así por tener una baja concentración de sales minerales disueltas. Un litro de agua dulce tiene más o menos 0.1 gramos de sales disueltas, mientras que el agua salada, como la que se encuentra en los mares, puede contener entre 33 y 39 gramos de sal. La mayor parte de agua dulce se encuentra en glaciares y capas de hielo, principalmente en Groenlandia y la Antártica. También una porción importante se encuentra atrapada en depósitos subterráneos profundos de difícil acceso y sólo el 0.3% de esta agua dulce se localiza en lugares que podríamos llamar accesibles -como los lagos y ríos- para ser utilizada por los seres vivos de las zonas continentales, incluyendo al hombre. El agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro satisfactorio (suficiente, inocuo y accesible).

El agua es indispensable para la vida, se usa en la agricultura, minería, industria y es vital para otros organismos, es por eso que se dice que el agua es un elemento indispensable para el funcionamiento y desarrollo de la sociedad.

El acceso al agua potable es fundamental para la salud, es uno de los derechos humanos básicos y un componente de las políticas eficaces de protección a la salud. El acceso al agua potable es una cuestión importante en materia de salud y desarrollo en los ámbitos nacional, regional y local.

2.1.2 Regulación del agua en la naturaleza: ciclo del agua.

Existe un flujo continuo del agua conocido como ciclo del agua (o ciclo hidrológico). Como todo buen ciclo, no tiene un principio y un fin (figura 2.1). La evaporación del agua del mar y de las aguas superficiales de los ríos y lagos, y la transpiración de los seres vivos, son consideradas como su inicio. A través de este proceso, pequeñas partículas de agua se condensan sobre partículas de polvo, polen u otras superficies formando así las nubes (que son esencialmente vapor de agua) que luego son transportadas por el viento. Cuando se da una combinación de saturación de humedad en el aire con una disminución de temperatura, el agua contenida en las nubes se libera en forma de lluvia, granizo o nieve y se deposita nuevamente en la superficie terrestre. Mucha de la lluvia cae directamente en el mar, pero cuando cae en tierra firme comienza su movimiento: si escurre por la superficie pasa a formar parte de los ríos, lagos y demás cuerpos de agua, si se infiltra (percola) en el suelo puede moverse por debajo de éste o depositarse en enormes almacenes subterráneos llamados acuíferos.

El agua que circula por los ríos y arroyos, así como una buena parte de lo que se infiltró en el suelo, termina su camino en el mar. Con la acción del calor, el agua líquida vuelve a evaporarse, y el ciclo sigue así continuamente. Este ciclo mueve anualmente unos 577 mil km³ de agua; sin embargo, la mayor cantidad de agua que existe en el planeta se mantiene en sus depósitos, los mares y los hielos perpetuos de las regiones polares.

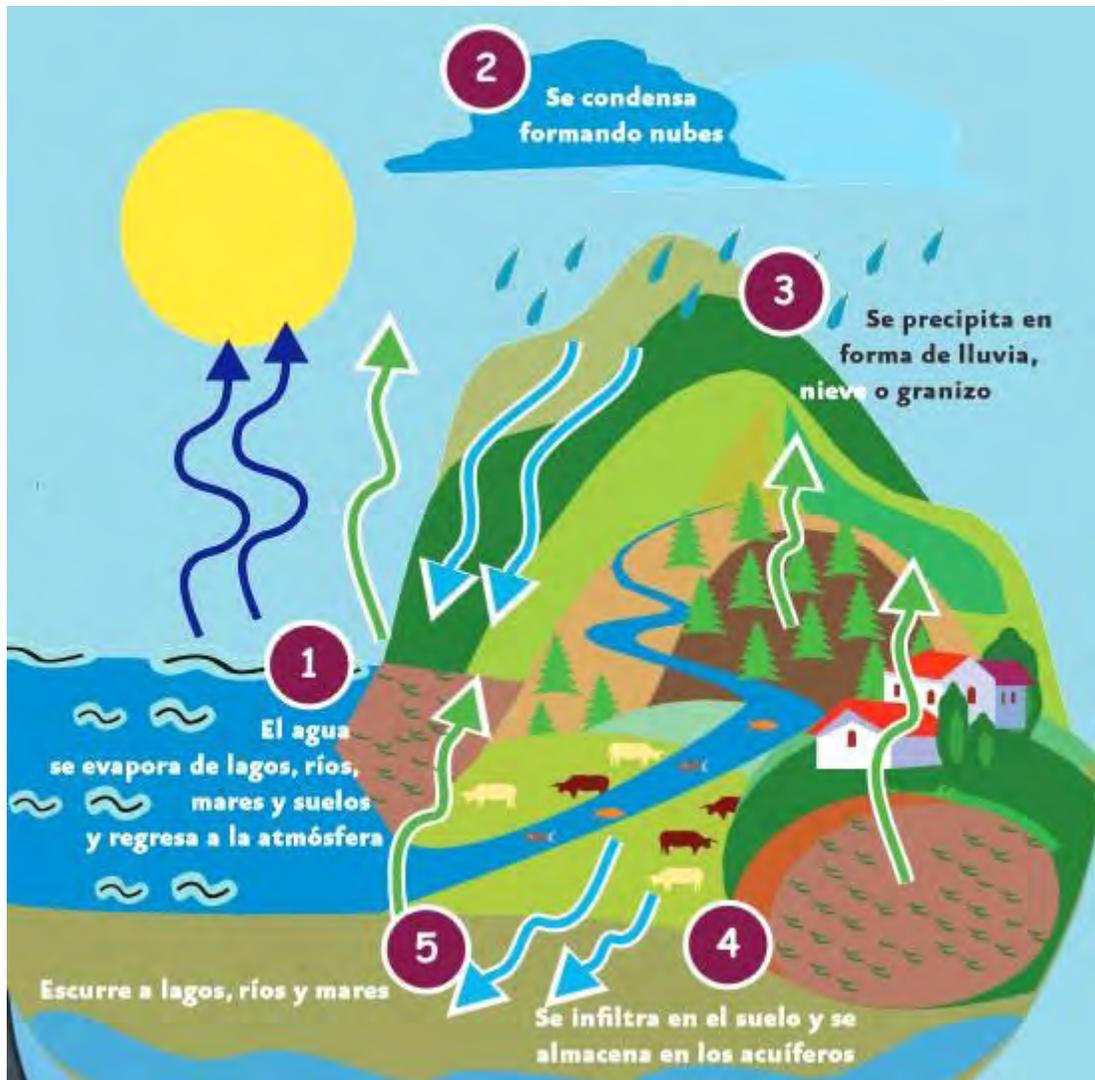


Figura 2.1. El ciclo hidrológico. SEMARNAT (2016).

2.1.3 Tipos de agua ³

Dependiendo de sus características mineralógicas y de los usos que se le haya dado, se diferencian varios tipos de agua, y no todos son aprovechables por la vida, ni útiles a los seres humanos.

La más común en el planeta es el agua salada, que es la que hay presente en mares y océanos. Sólo puede ser utilizada por seres vivos especializados, llamados halófilos (de halo: sal y filo: amigo). Aquí encontramos gran cantidad de especies

marinas, algas, bacterias y plantas de litoral que soportan niveles altos de sal. Las aguas saladas con un bajo índice de sal se llaman salobres.

El agua dulce es la que tiene un índice de sales disueltas muy bajo, de tal manera que al sabor no se aprecian. Existen muchos tipos de agua dulce, dependiendo de sus características. En la naturaleza podemos encontrar el agua circulando en la superficie terrestre, siendo esta la llamada agua superficial. Al agua infiltrada en el suelo se le conoce como agua subterránea y es ésta la que se infiltra hasta llegar a una capa impermeable llamada capa freática; cuando llega a un punto, debajo del terreno y se acumula en superficie sin posibilidad de desagüe se forma el agua estancada la cual tiene grandes cantidades de nutrientes pero poco oxígeno por lo que sólo permite la vida anaeróbica y se le conocen como aguas muertas.

El agua subterránea circulante que termina saliendo en unos puntos concretos, llamados surgencias o manantiales; es el agua de manantial. Si en su recorrido atraviesa una zona próxima al manto, o a una intrusión volcánica, se calienta y aparece en superficie a altas temperaturas, se les denomina aguas termales, las cuales son muy utilizadas como aguas medicinales. También se les consideran medicinales determinadas aguas que llevan en disolución cantidades significativas de minerales, procedentes de los lugares por los que atraviesan. Se les llama aguas podridas cuando se encuentra presente el azufre y por lo regular tienden a tener mal olor.

Parte del agua infiltrada que queda retenida en un depósito subterráneo se convierten en acuíferos. Cuando un acuífero lleva cerrado muchos siglos (en ocasiones cientos de miles de años) tenemos el agua fósil.

Las rocas procedentes de volcanes son sometidas a grandes presiones, también contienen agua que exudan al cambiar de estado. Son, respectivamente, el agua magmática y el agua metamórfica, pero es muy escasa sobre la Tierra.

Dentro del agua dulce existen dos tipos: el agua dura y el agua blanda, dependiendo de la cantidad de iones y sales disueltos. El agua dura es aquella que tiene gran

cantidad de cationes, principalmente calcio y magnesio. Dificultan la disolución de otras sustancias, como el azúcar, la sal o los jabones, por lo que el lavadose se hace más difícil. Son muy comunes en las regiones con grandes cantidades de caliza y en los climas secos.

El agua blanda, por el contrario, contiene poca cantidad de cationes, por lo que no presenta dificultades a la disolución de otras sustancias, como las ya mencionadas, azúcar, sal o jabones. Es posible quitar al agua prácticamente todos sus iones y sales, por medio de la ebullición y la destilación del vapor de agua en un circuito controlado, este tipo de agua es conocido como destilada.

El agua bruta es la que no ha recibido ningún tipo de tratamiento químico. Puede ser apta para el consumo humano.

El agua potable es aquella que puede ser consumida por los seres humanos y los animales, es un agua dulce, que puede ser tanto dura como blanda.

Una vez usada, el agua regresa a la naturaleza con distintos grados de contaminación. Se llaman aguas grises a las aguas que han servido para usos domésticos y tienen un índice de contaminación moderado: detergentes, excrementos humanos, grasas, polvo, barro, etc. Cuando se unen todas las aguas grises de una comunidad, se forman las aguas negras, mucho más contaminadas por diversos agentes. Aquí no sólo aparecen las aguas de uso doméstico sino también, las de uso industrial y municipal, mezcladas con las aguas de lluvia y las aguas subterráneas superficiales. Cuando las aguas negras y grises se encuentran canalizadas a través de un sistema de alcantarillado, se denominan aguas residuales. Las aguas residuales han de ser canalizadas hacia un sistema de depuración donde se separan todos los contaminantes posibles. Si las aguas residuales no son tratadas de esta manera, se convierten en un agente contaminante muy poderoso que afecta a todos los ciclos naturales del lugar en donde se liberan.

2.2 Agua residual ^{1, 4}

El tratamiento del agua residual es indispensable para garantizar el ciclo del agua. Es por ello que los municipios e industrias deberán cumplir con la normatividad establecida, en lo que se refiere a las descargas que son vertidas a los cuerpos de aguas nacionales, como es el caso de los ríos, lagos y humedales.

Frecuentemente, el agua residual es utilizada como agua de riego en la agricultura y es de este modo, en que es más factible que llegue al consumo humano, a través de las frutas y verduras. La contaminación del agua tiene una gran repercusión en la salud de la salud humana. Las medidas destinadas a mejorar la calidad del agua de consumo, proporcionan beneficios significativos para la salud.

A través del agua de consumo, existe una exposición a sustancias químicas como: fluoruro, arsénico, nitrato, plomo, selenio y el uranio, las cuales producen efectos negativos hacia la salud humana.

2.2.1 Características fisicoquímicas del agua dulce

Las aguas naturales, al estar en contacto con diferentes agentes (aire, suelo, vegetación, subsuelo, etc.), incorporan parte de los mismos, por disolución o arrastre, o incluso, en el caso de ciertos gases, por intercambio. A esto es preciso sumar la existencia de un gran número de seres vivos en el medio acuático que interrelacionan con el mismo, mediante diferentes procesos biológicos, en los que se consumen y desprenden distintas sustancias.

Esto hace que las aguas dulces puedan presentar un elevado número de sustancias en su composición química natural, dependiendo de diversos factores, como las características de los terrenos atravesados, las concentraciones de gases disueltos, etc. Entre los compuestos mayoritarios más comunes que se pueden encontrar en las aguas dulces son: carbonatos, bicarbonatos, sulfatos, cloruros y nitratos. Como constituyentes minoritarios los fosfatos, silicatos, metales como elementos traza y gases disueltos como oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono.

El agua de lluvia presenta iones como: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} y algunos gases disueltos como: CO_2 , O_2 , O_3 , N_2 , etc.

La composición química natural de las aguas puede verse alterada por actividades humanas, como las agrícolas, ganaderas e industriales, principalmente. La consecuencia es la incorporación de sustancias de diferente naturaleza a través de vertidos de aguas residuales o a su paso por terrenos tratados con productos agroquímicos o contaminados.

Estas incorporaciones ocasionan la degradación de la calidad del agua provocando diferentes efectos negativos, como la modificación de los ecosistemas acuáticos, la destrucción de los recursos hidráulicos, riesgos para la salud, incremento del coste del tratamiento, daño en instalaciones (incrustaciones, corrosiones, etc.), así como la destrucción de zonas de recreo.

Las aguas contaminadas presentan diversos compuestos, en función de su procedencia: pesticidas, tensoactivos, fenoles, aceites y grasas, metales pesados, etc. La composición específica de un agua determinada influye en propiedades físicas, tales como: densidad, tensión de vapor, viscosidad, conductividad, etc.

2.3 Importancia del monitoreo ambiental en el agua ^{1,4}

Independientemente de su uso, la calidad del agua radica principalmente en las sustancias que lleva disueltas o en suspensión y los organismos que ahí se encuentran. Esto significa que para determinar la calidad del agua necesitamos conocer algunas características que afectan su posible uso como, por ejemplo, el oxígeno que tiene disuelto, las partículas suspendidas, la cantidad y tipo de sales disueltas, la presencia y concentración de compuestos tóxicos, las bacterias y otros tipos de microorganismos.

Cuando el agua contiene materia extraña, como microorganismos, productos químicos, residuos industriales o domésticos, que alteran sus características naturales, se dice que está contaminada.

El fenómeno de la contaminación del agua no es nuevo, pues ha acompañado al hombre en toda su historia. Sin embargo, el deterioro más severo y extendido de los ríos y lagos del mundo se ha dado a partir del siglo XVIII, con el inicio de la revolución industrial y la implantación de una variedad de procesos de transformación que empleaban grandes volúmenes de agua y, en consecuencia, también generaban enormes cantidades de agua de desecho que contaminaban los ríos y lagos donde se vertían. En ese entonces, la prioridad era incrementar la producción y se les daba poca atención a los daños que ocasionaban al ambiente. Desde entonces se veía a los ríos y lagos como enormes depósitos donde se podían verter sin problema sus desechos, ya que se los llevaba lejos (para el caso de los ríos) o bien, se diluían y descomponían de manera natural. Actualmente, el monitoreo de la calidad del agua es de suma importancia para la humanidad, por lo que se han realizado diversos esfuerzos para el desarrollo de metodologías de análisis que permitan la cuantificación de las especies que constituyen al agua y cuyos resultados sean lo suficientemente confiables.

El control de la calidad de las aguas incluye la problemática del muestreo (número de muestras, frecuencia, lugares de muestreo), conservación de las muestras, selección de los parámetros de control, elección de los métodos analíticos y el control de calidad de los análisis.

2.4 Cromatografía de líquidos

2.4.1 Generalidades ^{5, 6}

La cromatografía es un proceso de separación de los componentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los componentes de una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de concentración de los componentes presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, la cual está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza al

contacto de la primera. La elución a velocidades diferentes de los componentes presentes, por la fase móvil, conduce a su separación e identificación por comparación. Si se dispone de un componente, del que no se sabe si se trata de A o B, su identificación consistirá en comparar su tiempo de migración con el correspondiente a dos componentes de referencia A y B, bajo las mismas condiciones de análisis.

Se puede analizar adecuadamente la pureza de un compuesto o la composición de una mezcla. La separación efectuada se conserva en un registro individual, llamado cromatograma, que no es otra cosa que la expresión gráfica de las variaciones de composición de la fase eluida con el transcurso del tiempo, este gráfico se obtiene con un detector situado a la salida de la columna.

Un cromatograma de este tipo puede brindar tanto información cualitativa como cuantitativa, ya que cada componente de la mezcla tiene su propio tiempo de elución o tiempo de retención (el punto en que cada uno de éstos da una señal aparente en la pantalla de una computadora) bajo ciertas condiciones; y tanto el área como el ancho de cada señal están relacionadas con la cantidad de sustancia. El cromatograma es una imagen que traduce visualmente, en una pantalla o en un papel de evolución, en función del tiempo, de algún parámetro asociado a la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. El tiempo de elución se lleva al eje de las abscisas y la intensidad de la señal detectada al eje de las ordenadas. La línea base se refiere a la señal obtenida en ausencia del compuesto eluido.

En el análisis cuantitativo hay que separar adecuadamente los componentes que hay que cuantificar con el objetivo de eliminar las posibles interferencias que pudieran conducir a valores erróneos. Si la señal enviada al detector varía linealmente con la concentración de un compuesto, lo mismo ocurrirá con el área del pico correspondiente en el cromatograma.

2.4.2 Conceptos teóricos de la cromatografía ⁶

Existen teorías que pueden ayudar a explicar el proceso de separación de los analitos como, por ejemplo, la estocástica, la de platos y la aproximación por dinámica molecular. El modelo más antiguo para explicar el mecanismo de migración y separación de los compuestos en la columna, es el también denominado modelo de platos de Craig, que es un enfoque estadístico, que permite describir de forma sencilla las separaciones. Aunque la cromatografía sea un proceso continuo, en el modelo estático de Craig se considera que cada soluto se desplaza progresivamente en una serie de etapas distintas. El proceso elemental se representa como un ciclo de adsorción/desorción. El encadenamiento de estas etapas reproduce la migración de fluidos en la columna, al igual que en una película de dibujos animados se da la impresión del movimiento mediante una serie de imágenes fijas. Cada etapa corresponde a un nuevo estado de equilibrio de toda la columna.

Estos equilibrios sucesivos se basan en el concepto de plato teórico, según el cual la columna, de longitud **L**, está dividida en **N** pequeños discos ficticios de una misma altura **H**, numerados del 1 a n. Para cada uno de ellos, la concentración del soluto en la fase móvil está en equilibrio con su concentración en la fase estacionaria. En cada nuevo equilibrio, el soluto ha alcanzado el siguiente disco de la columna; dicho disco se denomina plato teórico.

La altura equivalente a un plato teórico (AEPT o H) equivale a:

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Ec. 2.1}$$

Esta teoría tiene el defecto de no tener en cuenta la dispersión debida a la difusión de compuestos en la columna.

Eficiencia teórica (número de platos teóricos)

A medida que el soluto migra en la columna, ocupa una zona al ensancharse, esta dispersión lineal σ_L , representada por la varianza σ^2 , aumenta con la distancia recorrida. Cuando esta distancia vale **L**, siendo ésta la longitud de la columna, se dice lo siguiente:

$$\sigma^2 = H \cdot L \quad \text{Ec. 2.2}$$

Al recordar el modelo de los platos, este enfoque conduce al valor de la altura equivalente a un plato teórico **H** y una cantidad **N** de platos teóricos.

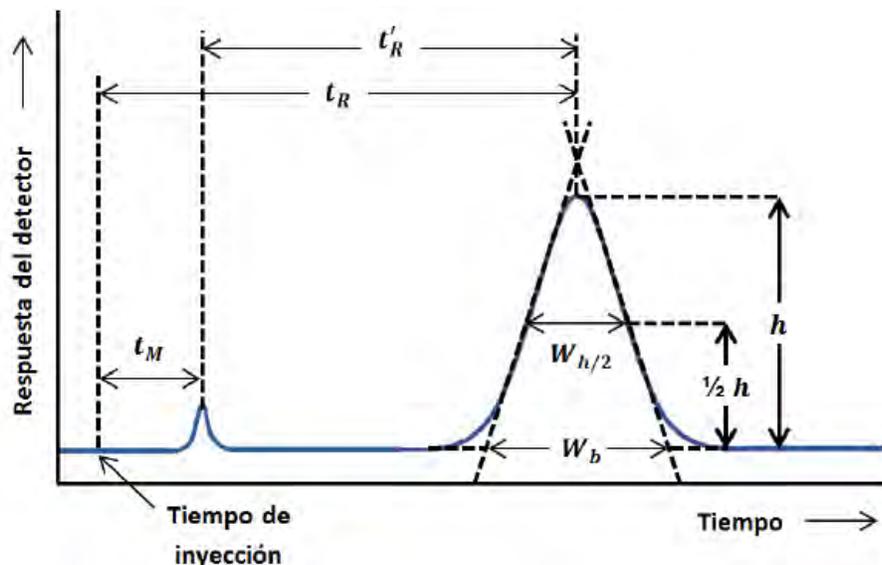
Entonces para todo el cromatograma, a partir de un pico de elución del que se podrá medir la varianza temporal σ^2 , se podrá calcular para el compuesto en cuestión la eficacia teórica **N** y deducir el valor de **H** sabiendo que **H= L/N**.

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} \quad \text{Ec. 2.3}$$

En el cromatograma, σ representa la media de la anchura del pico a 60.6 % de su altura y t_R el tiempo de retención del compuesto: t_R y σ deben incluirse en las mismas unidades (tiempo transcurrido, distancias o volúmenes eluidos, si el caudal es constante). Si se expresa σ en unidades de volumen, 4σ corresponde al volumen del pico que equivale al 95% del compuesto inyectado. Como consecuencia de las propiedades de la curva de Gauss ($w_b = 4\sigma$), se obtiene la siguiente expresión:

$$N = 16 \frac{t_R^2}{w_b^2} \quad \text{o} \quad N = 5.54 \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad \text{Ec. 2.4}$$

En la figura 2.2 se presenta un cromatograma en el que se muestran algunos parámetros cromatográficos, como son: tiempo muerto (t_0), tiempo de retención (t_R), tiempo de retención corregido (t'_R), altura del pico (h), ancho de pico (w_b), altura a la mitad de pico ($h_{1/2}$) y el ancho a la mitad del pico ($w_{h/2}$).



Figura

Representación de algunos parámetros cromatográficos.

2.4.3 Parámetros de retención

Tiempo de retención (t_R), tiempo muerto (t_M), y tiempo reducido (t'_R)

Un componente de la mezcla de solutos se caracteriza por su tiempo de retención t_R , el cual representa el tiempo transcurrido entre el instante de inyección y cuando el pico correspondiente a alcanzado su máximo. En el caso ideal, t_R es independiente de la cantidad inyectada. Un componente no retenido sale de la columna en el tiempo t_M , llamado tiempo muerto¹ (designado también como t_0). La diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto se denomina tiempo de retención corregido t'_R .

Volumen de retención o de elución, V_R

El volumen de elución (o de retención) V_R de cada soluto, representa el volumen de fase móvil necesario para que éste migre de un extremo de la columna a otro. En el cromatograma se corresponde con el volumen de la fase móvil que fluye entre el

¹ Los símbolos usados siguen las recomendaciones de la IUPAC- Pure & Appl. Chem, 65(4), 819 (1989).

instante de inyección y el correspondiente a la aparición del máximo del pico, siempre y cuando el caudal C se mantenga constante,:

$$V_R = t_R \cdot C \quad \text{Ec. 2.5}$$

Volumen de la fase móvil en la columna (o volumen muerto), V_M

El volumen de la fase móvil en la columna (también llamado volumen muerto) V_M , corresponde al volumen intersticial accesible. Puede calcularse en un cromatograma, al introducir un soluto que no sea retenido por la fase estacionaria. Se puede expresar en función de t_M y del caudal C:

$$V_M = t_M \cdot C \quad \text{Ec. 2.6}$$

Volumen de la fase estacionaria, V_S

Este volumen, designado como V_S , no aparece en el cromatograma. En los casos más sencillos se calcula restando al volumen total interno de la columna vacía y el volumen de la fase móvil.

Factor de capacidad, k'

Se define como la razón de la cantidad de soluto en fase estacionaria entre la cantidad en fase móvil al equilibrio, es decir, relaciona la cantidad del soluto en las dos fases. Es igual a la relación del tiempo en el que el soluto permanece en fase estacionaria respecto al tiempo en fase móvil:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Ec. 2.7}$$

Donde k' es un parámetro independiente del caudal y de la longitud de la columna, que varía con las condiciones operatorias.

El parámetro más importante en cromatografía para definir el comportamiento de las columnas es k' , el cual no es una constante. Éste considera la capacidad de la columna para retener cada compuesto. Para no prolongar el tiempo de análisis se intenta no alcanzar valores elevados.

Factor de separación (o de selectividad) entre dos solutos, α

El factor de separación α permite precisar las posiciones relativas de dos picos adyacentes 1 y 2 en un cromatograma. Se define a través de las siguientes expresiones y no puede ser inferior a 1:

$$\alpha = \frac{t_{R(2)}}{t_{R(1)}} \quad \text{o} \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Ec. 2.8}$$

Para picos adyacentes, se define el factor de *retención relativo* r , que se calcula como α y tampoco puede ser inferior a 1.

Factor de resolución entre dos picos, R

Para definir numéricamente que una separación entre dos componentes es buena, se emplea el factor de resolución R , que se calcula a partir del cromatograma:

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2} \quad \text{Ec. 2.9}$$

La resolución mínima aceptable para mezclas sencillas es de 1.0, mientras que un valor de 1.5 representa una separación a la línea base de picos, de tamaño similar (figura 2.3).

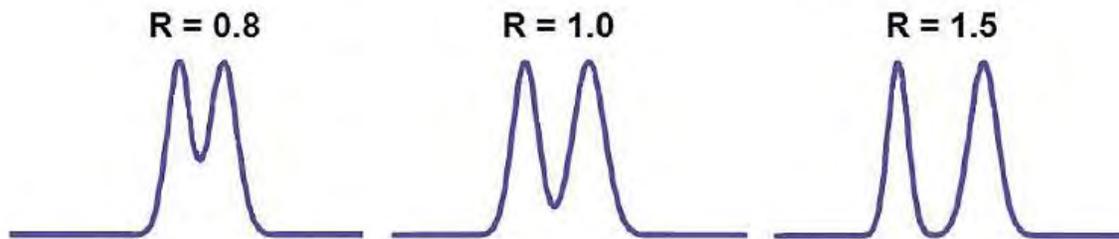


Figura 2.3. Valores de resolución entre dos picos cromatográficos

2.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución ⁹

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica de separación, de amplio uso por las premisas en que se basa, el gran desarrollo que ha tenido y los beneficios de valorar un gran número de sustancias con exactitud, rapidez y alta resolución.

La cromatografía líquida de alta resolución se encuadra dentro de la cromatografía de elución. En esta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente, que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Los componentes de la muestra presentan un equilibrio de distribución entre ambas fases, y este equilibrio determina la velocidad con la cual cada componente migra a través del sistema. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra a través de la columna, cada una de las sustancias introducidas al sistema eluirá en un tiempo diferente, es decir, estarán separadas. La cromatografía de líquidos de alta resolución utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de alta resolución. La combinación de disolventes de diferentes polaridades y el efecto de la presión en el sistema cromatográfico, han favorecido la separación de una gran cantidad de compuestos, complementando las aplicaciones de otro tipo de cromatografías. En esta técnica cromatográfica, la fase móvil y el soluto compiten por los sitios de adsorción en la fase estacionaria, por lo

tanto los componentes más fuertemente adsorbidos son retenidos por más tiempo que los que se adsorben débilmente. Los compuestos más polares se adsorben a una superficie polar en mayor grado que los compuestos menos polares, por lo tanto, la retención en una columna está en relación directa con la polaridad de la muestra y de la fase estacionaria utilizada.

2.5.1 Clasificación de las técnicas de CLAR

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de diferentes maneras, pero la forma más habitual es la realizada con base a la naturaleza de la fase estacionaria, ya que es esta la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación; de este modo, se pueden enumerar las siguientes técnicas:

- **Cromatografía de adsorción (líquido-sólido)**

En este tipo de cromatografía se establece una competencia entre las moléculas de soluto y fase móvil por la fase estacionaria. La fase estacionaria es un sólido finamente dividido sobre el que las moléculas se adhieren por un doble efecto de adsorción física y química. El parámetro físico-químico implicado es el coeficiente de adsorción. La separación se basa en repetidas etapas de adsorción/desorción, y esta es óptima cuando los grupos funcionales del soluto se superponen a esos sitios de adsorción. Los empaques generalmente son de: sílice, alúmina o carbón. Para la separación de bases se emplean las sílices, ya que tienen la propiedad de acidez, en caso contrario, las alúminas se orientan a la separación de ácidos debido a su basicidad.

- **Cromatografía de afinidad**

Está basada en la unión covalente entre un compuesto llamado ligando de afinidad a un soporte sólido. Al hacer pasar la muestra por una columna, sólo se retienen aquellos solutos altamente específicos que se ligan al complementario, eluyéndose los restantes. La separación se basa en el coeficiente de reparto K de la disolución

entre las dos fases, un fenómeno comparable a la extracción de una fase acuosa en un disolvente por medio de un embudo de decantación. A su vez esos solutos retenidos se pueden separar cambiando las condiciones de la fase móvil.

- **Cromatografía quiral**

En una columna cuya fase estacionaria sea quiral, un compuesto con un centro de asimetría, en el que los dos enantiómeros R y S estén presentes, dará lugar a dos picos, cuyas áreas son proporcionales a la abundancia de cada una de las formas. Al ser fases estacionarias poco estables, es preferible utilizar resinas ópticamente activas o geles de sílice en los que se han enlazado ciclodextrinas (cadenas cíclicas de 5 a 7 moléculas de glucosa) unidas mediante un “puente” de algunos átomos de carbono. Estas moléculas de forma cilíndrica presentan una cavidad hidrófoba, mientras que la pared externa es hidrófila. Estas fases tienen la particularidad de permitir la inclusión selectiva de gran variedad de compuestos que forman, en la superficie de la fase quiral, complejos diastereoisoméricos reversibles.

- **Cromatografía de interacción hidrófoba**

Este método cromatográfico permite mejorar la separación de compuestos bioinorgánicos como las proteínas solubles en el agua. Se utiliza una columna apolar y se comienza la elución con una fase móvil muy salina. En estas condiciones, las proteínas se fijan por su región hidrófoba sobre la fase estacionaria. A continuación, se disminuye progresivamente la concentración salina para que las proteínas vuelvan a pasar a la fase móvil. De este modo son eluidas en orden decreciente de su carácter hidrófilo.

- **Cromatografía de fase normal**

La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria

puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc.).

- **Cromatografía de fase enlazada**

La cromatografía de fase enlazada se caracteriza porque la fase estacionaria se une a las partículas de soporte o a las paredes internas de la columna. Para inmovilizar la fase estacionaria (generalmente se trata de un polímero de tipo líquido), hay que fijar de forma definitiva las especies que la componen por enlaces covalentes: es la técnica de inmovilización por enlace. El material de la fase estacionaria consiste en partículas de sílica gel o de polímeros que tienen una morfología, un tamaño, cierta porosidad y determinada estructura química que amplían el espectro de beneficios a las necesidades de separación, teniendo en cuidado en controlar rigurosamente la humedad de los disolventes. En el caso particular de la sílica gel, ésta sufre modificaciones para reemplazar sus grupos silanoles activos polares, por grupos funcionales determinados: octadecilsilano (ODC o C₁₈), fenilo, ciano, amino, diol, nitro, etc.

- **Cromatografía de fase reversa**

En la cromatografía de fase reversa se emplea un empaque enlazado hidrofóbico de diferentes longitudes de cadena, 2, 4 ó 18 átomos de carbono como fase estacionaria y una fase móvil polar constituida por mezclas de agua con algún disolvente orgánico y puede también adicionarse amortiguadores o sales. La retención depende fundamentalmente de las siguientes variables: concentración y longitud de las cadenas hidrocarbonadas en la fase estacionaria, superficie hidrocarbonada en el soluto y por último de la polaridad de la mezcla de la fase móvil. Algunas ventajas de esta modalidad se enlistan a continuación:

- Los compuestos no iónicos e ionizables se pueden separar en la misma columna y con la misma fase móvil,
- la adsorción irreversible casi no ocurre,
- la fuerza de atracción entre la superficie no polar y el soluto, es débil,
- los modificadores orgánicos más frecuentemente utilizados son el metanol y el acetonitrilo,
- se puede predecir el orden de elución de los analitos en función de la polaridad de éstos,
- el sistema requiere poco tiempo para llegar al equilibrio, al hacer un cambio de fase móvil.

- **Cromatografía de iones**

Es el método de separar iones disueltos por intercambio iónico con el empleo de fases estacionarias de resinas poliméricas neutras. Estas partículas de resina, de aproximadamente de 10 μm de diámetro, se sulfonan o se aminan ligeramente y las esferitas quedan cubiertas de una película. Luego se introduce en un lecho de esferas poliméricas de 100-300 μm que se unen electrostáticamente sobre la superficie del núcleo polimérico inicial.

- **Cromatografía de pares iónicos**

Este método es una subespecialidad de la cromatografía de fase reversa. En este sistema la fase móvil está constituida por mezclas agua-metanol o agua-acetonitrilo, en la que se disuelven sales, disoluciones amortiguadoras y un ion de carga contraria a la de los solutos, cuya función es actuar como agente formador de pares de iones. Este ion recibe el nombre de contraion y puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica. Se ha propuesto que el fenómeno de separación se da de la siguiente manera: a) La molécula del soluto forma un par iónico con el contraion de la fase móvil, y este par ya neutro se reparte en la fase estacionaria hidrofóbica, b) El contraion se adsorbe en la fase estacionaria y se asocia a cualquier ion presente en

el medio; en un segundo paso la fase estacionaria ya convertida en un intercambiador de iones dinámico, puede retener a los solutos iónicos.

- **Cromatografía de exclusión o permeación en gel**

Este método cromatográfico no es interactivo, sino que se basa en el paso diferencial de moléculas de soluto que permean entre los soportes de diferentes tamaños y estructuras de poro, esta separación se da por el tamaño y la forma de los solutos. Para este método solo se requiere de un disolvente en el que la muestra se disuelva y posteriormente se separe. Si la fase móvil es acuosa, el nombre del método es filtración en gel; si la fase es orgánica se llama permeación en gel. Es importante seleccionar adecuadamente esta fase, de acuerdo al pH. Una variante de la cromatografía de exclusión o cromatografía de permeación en gel, es cuando se realiza para la exclusión de iones. En este método, el coeficiente de distribución toma el nombre de coeficiente de difusión.

- **Cromatografía de intercambio iónico**

Es un método muy frecuente y muy útil pues se emplea para separar macromoléculas cargadas. Esta fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos que retienen al soluto de carga opuesta, intercambiándolo con iones de la fase móvil mediante un proceso reversible. Se emplean empaques de columnas con grupos funcionales cargados que están unidos a una matriz polimérica.

2.6 Cromatografía de intercambio de iones¹⁰

Para la cromatografía de intercambio de iones la fase móvil está constituida por un medio acuoso iónico y la fase estacionaria por un sólido que juega, esencialmente, el papel de intercambiador de iones. Además de los sistemas de detección basados en la espectrofotometría o espectrofluorometría, como en la CLAR, se utilizan también técnicas electroquímicas debido a la naturaleza de las especies

conductoras presentes en la fase móvil. Las aplicaciones actuales de la cromatografía de intercambio de iones sobrepasan ampliamente los primeros resultados de la cromatografía por intercambio de iones obtenidos en los análisis de cationes y aniones. Su ámbito de aplicación, comparable al de la electroforesis capilar, incluye la separación de moléculas orgánicas o de especies inorgánicas con la condición de que sean de naturaleza iónica.

2.6.1 Fundamento teórico

Esta técnica está orientada hacia la separación de los iones y compuestos polares. Para ello se utilizan fases estacionarias que poseen zonas iónicas con el fin de crear interacciones dipolares con los diferentes analitos de la muestra. Cuando más grande sea la carga que posea un soluto, más retenido estará por la fase estacionaria. Este proceso de intercambio es más lento, comparado con los otros tipos de cromatografía. Para los compuestos orgánicos, el mecanismo precedente se superpone a los descritos en CLAR para columnas de polaridad inversa.

La progresión y la separación de los compuestos de la muestra están basadas en un intercambio de iones. Se distinguen dos situaciones:

1. Si se quiere separar especies catiónicas (tipo M^+), se elegirá una columna, llamada catiónica, en la cual la fase estacionaria posee los lugares aptos para intercambiar los iones (por ejemplo, un polímero que incluya aniones sulfato).
2. Inversamente, para separar especies aniónicas (tipo A^-) se escogerá una columna llamada aniónica (por ejemplo, un polímero que lleva enlazados grupos amonio). Se considera, por ejemplo, una fase de este segundo tipo que posee grupos de amonio cuaternario en equilibrio con aniones bicarbonato (contraiones) presentes en abundancia en el eluyente y, por tanto, fijados en todos los sitios catiónicos (figura 2.4). Cuando un anión negativo aportado por la muestra es arrastrado por eluyente, se propone una serie de equilibrios regidos por una ecuación de intercambio que determinan el reparto entre las fases móvil (FM) y estacionarias (FS). La ec. 2.10

corresponde a la fijación del anión A^- sobre la FS y la ec. 2.11 es el regreso de la FM, a medida que progresa en la columna.



$$\frac{[A^-]_{FS} \cdot [HCO_3^-]_{FM}}{[A^-]_{FM} \cdot [HCO_3^-]_{FS}} = Cte \quad \text{Ec. 2.12}$$

Este equilibrio representa la selectividad α entre los dos aniones frente al catión de la fase estacionaria.

El fenómeno de intercambio, que permite retener las especies polares sobre la resina, es conocido con el nombre de extracción en fase sólida.

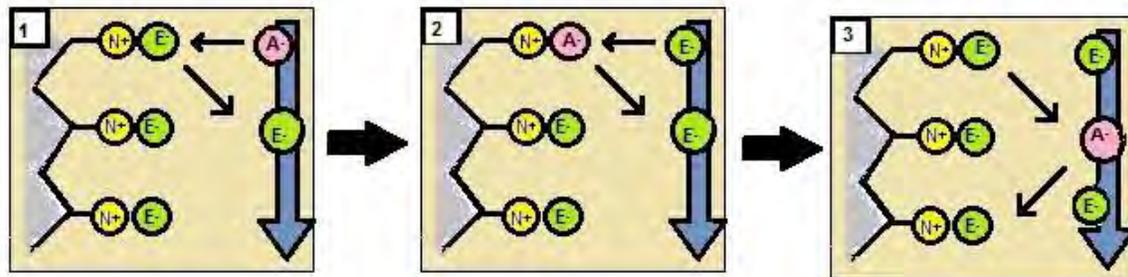


Figura 2.4. Esquema ilustrativo de las etapas de intercambio sucesivas en el contacto de una fase estacionaria amonio para aniones, entre un anión A^- y un contraanión E^- de la fase móvil.

En una primera fase, el ión E^- fijado sobre la fase estacionaria, se intercambia con la especie iónica A^- situada en la fase móvil. A continuación, la elución produce que

el sentido de la reacción se invierta, regenerando la fase estacionaria con los iones E^- [Rouessac & Rouessac, Análisis Químico, (2003)].

2.6.2 Instrumentación de un sistema cromatográfico iónico ^{9, 10}

Los equipos están constituidos por los mismos módulos que se encuentran en CLAR (figura 2.5). Los componentes básicos de un sistema cromatográfico son los siguientes: dispositivos de suministro de eluyentes (bombas y dispositivo de mezcla de eluyentes), dispositivo de inyección, conducciones y conexiones, detector, registrador y por último, pero no menos importante una fase estacionaria o columna. Las partes en contacto con la fase móvil deber ser de materiales inertes, debido a la agresividad de las disoluciones acuosas ácidas o básicas que sirven de eluyentes.

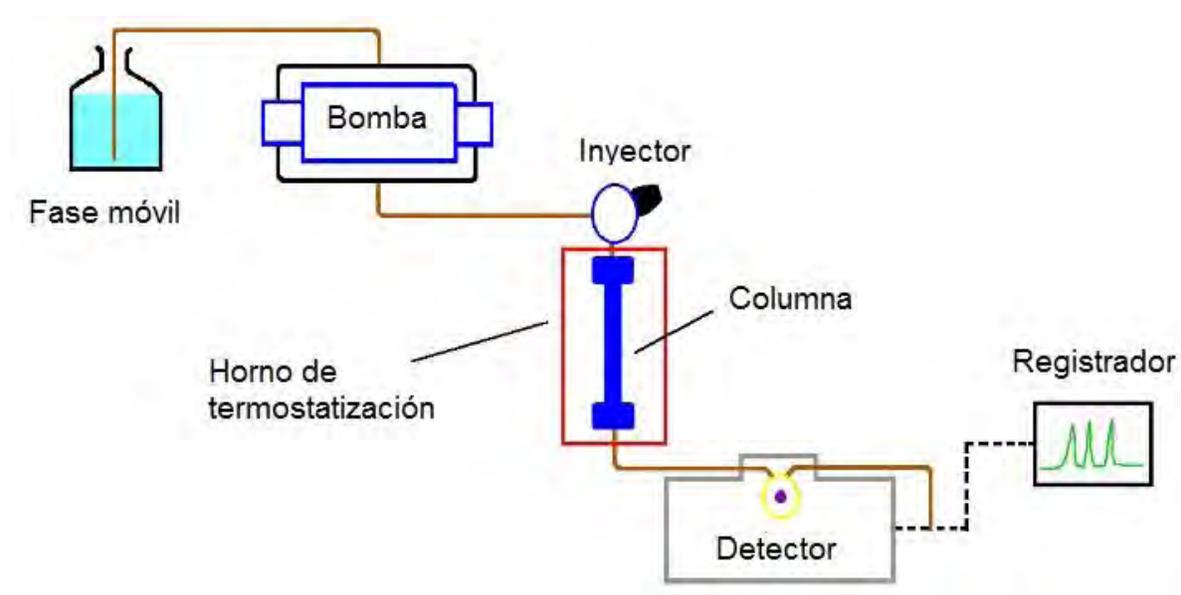


Figura 2.5. Esquema de un equipo para cromatografía de líquidos de alta resolución.

Además de los dispositivos anteriormente mencionados, se pueden incorporar en el sistema otros que pueden simplificar el trabajo, o bien, mejorar algún aspecto concreto de la técnica cromatográfica, como pueden ser:

- ✓ inyectores automáticos,
- ✓ colectores de fracciones,
- ✓ hornos termostatizados para las columnas,
- ✓ sistemas de tratamiento de datos y
- ✓ degasificadores.

2.6.3 Fase móvil

Los eluyentes que sirven de fases móviles son disoluciones acuosas saturadas en iones salinos u orgánicos y, si es necesario, con un poco de metanol o acetona para facilitar la disolución de ciertas muestras. Según el tipo de relleno de la columna, los iones del eluyente son aportados tanto por ácidos minerales y orgánicos (perclórico, benzoico, ftálico, metasulfónico, etc.), como por bases (hidróxido de potasio, carbonato, etc.). El pH se ajusta en función de la separación a realizar. Los eluyentes no pueden prepararse con antelación sabiendo que las disoluciones básicas tienen tendencia a carbonatarse por absorción de dióxido de carbono del aire ambiental, que interfiere en los tiempos de retención.

Los cromatógrafos de líquidos están equipados con uno o más recipientes para la fase móvil. En las mangueras de entrada de la fase móvil se instala un filtro para evitar el paso de partículas al sistema cromatográfico. Antes de instalar el sistema, las fases móviles deben ser degasificadas para remover el aire y otros gases disueltos que pueden interferir en el funcionamiento de la bomba, la columna y el detector. Este proceso puede efectuarse mediante vacío, ultrasonido o haciendo pasar una corriente de gas inerte a través de la fase móvil.

2.6.4 Bomba

Todos los equipos de CLAR incluyen al menos una bomba para forzar el paso de fase móvil a través de la columna cuyo relleno es muy compacto, es responsable de una sobrepresión muy importante a nivel del inyector. Esta presión puede alcanzar los 20 000 kPa (200 bares) según el caudal de la fase móvil, su viscosidad, el tamaño de las partículas y la longitud de la fase estacionaria (columna).

Se utilizan bombas de alta presión diseñadas para mantener un caudal sin pulsos y estable, incluso cuando la composición de la fase móvil varía. Estas bombas pueden ser de un solo pistón, o bien, llevar dos pistones que funcionan en oposición y están situados en serie para evitar las interrupciones del caudal que resulta de la fase de relleno del cilindro. La calidad de la bomba está determinada por el grado de estabilidad y reproducibilidad del flujo que genera. Generalmente, las bombas son de acero inoxidable o aleaciones de titanio que resisten la corrosión y el desgaste, algunas partes son de zafiro y de rubí.

La(s) bomba(s) permite(n) liberar un eluyente de composición fija (modo isocrático), o al contrario, de composición variable para hacer un gradiente de elución. En este segundo caso, se deben tener en cuenta las diferencias de compresibilidad de los disolventes, a fin de que la composición de la mezcla no se modifique por acción de la presión necesaria para el proceso cromatográfico.

La elución de la muestra puede efectuarse de dos maneras:

1. Isocrática, es cuando no se modifica la composición de la fase móvil durante todo el análisis.
2. Con gradiente, en este segundo caso la composición de la fase móvil varía durante una corrida. Se utilizan dos o más disolventes de diferente polaridad y se programa con cambios en su proporción, en forma continua o escalonada, según la naturaleza de la muestra.

2.6.5 Inyector

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto periodo de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación establecido en la columna y el detector. Para ello se utiliza una válvula de alta presión de varias vías, de tipo manual o automatizada, en los casos de los inyectores automáticos, situada justo antes de la columna. Se trata de una pieza de precisión que debe resistir valores de presión que pueden sobrepasar los 30 000 kPa.

- **Inyectores de jeringa**

En este tipo de inyectores, la introducción de la muestra en la columna se realiza por medio de una jeringa cuya aguja entra en el sistema cromatográfico a través de una membrana ("septum"), lo que permite depositar la muestra en la cabeza de la columna. Las ventajas de este tipo de inyector, radican en su facilidad de construcción y en que permiten sacar la mayor eficacia de la resina; por el contrario, son inyectores que presentan una gran falta de reproducibilidad, tienen una presión de trabajo limitada y son de gran dificultad de manejo.

- **Inyectores de válvula**

Este sistema de inyección consiste en una válvula de seis vías, dos de las cuales están conectadas entre sí por medio de una espiral o rizo ("loop"). Esta espiral es un tubo de volumen conocido, cuya misión es la de contener la muestra antes de efectuar la inyección.

La introducción de la muestra en la columna se lleva a cabo en dos etapas; la primera se realiza a presión atmosférica y consiste en cargar la muestra en la espiral con ayuda de una jeringa; en la segunda mediante un giro de la válvula, se hace pasar el eluyente a través de la espiral hacia la columna.

Las válvulas de inyección son los dispositivos más utilizados para la introducción de la muestra al sistema cromatográfico. Se les puede integrar un *loop* intercambiable que consiste en un tubo de acero inoxidable de diámetro interno pequeño y de volumen fijo y conocido, lo que permite inyectar siempre el mismo volumen de muestra. Estas válvulas tienen dos posiciones:

1. Posición de carga: en ésta se llena el *loop* con la muestra a la presión atmosférica.
2. Posición de inyección: es aquí cuando se coloca al *loop* lleno de muestra en la corriente de la fase móvil, con la subsecuente inyección en la parte superior de la columna, sin interrupción significativa del flujo.

2.6.6 Fase estacionaria o columna

Las fases estacionarias deben cumplir como requisito el poseer una distribución granulométrica comprimida (monodispersa), tener una gran superficie específica, presentar resistencia mecánica, permanecer estables a pH ácidos o básicos y ser capaces de asegurar una transferencia rápida de los iones.

La columna es el centro efectivo de un cromatógrafo, por tanto, es fundamental optimizar su eficiencia y tener los cuidados para protegerla de contaminantes y alargar su utilidad. Generalmente a la entrada de la columna hay un manómetro que registra la presión. La columna contiene el empaque necesario para la separación deseada siempre y cuando la elección sea la adecuada. La fase puede ser sílice en caso de adsorción, fases enlazadas para la cromatografía líquido- líquido, grupos funcionales de intercambio iónico, geles de porosidad específica para cromatografía de exclusión o algún otro empaque particular.

Están constituidas de una pared gruesa de acero inoxidable para resistir altas presiones y la acción química de la fase móvil. Tradicionalmente se utilizan columnas con diámetro interno de 4,6 mm que exigen un flujo de fase móvil de 0.5 a 2 mL/min, y una longitud que oscila entre los 3 y 25 cm. La fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados en sus extremidades, cuyos volúmenes muertos deben ser lo más pequeños posibles. Actualmente existe una amplia gama de columnas más estrechas: *narrow-bore* (2-4 mm), *micro-bore* (1-2 mm) y capilares rellenas (<1 mm), para las que el máximo caudal admisible desciende a unos cuantos $\mu\text{L}/\text{min}$, lo que requiere una adaptación de las bombas y el detector.

Es muy conveniente usar precolumnas (de longitudes entre 0.4 y 1 cm), antes de las columnas analíticas, con un empaque químicamente similar y mayor tamaño de partícula. La finalidad de estas precolumnas es retirar las impurezas del disolvente y capturar los componentes de la muestra fuertemente retenidos, impidiendo así la contaminación gradual de las columnas analíticas.

2.6.7 Detector

Los detectores deben reunir un cierto número de cualidades como el dar a cada compuesto detectado una respuesta proporcional a su concentración instantánea, ser sensibles y tener poco ruido de fondo, así como mantener una respuesta estable en el tiempo.

Los compuestos separados en la columna son arrastrados a diferentes tiempos por la fase móvil, llegan al detector que recibe cantidades puntuales de material a un flujo constante.

Los detectores más frecuentes utilizados en la cromatografía de líquidos son los siguientes:

- Fotómetros y espectrofotómetros de ultravioleta-visible
- Detector fluorométrico
- Detectores electroquímicos
- Detectores de índice de refracción
- Detector de conductividad

2.6.8 Detector de conductividad

A diferencia de los detectores espectrofotométricos usados en CLAR, basados en la absorción UV-Vis o en la emisión de fluorescencia, en los que la fase móvil no genera señal en el intervalo de medida, en CI se aplica un modo de detección particular, basado en la propiedad de los electrolitos de conducir la corriente eléctrica, midiendo la conductancia (inversa a la resistencia) de la fase móvil entre dos microelectrodos a la salida de la columna. Para poder hacer una medida directa es necesario utilizar un eluyente con poca concentración de iones, que posea una débil conductancia, y disponer de una celda de medida termostaticada a 0.01°C , debido al efecto pronunciado de la temperatura sobre la conductancia ($\approx 5\% \cdot ^{\circ}\text{C}^{-1}$). La celda de medida, colocada a la salida de la columna, es de un volumen muy reducido (alrededor de $2\ \mu\text{L}$).

2.6.9 Supresor de iones

En el caso de un eluyente fuertemente iónico puede ser difícil distinguir la señal producida por las pequeñas concentraciones de iones del analito. 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 por el electrolito, denominado supresor. Su fin es reemplazar los iones iniciales del eluyente por otros de conductividad más baja.

El modelo más simple de supresor consiste en una columna de tipo intercambiador de iones. El ejemplo siguiente explica el mecanismo de acción de un supresor que contiene una fase estacionaria con agrupamientos funcionales de carga opuesta a los de la columna de separación.

2.6.10 Integrador

Generalmente el detector se conecta a un registrador o integrador, un sistema que cambia la señal analógica del detector a una digital.

Al terminar la elución, el aparato ha informado de los picos obtenidos, los tiempos de retención, la altura o áreas bajo el pico, anchura de pico, altura o área total y el porcentaje de cada pico. De esta manera la información puede almacenarse o reconfigurarse según las necesidades del analista y el integrador puede estar, a su vez, en serie a una computadora con un software variado que da mucha más flexibilidad a la información obtenida, con la posibilidad de cruzarla u organizarla.

2.7 Métodos analíticos

2.7.1 Definición ⁵

El método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra. El método debe incluir, entre otras cosas: las especificaciones de los instrumentos y de los equipos;

las características del material a analizar, incluidas las condiciones de almacenamiento; las listas de los reactivos utilizados, su procedencia comercial, descripción detallada de los pasos para la preparación de las disoluciones, así como de la secuencia de trabajo, especialmente los pasos críticos, cualquier precaución en el manejo de muestras y su preparación, el intervalo de concentraciones de trabajo de los analitos en una muestra para que pueda aplicarse el método sin modificación.

2.7.2 Recopilación de información ⁶

Para proponer un nuevo método de análisis o seleccionar uno ya conocido, es necesario hacer uso de las propiedades físicas y químicas correspondientes a la estructura y la composición del analito (componente específico de una muestra a medir en un análisis).

Por lo tanto, el primer paso para el desarrollo de un método, es la recopilación de la información disponible, propiedades físicas y químicas, del o los componentes a analizar. En función de esta información, se propondrán técnicas de separación y analíticas que permitan determinar al analito de interés.

2.7.3 Elección del método de análisis

La elección de un método de análisis, depende del propósito de la valoración, ya sea cuantitativa o cualitativa, y de la complejidad de la muestra. Sin embargo, los parámetros más determinantes en el desarrollo de un método son: la cantidad y pureza del compuesto a analizar, recursos económicos y las técnicas instrumentales disponibles. El mejor método de análisis será el más sencillo que posea la sensibilidad que se requiere, por ejemplo, en estudios de estabilidad se requiere detectar pequeños cambios de señal que pueden ser significativos a lo largo del tiempo.

Un método de análisis puede ser muy sencillo para una sustancia pura, pero inaplicable a una muestra compleja. El objetivo de contar con una técnica de separación es llevar a cabo una preparación previa de la muestra, para aislar el

compuesto de interés de la mayoría de sustancias presentes en la matriz, para eliminar interferencias en su determinación.

2.8 Validación de métodos analíticos

Una vez seleccionado el método analítico se debe asegurar su confiabilidad para uso rutinario; por lo que es necesario llevar a cabo la validación y así establecer si satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico, se recomienda que los datos analíticos sean sometidos a algún criterio de aceptación, con el objetivo de garantizar que son los que habría que esperar. Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en el pueda tomarse con confianza. El término validación se puede definir como:

- ✓ El proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico en particular (EURACHEM, 2005).
- ✓ El proceso establecido para la obtención de pruebas documentales y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto, dentro de intervalos o parámetros definidos, y para el propósito requerido (CONACyT, 2010).
- ✓ Es una adaptación específica de una teoría analítica para un propósito de medición seleccionado, es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestre científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas (EMA, CENAM, 2008).

La validación de un método, es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado, por lo que es

necesario evaluar los parámetros de: exactitud, precisión, especificidad, límites de detección y de cuantificación, linealidad y estabilidad de la muestra.

2.8.1 Estabilidad de la muestra

La estabilidad es la propiedad de una muestra de conservar su integridad fisicoquímica y concentración de la sustancia de interés después de almacenarse, bajo condiciones específicas, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Se determina a partir de la comparación de los resultados de análisis iniciales con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer almacenadas por un tiempo determinado en diferentes condiciones. En este parámetro se evalúa la concentración del compuesto por analizar en la matriz real, al menos por duplicado, y a tres niveles de concentración dentro del intervalo de trabajo. Para que él o los compuestos de interés se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad del método.

2.8.2 Linealidad

Es la capacidad de un método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la cantidad del compuesto en una muestra, comprendido entre el nivel de concentración superior e inferior del compuesto. En este parámetro se define un modelo que describe la relación matemática entre la concentración y la respuesta; esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del intervalo de concentración. La amplitud del intervalo dependerá de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar y las aplicaciones del método (control de calidad, estudios de estabilidad, disolución, impurezas, etc.).

2.8.3 Intervalo lineal

Se infiere que es el intervalo de concentraciones del analito sobre las cuales el método proporciona resultados de pruebas proporcionales a la concentración del analito.

2.8.4 Intervalo de trabajo

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito sobre los cuales el método puede aplicarse, siendo esta definición brindada para el intervalo de trabajo.

2.8.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja del analito que puede ser determinada, con un nivel aceptable de confianza, de repetibilidad y veracidad. En general, los límites de cuantificación son características de desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición para “cuantificar” adecuadamente un analito. Se define como:

$$\text{Límite de cuantificación} = y_B + 10s_B \quad \text{Ec. 2.13}$$

Donde y_B , es la ordenada al origen de la curva de calibración. Y, s_B , es la desviación estándar.

2.8.5 Límite de detección

En términos generales, el límite de detección (LOD) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente a la del “blanco” o del “ruido de fondo”.

Se define como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, s_B :

$$\text{Límite de detección} = y_B + 3s_B \quad \text{Ec. 2.14}$$

2.8.6 Exactitud

La Organización Internacional de Estándares (ISO) define a la exactitud como “el grado de concordancia entre el resultado en un ensayo y el valor de referencia aceptado del analito”. Bajo esta definición, la exactitud de un resultado individual puede estar afectada por dos tipos de errores: aleatorios y sistemáticos. (ISO 8404:1994)

Sin embargo, otra definición brindada por el Vocabulario Internacional de Metrología dice que la exactitud de medida se interpreta como la proximidad entre los valores medidos atribuidos al mensurando. (Vocabulario Internacional de Metrología, 2009)

El concepto “exactitud de medida” no es una magnitud y no se expresa numéricamente. Se dice que una medición es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida (CENAM, 2016).

La exactitud se reporta como porcentaje de error, y se calcula como:

$$\% \text{ error} = \frac{\text{Concentración}_{\text{teórica}} - \text{Concentración}_{\text{experimental}}}{\text{Concentración}_{\text{teórica}}} * 100 \quad \text{Ec. 2.15}$$

2.8.7 Precisión

Es la proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas. Las “condiciones especificadas” pueden ser condiciones de repetibilidad, suelen ser establecidas por el analista y se relaciona con las condiciones de análisis para asegurar la reproducibilidad y precisión del análisis (norma ISO 5725-3:1994).

Es habitual que la precisión de una medida se exprese numéricamente, bajo las condiciones especificadas, mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación.

La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero. La medida de la precisión generalmente se expresa en términos del coeficiente de variación (CV) y se calcula como:

$$\%CV = \%DR = 100 \frac{s}{x} \quad \text{Ec. 2.16}$$

Donde:

- %CV es el coeficiente de variación porcentual
- %DR significa desviación estándar relativa porcentual

- s , es la desviación estándar de los valores de x_i
- \bar{x} es el promedio de los valores de x_i

Las medidas de precisión más comunes son las “repetibilidad” y la “reproducibilidad”.

2.8.8 Repetibilidad

Es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando realizadas bajo las mismas condiciones de medición.

Es la precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.

2.8.9 Reproducibilidad

Es la precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos.

2.8.10 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. Si el método involucra extracciones, es obligatorio evaluar la recuperación, para lo cual se analizan muestras puras y enriquecidas a diferentes concentraciones. La recuperación (R) se calcula como:

$$\% R = \frac{(CF-CU)}{CA} * 100 \quad \text{Ec. 2.17}$$

Donde CF es la concentración de analito en la muestra fortificada; CU es la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar; CA es la concentración

de analito acidionado, (valor medido, no determinado por el método) en la muestra fortificada.

Por último, en la tabla 2.1 se enuncian los parámetros necesarios para realizar una validación dependiendo de la técnica a utilizar.

Tabla 2.1. Parámetros recomendados a evaluar según el tipo de método de análisis a utilizar. (CCAyAC, 2011).

Parámetro de desempeño	Tipo de prueba					
	Espectrofotometría	Cromatografía	Potenciometría	Volumetría	Gavimetría	Física
Intervalo lineal y de trabajo	Si	Si	Si	Si	Si	No
Límite de detección	Si ^a	Si ^a	No	No	No	Si ^b
Límite de cuantificación	Si ^a	Si ^a	Si ^a	Si ^a	Si ^a	No
Recuperación	Si	Si	No	Si	Si	No
Sesgo	Si	Si	Si	Si	Si	No
Repetibilidad	Si	Si	Si	Si	Si	Si ^c
Reproducibilidad	Si	Si	Si	Si	Si	Si ^c
Incertidumbre	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Sensibilidad	Si ^d	Si ^d	Si ^{d,e}	Si ^e	Si ^d	No
Selectividad	Si ^d	Si ^d	Si ^{d,e}	Si	Si	Si ^b
Robustez	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d

^a Análisis a nivel de trazas (ppm, ppb, ppt), ^b Sólo métodos cuantitativos, ^c Sólo métodos cuantitativos, ^d Sólo aplica para métodos no normalizados, ^e Sólo para en análisis de aniones y cationes por ion selectivo.



CAPÍTULO III

EXPERIMENTACIÓN

3.1 Instrumentación

3.1.1 Equipo y materiales

- Cromatógrafo de líquidos constituido de dos bombas binarias modelo 1525, un automuestreador modelo 717 plus y un detector de conductividad modelo 432, todos de la marca Waters.
- Columna analítica IC-Pak Anion HR marca Waters®, de 4.6 x 75 mm, empacada con partículas de 5 µm de diámetro.
- Purificador y desionizador de agua, Milli-Q modelo 185 de Millipore.
- Balanza analítica con capacidad máxima de 210 g y con precisión de 0.1 mg, modelo Explorer de la marca OHAUS.
- Viales de vidrio transparente para cromatógrafo de la marca Waters de capacidad de 1 mL.
- Micropipetas marca Rainin Classic de 20- 200, 100-1000 µL y 500- 5000 µL.
- Filtros de nylon para jeringa de tamaño de poro de 0.45 µg marca Sartorius
- Jeringas de plástico
- Matraces aforados

3.1.2 Reactivos y disolventes

- Solución de referencia analítica multielemental High-purity standards acreditado por ISO/IEC 17025 Guide 34 que contiene: Cl^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} en agua, en una concentración equivalente a (100 ± 1) mg/L de cada anión.
- Acetonitrilo CHROMASOLV® Plus, grado CLAR ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich.
- Metanol CHROMASOLV® Plus, grado CLAR ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich.
- Agua ultrapura, resistividad 18.2 mΩ·cm a 25°C.
- Butanol CHROMASOLV® Plus, grado CLAR ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich.
- Ácido bórico, Aldrich, grado reactivo, ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich.
- Glicerina, grado reactivo, ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich.

- Tetraborato de sodio, grado reactivo, ($\geq 99\%$), Sigma.
- Gluconato de sodio, grado reactivo, ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich.
- Bicarbonato de sodio, grado reactivo, ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich.

3.2 Desarrollo del método cromatográfico

3.2.1 Condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de HCO_3^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}

El primer paso consistió en la determinación y optimización de las condiciones cromatográficas de trabajo. Para este caso se seleccionó como fase estacionaria una columna IC-Pak Anion HR marca Waters®, empacada con partículas de 5 μm de tamaño, de tipo amino. Se trabajó con una fase móvil constituida de una mezcla de acetonitrilo, butanol y una disolución de un concentrado de gluconato/borato de sodio, a un flujo de 1 mL/min en modo isocrático. El volumen de muestra inyectado al cromatógrafo fue de 10 μL , con una duración del análisis de aproximadamente 15 minutos.

3.2.2 Preparación de la fase móvil

La composición de la fase móvil de trabajo es la siguiente: 2% de butanol, 2% concentrado gluconato/borato de sodio y 12% de acetonitrilo en agua ultrapura. A continuación, se describe el procedimiento para la preparación de 1 L de fase móvil.

- Concentrado gluconato/borato de sodio

La composición de este concentrado es el siguiente: 1.6 % de gluconato de sodio, 1.8 % de ácido bórico, 2.5 % tetraborato hidratado de sodio y 25 % de glicerol en agua ultrapura de 18.2 m Ω ·cm de resistividad a 25°C. Primeramente se pesaron aproximadamente 1.8 g de ácido bórico, 1.6 g de gluconato de sodio y 25 g de tetraborato deshidratado de sodio, a continuación se disuelve cada una de las sales en agua con la ayuda de un agitador magnético, las disoluciones resultantes se transfieren cuantitativamente a un matraz de 1 L y se afora con agua ultrapura. La

mezcla final se hace pasar por un sistema de filtración utilizando una membrana de 0.45 micras.

- Fase móvil

En un matraz aforado se agregaron aproximadamente 250 mL de agua ultrapura, seguidamente se adicionaron 120 mL de acetonitrilo, 20 mL de butanol y 20 mL del concentrado de gluconato/borato de sodio, la mezcla resultante se lleva a la marca del aforo con agua ultrapura y se homogeniza por agitación.

3.2.3 Preparación de las disoluciones de referencia para las curvas de calibración

Todos los estándares de los distintos niveles de concentración que contienen Cl^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} fueron derivadas de la solución de referencia trazable al NIST, utilizando el volumen necesario para obtener una concentración equivalente a 100 mg/L de cada anión de trabajo.

En cuanto a bicarbonato, en el laboratorio se preparó una solución referencia con una concentración aproximada de 1000 mg de HCO_3^- /L a partir de bicarbonato de sodio grado reactivo analítico, para lo cual se pesó aproximadamente 0.685 g de bicarbonato de sodio y se llevó a un volumen de 500 mL.

3.3 Validación del método cromatográfico

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas del análisis, se procedió con la obtención de los parámetros típicos de una validación analítica: intervalo lineal y de trabajo, exactitud, precisión, robustez y límites de detección y de cuantificación.

3.3.1 Intervalo lineal y de trabajo

Se propusieron 12 niveles de concentración para cada ion. En el caso de cloruro, bromuro, nitrato, fosfato y sulfato, se seleccionaron los siguientes: 1, 5, 7.5, 10, 15, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100 mg/L, mientras que para el ion bicarbonato fueron: 50,

100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 1000 mg/L. Se hicieron diluciones a partir de las soluciones patrón, descritas en el punto 3.2.3. Cada nivel fue preparado y analizado por triplicado.

3.3.2 Precisión

Para cada analito se eligieron tres niveles de concentración, para los iones cloruro y sulfato se eligieron 1, 50 y 70 mg/L, para bromuro, nitrato y fosfato se trabajó con 5, 50 y 70 mg/L, mientras que para el bicarbonato se tomaron los niveles de concentración de 50, 200 y 500 mg/L. Cada nivel de concentración fue preparado por triplicado de manera independiente y analizado también por triplicado. El análisis de datos se realizó mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variabilidad (%CV).

3.3.3 Exactitud

El parámetro de exactitud instrumental fue determinado para tres niveles de concentración. Se propusieron para cloruro, bromuro, nitrato, fosfato y sulfato, las concentraciones de 10, 40 y 80 mg/L, mientras que para el bicarbonato se decidió trabajar con los niveles de 100, 300 y 1000 mg/L. Con los parámetros de regresión calculados de las curvas de calibración, pendiente y ordenada, se determinaron las concentraciones de cada anión en cada estándar y éstas se compararon con el valor conocido. La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de error. Todos los niveles de concentración de trabajo fueron preparados de manera independiente y analizados también por triplicado.

3.3.4 Limite de cuantificación

Para la determinación del LOQ de cloruro y sulfato se utilizó una disolución que contenía 0.5 mg/L, para los iones bromuro, nitrato y fosfato se utilizó una disolución de 1 mg/L, mientras que para el ion bicarbonato se trabajó con una disolución de 5 mg/L. Cada una de las disoluciones que contenía a los analitos de interés, en las concentraciones anteriormente descritas, fue preparada de manera independiente por septuplicado y analizada por el método cromatográfico propuesto. El valor para

cada anión fue determinado de acuerdo a lo establecido por Miller y Miller (ec. 2.13). Finalmente, con las ecuaciones de la curva de regresión obtenidas para cada analito de estudio, se calculó el límite de cuantificación en unidades de concentración para cada uno de los aniones.

3.3.5 Limite de detección (LOD)

Se realizó el mismo procedimiento experimental que el reportado para el límite de cuantificación. Con los valores de área determinados se calcularon la media y su desviación estándar. El límite de detección se calculó con respecto a lo establecido por Miller y Miller (ec. 2.14). Posteriormente, con la ecuación de regresión obtenida para cada analito se calculó el límite de detección en unidades de concentración.

3.4 Aplicación del método cromatográfico

3.4.1 Recobros

Se realizó la fortificación de 26 muestras de agua residual provenientes del Valle del Mezquital con una concentración equivalente a 10 mg/L para cloruro, bromuro, nitrato, fosfato y sulfato, y de 250 mg/L para el bicarbonato. Se prepararon tres fortificados de cada muestra. Para realizar los cálculos de recobro, en cuanto a procedimiento experimental, fue necesario hacer lo siguiente:

- a. Primeramente, se cuantificó el contenido de los aniones de interés en las 26 muestras reales, considerando los factores de dilución a los cuales fueron sometidas. Para esto se tomó un volumen de 720 μL de muestra y se le agregaron 80 μL de agua desionizada, la mezcla fue homogeneizada y posteriormente analizada con el método propuesto. Cada muestra se preparó por triplicado.
- b. Posteriormente, las muestras de trabajo fueron fortificadas con las concentraciones de los aniones anteriormente descritas, el procedimiento de fortificación consistió en tomar 720 μL de muestra y adicionarle 80 μL del multireferencia de aniones de trabajo, para tener una fortificación equivalente

a 10 mg/L de cloruro, bromuro, nitrato, fosfato y sulfato, y de 250 mg/L para bicarbonato. La mezcla obtenida fue homogenizada y posteriormente analizada con el método propuesto.

- c. Finalmente, a la señal del área de la muestra fortificada, se le restó la señal obtenida en la muestra sin adicionar, y con ayuda de las ecuaciones de regresión de las respectivas curvas de calibración de los seis aniones de trabajo, se obtuvieron las concentraciones en las muestras fortificadas (concentraciones determinadas), las cuales fueron posteriormente comparadas con los valores de concentración utilizados para la fortificación de cada anión (concentración teórica).

3.4.2 Descripción y conservación de las muestras de trabajo

Las muestras de agua residual utilizadas para realizar los experimentos de fortificación, fueron tomadas en el canal de riego en Las Palmas (LPC N 20°07'50'', W 099°12'31'') (Fig. 3.1), en la localidad de Tlahuelilpan, en el centro del Valle del Mezquital en el estado de Hidalgo, localizada aproximadamente a 80 km al Norte de la Ciudad de México.

Para llevar a cabo el muestreo (realizado para cada una de las muestras), primero se enjuagó el recipiente muestreador en tres ocasiones, después con este mismo recipiente se extrajo la muestra, posteriormente se transfirió la muestra del recipiente muestreador a un recipiente de polipropileno con capacidad para 50 mL haciéndola pasar a través de un filtro Sterivex®-HV de 0.45 µm. Cada recipiente fue sellado herméticamente y etiquetado debidamente (número de muestra, fecha y hora de muestreo, punto de muestreo), y finalmente fueron conservadas en hieleras para garantizar su integridad hasta su llegada al laboratorio, en donde fueron colocadas bajo refrigeración a 4 °C hasta su posterior análisis.

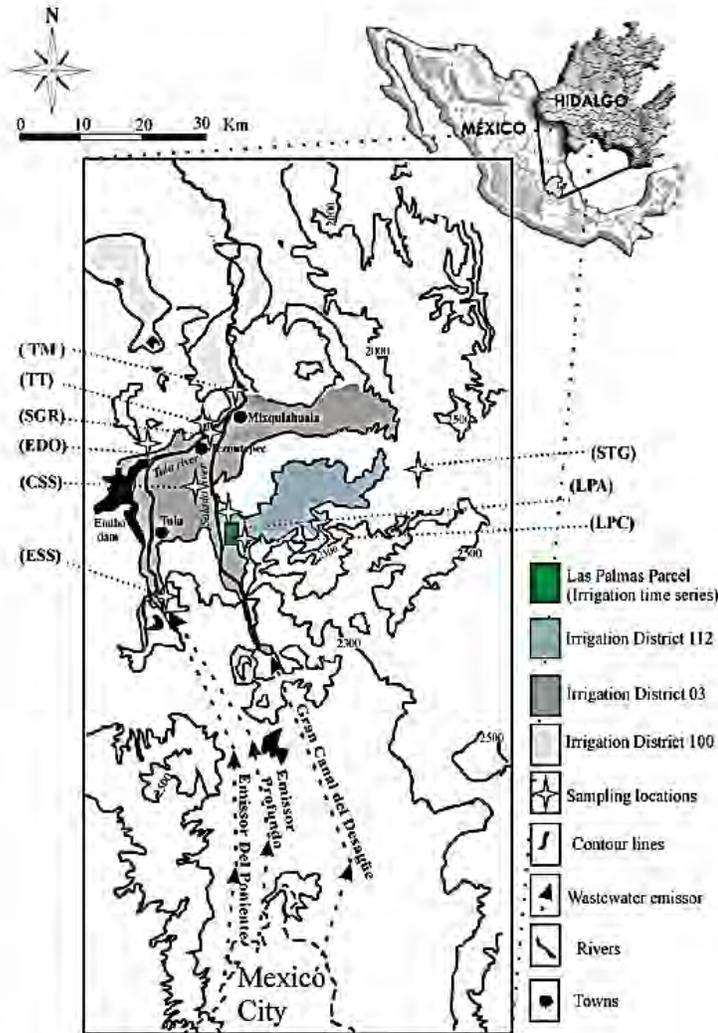


Figura 3.1. Localización de los sitios de muestreo de agua residual del canal de riego en Las Palmas, LPC (Imagen tomada de Guédron et. al. 2014).



CAPÍTULO IV.

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

4.1 Desarrollo del método cromatográfico

4.1.1 Condiciones cromatográficas²¹

De acuerdo con la naturaleza de los analitos, se trabajó con la técnica de cromatografía de intercambio iónico, con una fase estacionaria que lograra separar aniones, es por ello que se trabajó con una columna empacada con partículas que contienen grupos funcionales amino. En cuanto a la fase móvil, se siguió la recomendación indicada por el manual de uso del detector de conductividad Waters modelo 432, el cual toma en cuenta la estabilidad de los analitos en la muestra. En la siguiente tabla se resumen los parámetros utilizados para el desarrollo de la metodología propuesta.

Tabla 4.1. Condiciones de trabajo del método propuesto.

Parámetro	Descripción
Fase móvil	2% de butanol, 2% concentrado gluconato/borato de sodio, 12% acetonitrilo en agua ultrapura.
Fase estacionaria	IC-Pak Anion HR marca Waters®, (75 x 4.6 mm) empacada con partículas de 5 µm de tamaño
Flujo	1 mL/min
Modo de trabajo	Elución isocrática
Tiempo de análisis	15 min
Volumen de muestra inyectado	10 µL

4.1.2 Parámetros cromatográficos

Con el fin de verificar que las condiciones previamente establecidas fueran adecuadas para la separación, se determinaron los parámetros cromatográficos del sistema. En la figura 4.1 se presenta la respuesta obtenida en función del tiempo, al analizar una sustancia de referencia que contenía 100 mg/L de cada uno de los

analitos de trabajo (cromatograma), donde se muestra su orden de elución de cada uno de los aniones presentes en el estándar.

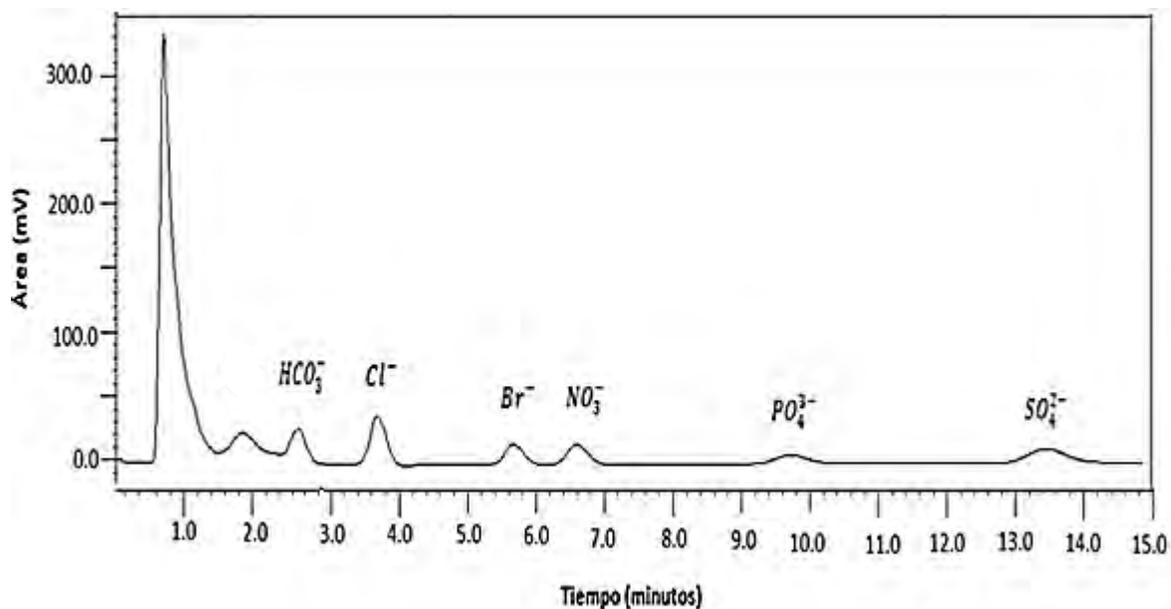


Figura 4.1. Cromatograma obtenido con las condiciones de trabajo para una concentración de 100 mg/L de cada anión de interés.

Analizando el cromatograma de la figura 4.1, el cual fue obtenido al utilizar las condiciones ya mencionadas, se encontró que el ion bicarbonato presenta un tiempo de retención de 2.8 min, el cloruro de 3.5 min, mientras que los aniones bromuro, nitrato, fosfato y sulfato presentan un tiempo de retención de 5.6, 6.6, 9.8 y 13.7 min respectivamente. La perturbación que se presenta alrededor del primer minuto se considera como el tiempo muerto del sistema.

El orden de elución está relacionado con el tamaño, la carga de la especie y la interacción que tiene con la fase móvil y la fase estacionaria. Este comportamiento se relaciona con el coeficiente de capacidad que indica que, a un menor valor de factor de capacidad (k'), la interacción del anión con la fase estacionaria es menor, por lo que se obtiene un tiempo de retención pequeño, en la tabla 4.2 se muestran los valores obtenidos de k' para los analitos de interés. Con relación al tamaño del radio iónico solvatado, se observa que, al ser más grande, el tiempo de retención

es mayor. Por último, la carga sigue el mismo comportamiento ya que si ésta es mayor, el tiempo de retención también lo hace. Como ya se indicó en la figura 4.1, el orden de elución queda de la siguiente manera: $HCO_3^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > PO_4^{3-} > SO_4^{2-}$.

Tabla 4.2. Parámetros cromatográficos del método desarrollado.

Analito	Parámetro								
	t_R (min)	t'_R (min)	k'	α		R_s		N	H (mm)
HCO_3^-	2,8	1,8	1,8	1,4		1,0		1225	0,06
Cl^-	3,5	2,5	2,5					1,8	
Br^-	5,6	4,6	4,6	1,2		1,3	2007		
NO_3^-	6,6	5,6	5,6				1,6		3,5
PO_4^{3-}	9,8	8,8	8,8	1,4		3,4			
SO_4^{2-}	13,7	12,7	12,7						

En la tabla anterior se muestran los valores de la evaluación de los parámetros cromatográficos, la FDA (FDA, CDER, 1994) recomienda que, al validar una metodología para cromatografía de líquidos de alta resolución, el valor del factor de capacidad (k') debe ser mayor a 2. En la tabla se puede observar que los valores de k' obtenidos de casi todos los aniones de estudio son mayores a 2, con excepción del ion bicarbonato que presenta un valor ligeramente menor (1.8), sin embargo, cuando se observa el cromatograma presentado como figura 4.1, es evidente que el bicarbonato no eluye cerca del tiempo muerto, por lo que se cumple con el criterio de k' establecido por la FDA. El grado de interacción entre los aniones de interés y la fase estacionaria se verifica a través del factor de capacidad, en cuanto más grande éste sea, el anión será más retenido por la fase estacionaria, siendo en este caso el sulfato, el analito más retenido.

En cuanto a la resolución, los valores recomendados por la FDA para la validación de una metodología de CLAR es que este parámetro debe ser mayor o igual a la unidad para los dos picos más comprometidos, para esta separación los analitos que eluyen de manera más cercana son el bicarbonato y el cloruro, que presentan un valor de $R_s=1.0$, por lo que la separación es aceptable. La resolución da información sobre el grado de separación entre dos picos y entre mayor sea su valor, mejor será la separación entre ellos. A partir de los valores que se presentan en la tabla anterior, se puede observar que para tener un análisis de 15 minutos y una columna de tan solo 75 mm de longitud, los valores de resolución obtenidos son aceptables y cumplen el criterio para continuar con la validación, ya que todos los valores de R_s son ≥ 1 .

Al realizar el análisis de la eficiencia de la columna, se obtuvieron el número de platos teóricos (N). La FDA recomienda que este valor debe ser mayor a 2000 para columnas de alta resolución. Para los aniones bicarbonato, cloruro, fosfato y sulfato se observa que el valor de N es menor que el indicado por la FDA para un sistema de cromatografía de líquidos, sin embargo, debido a que la columna utilizada es de intercambio iónico con un tamaño de partícula de 5 micras y dado que la tecnología de obtención de éstas siempre produce columnas menos eficientes que las típicas de HPLC se puede considerar que son valores aceptables. Este parámetro cromatográfico tiene una estrecha relación con la eficiencia de la columna, al igual que la altura de un plato teórico (H), los valores de N pueden estar afectados por varios factores, entre ellos la longitud de la columna y su tiempo de vida. Se observa que para la determinación se obtienen valores para todos los analitos, los tiempos de retención se respetan y hay buena resolución entre los picos. En cuanto a los valores obtenidos de H, se observa que son similares y pequeños ya que son cercanos a cero, la recomendación de la CCAYAC (2011) en cuanto a este valor es que entre más cercano esté de cero es mejor, ya que a valores pequeños de H, los picos generados son más estrechos, con lo que se obtienen mejores separaciones.

4.2 Validación de la metodología propuesta

4.2.1 Evaluación del blanco de trabajo

Como primer paso se realizó el análisis de un blanco con el sistema cromatográfico propuesto, el cual sólo contenía agua ultrapura con $18.2 \text{ m}\Omega \cdot \text{cm}$ de resistividad a 25°C . El cromatograma obtenido se presenta en la figura 4.2, este paso se realizó para revisar la ausencia de los analitos de estudio y de interferencias en esta matriz.

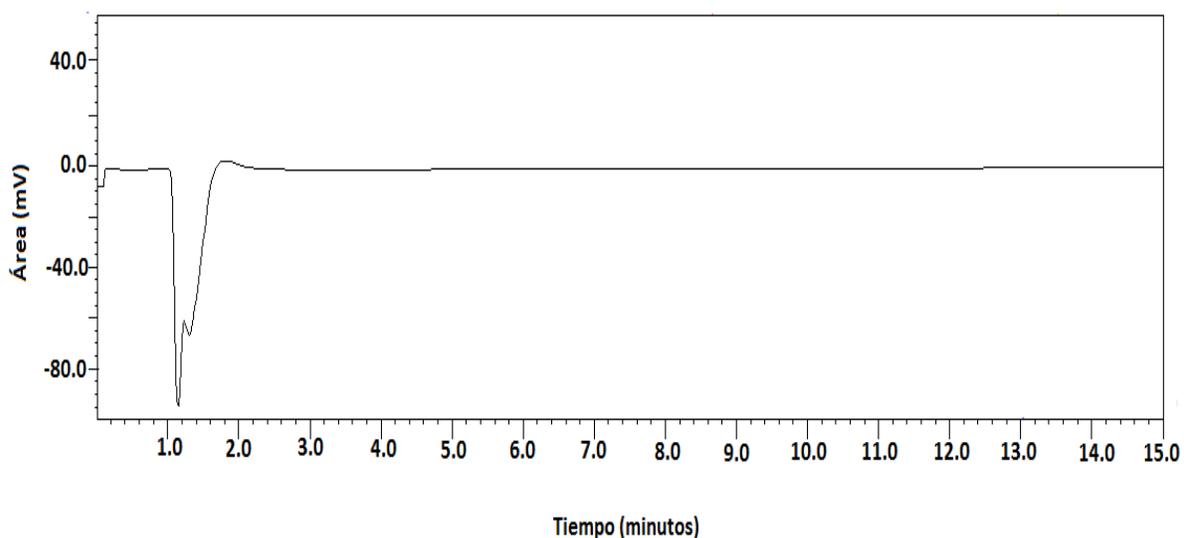


Figura 4.2. Cromatograma del blanco de trabajo obtenido bajo las condiciones óptimas de trabajo.

En la figura anterior, se puede apreciar el cromatograma obtenido realizar la inyección de $10 \mu\text{L}$ de agua ultrapura (disolución blanco), la cual es la que se utilizó para hacer la serie de diluciones y repeticiones necesarias para el desarrollo del presente trabajo. No se observaron señales en el cromatograma, indicando que no existen interferencias significativas en cuanto a los aniones de estudio, por ello se prosiguió con la evaluación de los intervalos de trabajo y lineal.

4.2.2 Intervalo lineal

Para la evaluación de este parámetro de validación, se prepararon estándares en 12 niveles de concentración, dichos estándares contenían a los seis aniones de estudio. Cabe mencionar que cada disolución se preparó por triplicado, de manera independiente, por lo que se obtuvieron 36 cromatogramas para la evaluación de este parámetro. En la figura 4.3 se muestra el resultado obtenido al inyectar un multiestándar de cada nivel de concentración. Como se puede observar no se presentan problemas de traslapamiento de señales para los niveles de concentración de estudio.

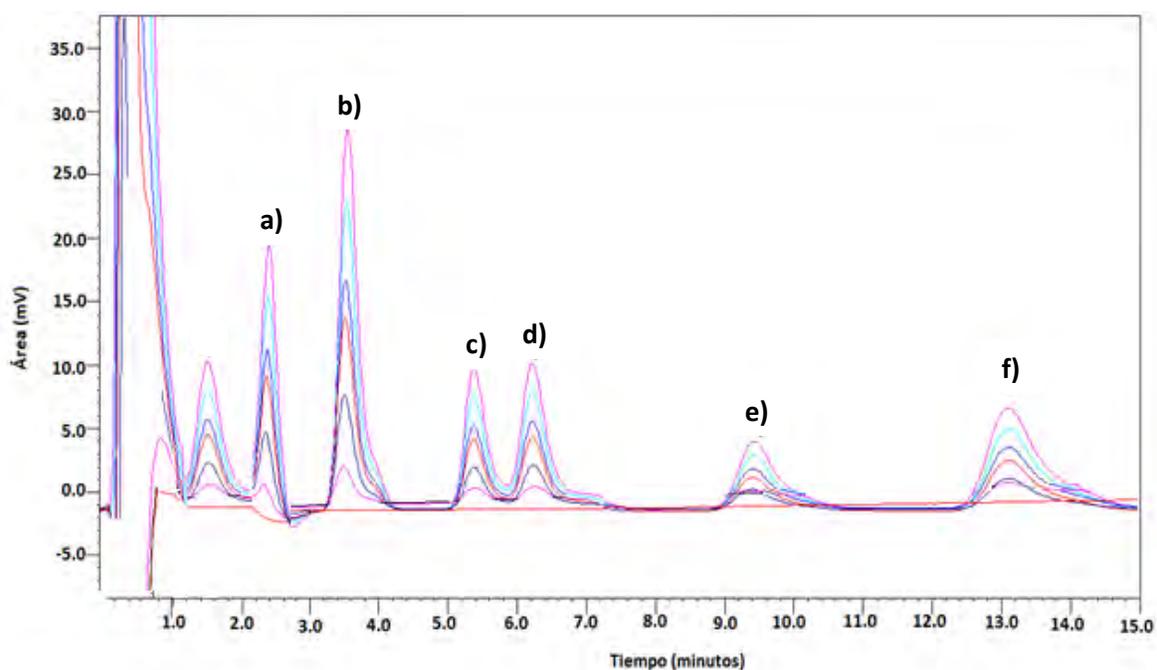


Figura 4.3. Cromatogramas de las curvas de calibración. Cada uno de los picos representan los aniones de estudio, donde: a) bicarbonato, b) cloruro, c) bromuro, d) nitrato, e) fosfato y f) sulfato.

A partir de los cromatogramas obtenidos para cada nivel de concentración, se procedió a integrar el área bajo la curva del pico correspondiente a cada analito, se

construyó el gráfico de calibración a partir de la respuesta obtenida por el detector en función de la concentración correspondiente en mg/L, obteniendo así las curvas de calibración para cada anión. Posteriormente se realizó el análisis de regresión lineal para todas las parejas de datos, concentración vs señal obtenida (área de pico), para $n=3$. En las figuras 4.4, 4.5 y 4.6 se muestran las curvas de calibración obtenidas para los 6 aniones de estudio.

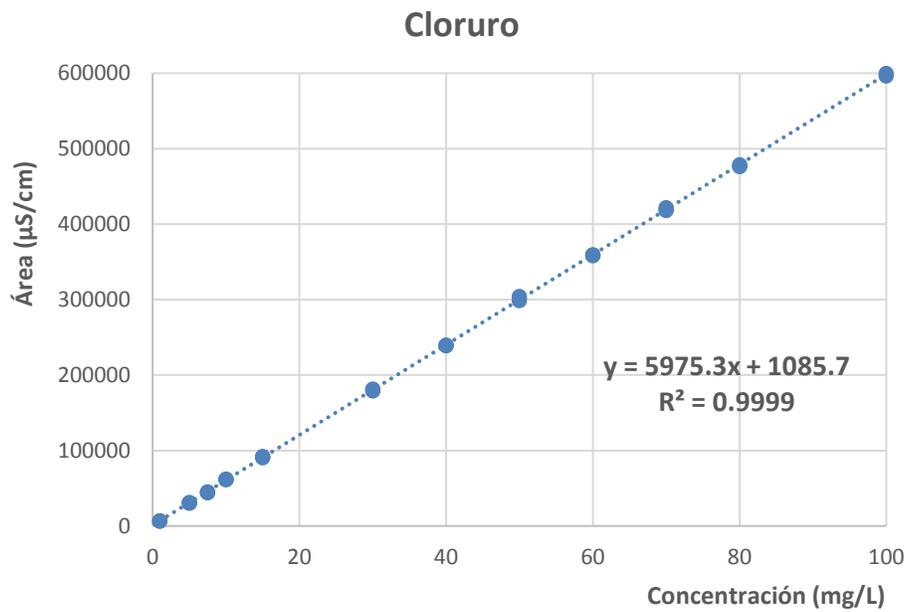
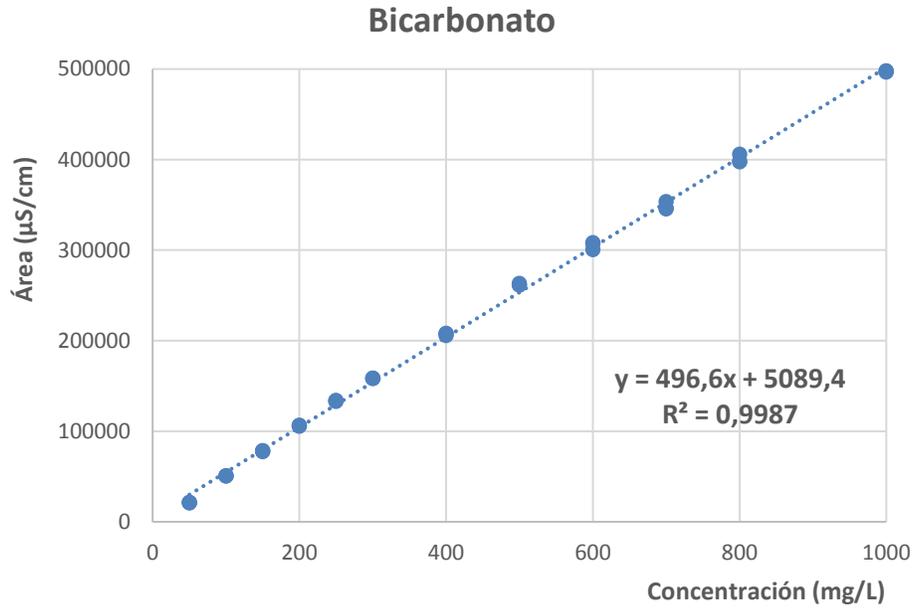


Figura 4.4. Curvas de calibración de los aniones bicarbonato (arriba) y cloruro (abajo).

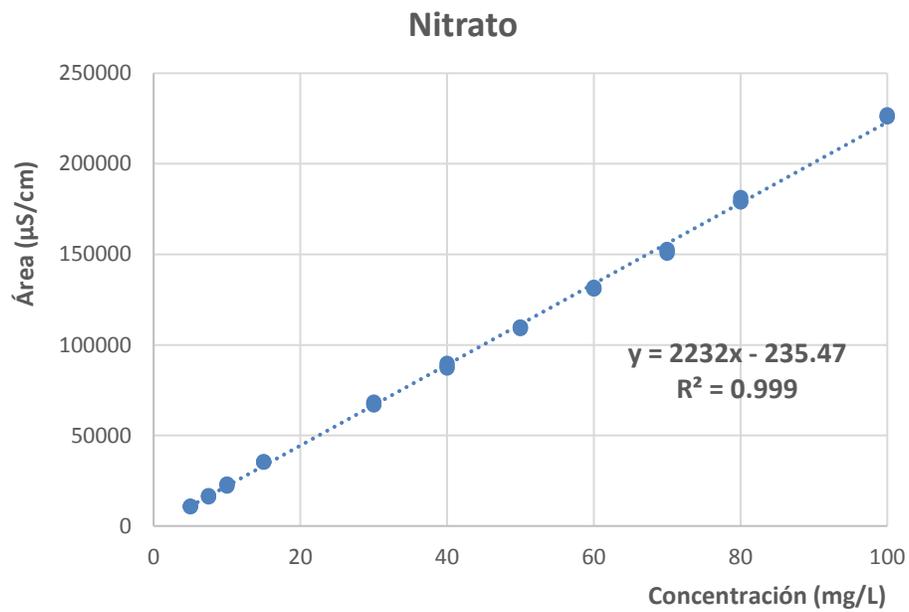
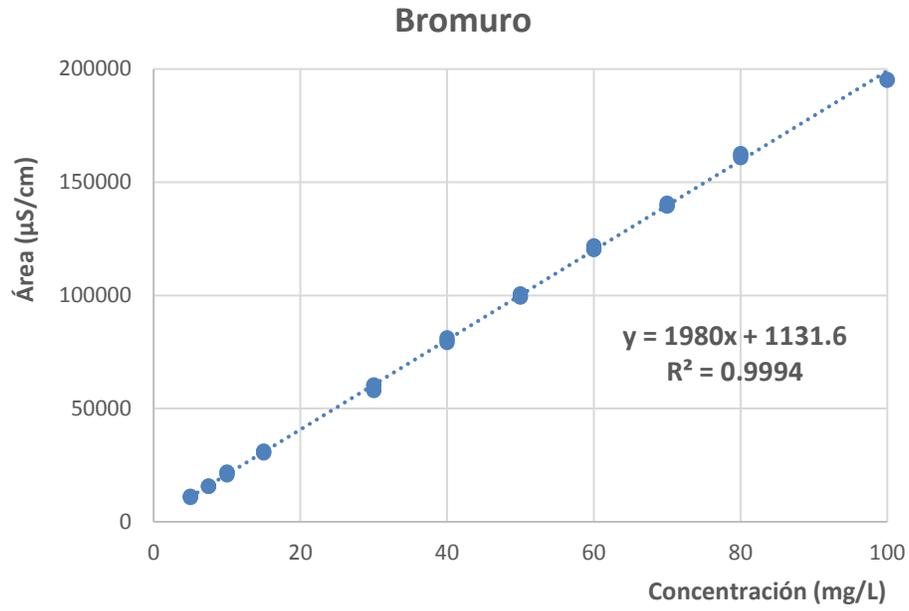


Figura 4.5. Curvas de calibración de los aniones bromuro (arriba) y nitrato (abajo).

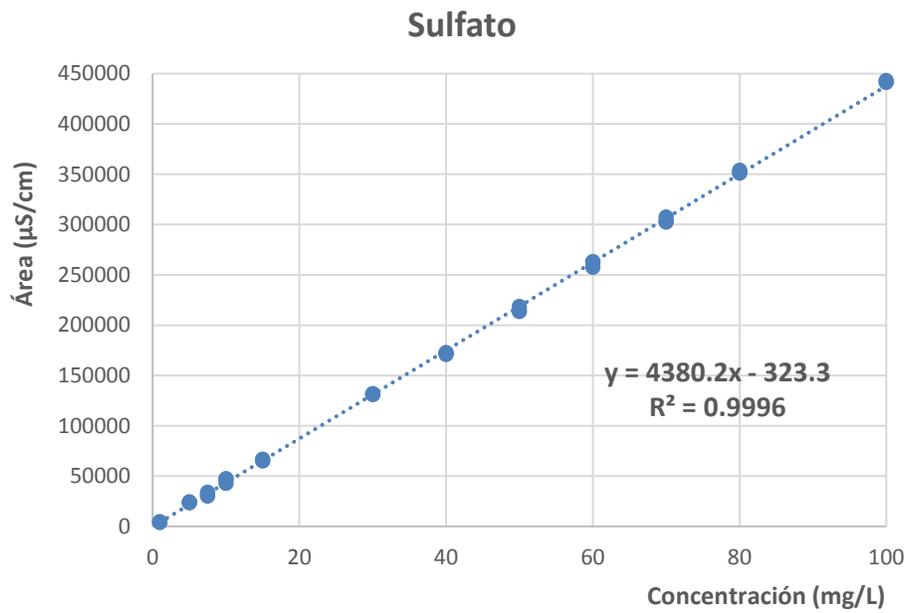
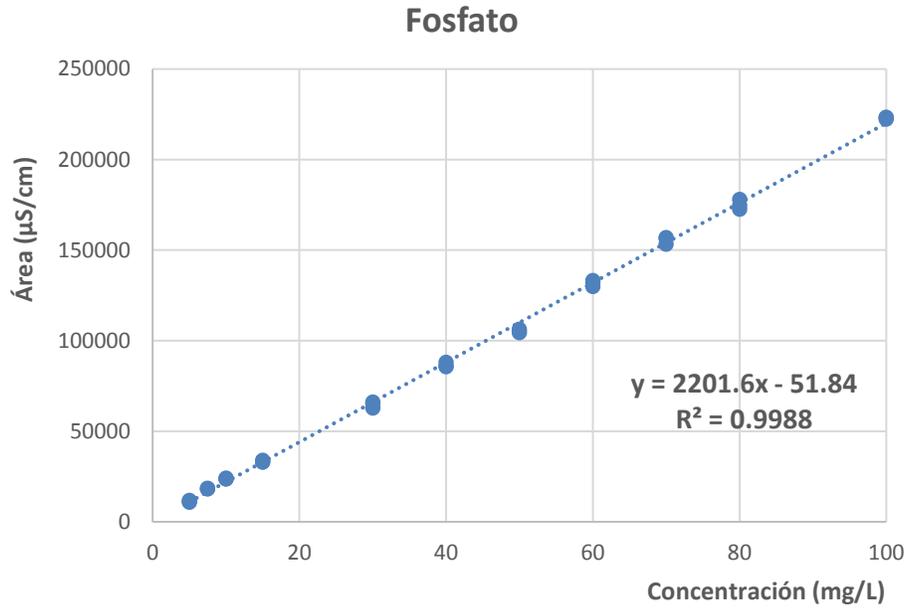


Figura 4.6. Curvas de calibración de los aniones fosfato (arriba) y sulfato (abajo).

En la tabla 4.3 se muestran los parámetros de intervalo lineal para cada anión de estudio y los resultados del análisis de regresión, como son: el valor de la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación de las curvas obtenidas para cada analito.

Tabla 4.3. Resultados del análisis de regresión lineal para los seis aniones de estudio.

Analito	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)	Coefficiente de correlación (r)	Intervalo lineal (mg/L)
HCO₃⁻	496.6 ± 6.1	5100 ± 3100	0.9993	50-1000
Cl⁻	5975 ± 16	1090 ± 790	0.9999	1-100
Br⁻	1980 ± 17	1130 ± 910	0.9997	5-100
NO₃⁻	2232 ± 26	-236 ± 1400	0.9995	5-100
PO₄³⁻	2202 ± 27	-100 ± 1400	0.9994	5-100
SO₄²⁻	4380 ± 31	300 ± 1500	0.9998	1-100

Los resultados muestran las ecuaciones de cada una de las curvas de calibración obtenidas. Como criterio de aceptación del intervalo lineal se debe verificar que el coeficiente de correlación (r), obtenido mediante la regresión de la recta, sea mayor o igual a 0.999, por lo que verificando los resultados obtenidos se puede afirmar que se cumple con este parámetro. Y dado que los valores obtenidos de r son cercanos a uno y el análisis visual de las curvas así lo indican, se puede decir que se tiene una respuesta lineal de la señal analítica en función de la concentración presente de los analitos de estudio, en los intervalos de concentración establecidos. En todos los casos, el valor de la pendiente (m) de la recta es mayor a cero, lo que indica que el detector es sensible a los cambios de concentración. Analizando los valores de pendiente de cada ecuación y teniendo en cuenta que, a mayor valor de pendiente, se aumenta la sensibilidad para la determinación del analito de interés también aumenta, se

tiene que el cloruro es el ion que se puede cuantificar en concentraciones más bajas, mientras que el bicarbonato al presentar el menor valor de pendiente, exhibe la menor sensibilidad de los seis analitos de estudio.

4.2.3 Límites de detección y de cuantificación

Para la evaluación de los límites de detección y de cuantificación, dado que el blanco no presentó una señal diferenciable del ruido, fue necesario preparar disoluciones de muy baja concentración de cada uno de los analitos de trabajo. Para los aniones cloruro y sulfato se utilizó la concentración de 0.5 mg/L, para bromuro, nitrato y fosfato fue de 1 mg/L, mientras que para el anión bicarbonato fue de 5 mg/L. Como ya se mencionó en la metodología, estos parámetros se determinaron con respecto a lo recomendado por Miller y Miller y con las correspondientes ecuaciones de regresión se obtuvieron los valores de LOD y LOQ en unidades de concentración (ver tabla 4.4)

Tabla 4.4. Valores de LOD y LOQ para los seis analitos de estudio (n=7).

Analito	LOD	LOQ
	mg/L	
HCO₃⁻	15,9 ± 3,3	16,7 ± 3,3
Cl⁻	0,6 ± 0,4	1,3 ± 0,4
Br⁻	0,8 ± 0,7	1,4 ± 0,6
NO₃⁻	1,5 ± 0,4	1,8 ± 0,4
PO₄³⁻	2,2 ± 1,1	4,8 ± 1,1
SO₄²⁻	0,7 ± 1,1	1,1 ± 1,1

Como era de esperarse, los aniones cuya determinación es la más sensible resultaron con los valores de LOD más bajos (cloruro y sulfato), mientras que el

valor más alto lo tiene el bicarbonato al presentar la sensibilidad más baja de todos los aniones de trabajo. Con respecto a los valores de LOQ determinados se observa el mismo comportamiento.

4.2.4 Precisión

La precisión del sistema de análisis fue evaluada en términos de repetibilidad para tres niveles de concentración para cada anión. Los resultados de los valores de CV se presentan en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Coeficiente de variabilidad del área de pico para tres niveles de concentración (n=3).

Anión	Concentración (mg/L)	%CV
HCO₃⁻	50	0,3
	200	1,3
	500	0,5
Cl⁻	1	0,9
	50	0,9
	70	0,4
Br⁻	5	2,0
	50	0,3
	70	0,5
NO₃⁻	5	2,0
	50	0,7
	70	0,8
PO₄³⁻	5	0,7
	50	0,9
	70	1,3
SO₄²⁻	1	1,2
	50	1,4
	70	0,9

Los valores de precisión en los diferentes niveles de concentración se reportan como coeficiente de variabilidad porcentual (%CV), se observa que todos los valores de los aniones analizados se encuentran dentro del intervalo establecido en la Guía Eurachem [4], que establece que deben ser menores al 3%, eso indica que el sistema de estudio es preciso.

4.2.6 Exactitud

La exactitud del método desarrollado se evaluó para los tres niveles de concentración mencionados en la tabla 4.6, empleando dicha concentración como valor real y como concentración determinada el valor calculado al convertir la señal obtenida del cromatograma con la ecuación de la correspondiente curva de calibración de cada uno de los analitos.

Tabla 4.6. Valores de exactitud determinados con el sistema de análisis para los aniones de estudio.

Analito	Concentración real (mg/L)	Concentración determinada (mg/L)	%Error	%Exactitud
HCO₃⁻	100	97,1	-2,9	102,9
	300	299	-0,3	100,3
	1000	999	-0,1	100,1
Cl⁻	10	10,3	3,0	97,0
	40	39,9	-0,25	100,25
	80	81,7	2,1	97,9
Br⁻	10	10,1	1,0	99,0
	40	39,9	-0,3	100,3
	80	78,6	-1,8	101,8
NO₃⁻	10	10,9	9	91
	40	38,2	-4,5	104,5
	80	80,2	0,25	99,75
PO₄³⁻	10	10,1	1,0	99,0
	40	38,9	-2,8	102,8
	80	79,9	-0,1	100,1
SO₄²⁻	10	9,9	-1,0	101
	40	39,3	-1,8	101,8
	80	81,8	2,3	97,75

Como se puede observar para todos los analitos de estudio en los tres niveles de concentración los valores de exactitud se encuentran muy cercanos al 100% y

basándose en lo que dice la Guía Eurachem, son aceptables, ya que éstos deben encontrarse entre un 90 y 110%. Por lo que se puede asegurar que se cuenta con una metodología de análisis exacta para la determinación de los seis aniones de trabajo.

4.3 Recobros

Los valores de concentración determinados, como el producto de la fortificación de cada una de las muestras de agua residual se presentan en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Valores de concentración determinados como los fortificados de las muestras de agua residual.

Muestra	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
	Concentración de fortificación determinada (mg/L)					
M-1	254,1	8,9	9,1	9,3	10,3	9,4
M-2	253,9	9,0	9,3	9,7	11,0	10,5
M-3	231,2	10,0	8,8	11,1	11,4	10,6
M-4	251,9	7,5	9,5	9,6	10,6	9,6
M-5	245,8	10,2	10,8	9,4	10,0	10,7
M-6	246,3	10,4	8,7	9,2	11,1	9,4
M-7	243,3	9,7	9,8	9,0	10,7	9,8
M-8	243,2	8,6	9,1	9,1	9,0	8,3
M-9	252,6	8,6	9,1	9,2	10,9	10,1
M-10	238,0	9,8	9,1	9,2	12,8	10,4
M-11	242,3	9,4	8,7	9,3	11,1	9,9
M-12	243,7	9,6	8,9	9,9	9,9	10,1
M-13	246,4	10,1	10,2	9,3	10,9	9,7

Muestra	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
	Concentración de fortificación determinada (mg/L)					
M-14	250,5	10,1	9,2	9,3	10,4	9,7
M-15	251,1	9,8	8,9	10,6	12,1	9,1
M-16	254,4	10,1	9,3	91,9	11,2	11,0
M-17	268,1	9,4	10,6	91,7	10,3	9,0
M-18	244,8	10,2	9,0	91,2	10,1	10,8
M-19	252,8	10,7	8,9	93,0	9,6	10,7
M-20	241,5	10,6	9,3	91,6	9,4	10,8
M-21	281,1	10,7	9,2	10,7	10,3	11,1
M-22	241,4	11,1	9,7	9,2	12,2	10,3
M-23	245,0	10,1	9,0	8,7	10,2	11,1
M-24	255,2	9,5	9,0	9,1	12,3	10,9
M-25	250,9	10,2	8,9	9,2	9,7	9,2
M-26	248,3	10,0	9,6	8,9	10,9	10,1

Los resultados indican valores muy cercanos a 10 mg/L de cloruro, bromuro, nitrato, fosfato y sulfato, mientras que para bicarbonato son de aproximadamente 250 mg/L, que corresponden a las concentraciones utilizadas para la fortificación de las muestras. Sin embargo, como es necesario evaluar la cantidad del analito recuperado en la porción de la muestra adicionada, cuando ésta es conducida a través del método analítico completo, se presenta en la tabla 4.8 los valores de recobro obtenidos para cada uno de los analitos de estudio, los cuales permiten evaluar la eficiencia del proceso de preparación en este caso, la dilución de la muestra, y las posibles interferencias que pueden existir al aplicarlo para el análisis de las aguas residuales provenientes del Valle del Mezquital.

Tabla 4.8. Porcentaje de recobros obtenidos para los 6 analitos de trabajo en muestras de agua residual.

Muestra	HCO₃⁻	Cl⁻	Br⁻	NO₃⁻	PO₄³⁻	SO₄²⁻
M-1	101,6	88,7	90,7	93,2	103,1	94,3
M-2	101,6	90,3	92,8	96,7	90,1	105,5
M-3	92,5	99,9	87,7	110,8	85,8	106,1
M-4	100,8	74,8	95,0	95,7	94,3	95,6
M-5	98,3	102,1	107,6	93,7	99,9	106,7
M-6	98,5	103,9	87,4	91,5	88,6	94,5
M-7	97,3	97,3	98,2	90,2	93,0	97,5
M-8	97,3	86,4	91,3	90,5	110,2	82,8
M-9	101,0	86,0	90,7	92,3	91,4	100,5
M-10	95,2	98,5	90,8	91,6	72,4	104,4
M-11	96,9	94,2	87,1	93,0	89,1	98,7
M-12	97,5	96,0	88,6	98,8	100,7	100,9
M-13	98,6	101,0	102,3	93,0	90,6	97,3
M-14	100,2	101,0	92,3	92,5	96,1	96,9
M-15	100,4	97,5	89,0	106,1	78,6	91,5
M-16	101,8	100,8	92,7	91,9	88,5	110,3
M-17	107,2	93,8	106,5	91,7	97,0	89,9
M-18	97,9	101,7	89,9	91,2	98,8	108,4
M-19	101,1	107,1	88,8	93,0	104,2	106,6
M-20	96,6	105,6	92,7	91,6	105,6	108,1
M-21	112,4	107,4	92,1	107,4	97,4	110,7

Muestra	HCO₃⁻	Cl⁻	Br⁻	NO₃⁻	PO₄³⁻	SO₄²⁻
M-22	96,6	110,5	96,6	91,7	78,3	103,0
M-23	98,0	101,4	90,3	87,1	98,0	110,6
M-24	102,1	94,6	89,5	91,3	77,4	109,4
M-25	100,4	102,2	88,7	92,0	103,0	91,9
M-26	99,3	100,3	95,7	89,3	90,8	100,7

De acuerdo con los criterios para la validación de métodos fisicoquímicos establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC, 2011), que indica que los valores de recobros en muestras de agua para concentraciones comprendidas entre 0.1 y 100 mg/L, deberán estar entre 70 y 110 %, mientras que para los recobros de concentraciones entre 100 y 1000 mg/L, éstos deberán estar entre 85 y 110 %, se puede afirmar que los resultados son satisfactorios para la determinación de bicarbonato, cloruro, bromuro, nitrato, fosfato y sulfato en muestras de agua residual provenientes del Valle del Mezquital.

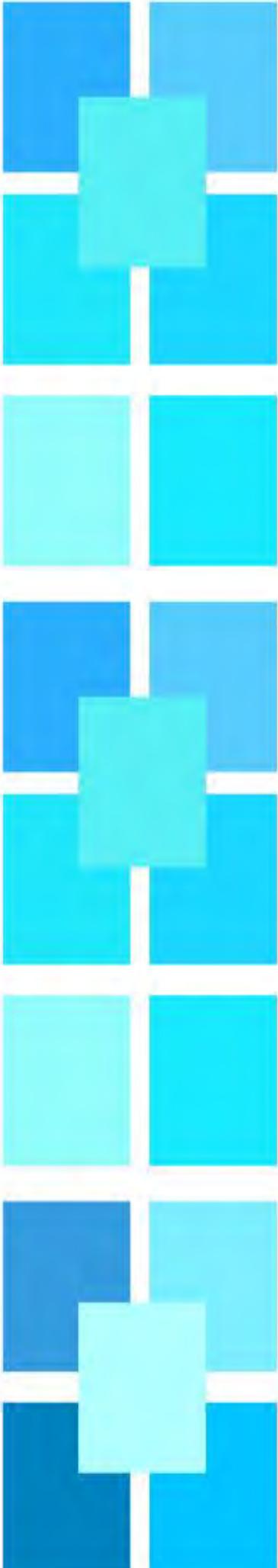


CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología confiable por medio de cromatografía de iones con detección conductimétrica, que permite la determinación simultánea de seis aniones: bicarbonato, cloruro, bromuro, nitrato, fosfato y sulfato en niveles de concentración del orden de los mg/L en un tiempo de análisis de alrededor de 15 minutos.
- Los parámetros cromatográficos determinados indican que se tiene una separación adecuado de los 6 analitos de trabajo, ya que se cumplen con los valores deseables de factor de capacidad, eficiencia, selectividad y resolución.
- Se obtuvieron los parámetros típicos de un proceso de validación como lo son: el intervalo lineal y de trabajo, la precisión y exactitud, así como los límites de detección y cuantificación para cada uno de los aniones de trabajo. Para todos los casos los intervalos lineales obtenidos son de dos órdenes de magnitud, son repetibles ($CV < 3\%$) y exactos ($\%error < 5$).
- La evaluación de la metodología de análisis propuesta en 26 muestras de aguas residuales provenientes del Valle del Mezquital, permitió conocer sus alcances, indicando que no existen interferencias de matriz en este tipo de muestras para la determinación simultánea de los seis aniones de trabajo, ya que los valores de recobro obtenidos al fortificar las muestras ambientales, cumplen los requisitos establecidos por la CCAYAC para los niveles de concentración utilizados.



REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] NOM-127-SSA1-1994,"Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".

[2] Wetzel, Robert; Limnología, ediciones Omega, S. A Casanova, Barcelona 2006.

[3] NMX-AA-073-SCFI-2001, Análisis de agua- Determinación de cloruros totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.

[4] Eurachem (2005). Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (2° edición): Los Cués, Qro., México.

[5] Miller J., Miller J. (2002). Estadística y Quimiometría para química analítica. España: Prentice Hall.

[6] CENAM, Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. Traducción al español del VIM-3ª. Marzo 2009.

[7] Iso 8404:1994. Quality- Vocabulary.

[8] EMA, CENAM. (2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos y empleados para el laboratorio clínico. (1ª ed.) México.

[9] ISO 5725-3:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method

[10] Meyer R., Veronica. Practical High- Performance Liquid Chromatography. 5th Edition. Wiley. 2010. Última revisión online: Marzo 2016.

[11] Recuperado de: http://www.oc-praktikum.de/nop/es/articles/pdf/Chromatography_es.pdf. Última revisión: marzo 2016.

[12] Secretaria de Salud, CCAYAC (2011). Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos.

[13] Guía de Validación, Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos S. A. C, Edición 2002.

[14] Avendaño C. Introducción a la Química Farmacéutica. 3er reimpresión, Mc México: Graw Hill Interamericana, 1997. Pág. 843-847

[15] CGA-ENAC-LEC (Rev. 06/10/14). Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/ICE 17025: 2005.

[16] Prado Flores Ma. G., Covarrubias Herrera Ma. del R. (1996). Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. 1ª edición. UAM.X, México. Recuperado de: [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf] Última revisión: marzo 2016.

[17] Rouessac, F., Rouessac, A. (2003). Análisis químico. Métodos y Técnicas Instrumentales modernas. Madrid, España. Mc Graw Hill.

[18] CONACyT. (2010). Guías Técnicas: Validación de métodos analíticos. 1ª edición. México

[19] G.A. Shabir (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. J. Chromatography. A. 987, 57-66.

[20] Shah P, Midha K, et al. Analytical Methods Validation. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1992; 81 (3): 309-312.

[21] Guidance for Industry. Q2A Validation of Analytical Procedures: Text Validation of Analytical Procedure. Marzo 1995.

[22] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Food and Drug Administration (1994, November). Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods.

[23] Neue, U. D. (1997). HPLC COLUMNS Theory, Technology, and Practice. New York: WILEY-VCH.

[24] Romero, A. S. (2002). Cromatografía curso de métodos, [en línea]. México: Instituto de biotecnología, UNAM. Recuperado de: [http://www.ibt.unam.mx\(/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf](http://www.ibt.unam.mx(/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf)

[25] Waters 432 Conductivity Detector Operator's Guide, 71500043202 revision B, Impreso en EE UU, 2010. Pág. 111.

ANEXO I. Datos de área bajo la curva de cada pico cromatográfico, elaborado por triplicado para las curvas de calibración de cada anión. (fig. 4.4; 4.5; 4.6)

SULFATO					
	Concentración	n=1	n=2	n=3	promedio
		Área (mV)			
1° curva de calibración	1	3996	3945.5	3935	3958.83333
	5	22893	24392	24003.732	23762.9107
	7.5	23138.1017	32985.0833	33925.0132	30016.0661
	10	47761.0675	45606	46608	46658.3558
	15	69795.6506	63249.2374	67679.6648	66908.1843
	30	130898	131750.119	131421	131356.373
	40	168738	173233	170806.132	170925.711
	50	215521.331	207568	218863	213984.11
	60	261304.393	266812.569	261381.609	263166.19
	70	301411.5	303453.833	304850.092	303238.475
	80	348345.702	354649.26	350376	351123.654
100	439944	445969.377	443362.683	443092.02	
2° curva de calibración	1	4326.54348	4282.264	4424.48837	4344.43195
	5	23895.8634	23872.814	22098.7338	23289.137
	7.5	31027.0134	29686.2857	33150.05	31287.783
	10	41273.3655	43587	43773.2579	42877.8745
	15	66581.0186	63835.0696	65323.4762	65246.5215
	30	127690.644	137525	127661.224	130958.956
	40	162105.568	175542	178775.676	172141.082
	50	215293.743	212011.294	213203.5	213502.846
	60	255273	253042	264275.555	257530.185
	70	303126.754	296017.038	307532.649	302225.48
	80	345708.554	351224	358491.304	351807.953
100	438626.48	411480.045	446627.78	432244.768	
3° curva de calibración	1	4434	4545.37692	4484.90977	4488.09557
	5	24238.9928	24457.1529	24190.3554	24295.5004
	7.5	33816.9784	34475.354	33721.5714	34004.6346
	10	47085.5	47393.2468	48238.1765	47572.3078
	15	65222.6646	65133.2832	65385.64	65247.1959
	30	133592.341	128003.925	134371.695	131989.32
	40	172751.687	171353.561	173761.37	172622.206
	50	220830.574	213787.871	221261.889	218626.778
	60	259530.657	259713.714	267843.5	262362.624
	70	306884.227	304414.977	310744.948	307348.051
	80	350776	355230.76	355546.312	353851.024
100	439630.544	434879.928	448995.617	441168.696	

FOSFATO

	Concentración	n=1	n=2	n=3	promedio
		Área (mV)			
1° curva de calibración	1	4118	4201.43902	4102.82243	4140.75382
	5	8518.2561	9565.1875	14075.6889	10719.7108
	7.5	10294	17621.7037	15766.8438	14560.8492
	10	24158.4711	23560	24459	24059.157
	15	32796.2185	33080.7027	33013	32963.3071
	30	64767.3696	67564.5	65833	66054.9565
	40	84529	87590.8769	84793.931	85637.936
	50	109517.735	100899	108480.132	106298.955
	60	132366.066	134968.178	129015	132116.415
	70	153422	153403.528	152891.769	153239.099
	80	176999.849	176918.197	170304.5	174740.849
100	223000.175	223542.181	223609.486	223383.947	
2° curva de calibración	1	4118.37391	4232.65385	4155.475	4168.83425
	5	11086.9478	10369.566	12134.2295	11196.9144
	7.5	17558	19851.898	17061.1304	18157.0095
	10	22795.8125	26707	21412.8992	23638.5706
	15	34111	34006.4545	33879.1898	33998.8814
	30	61622.9	62620.5	63846.056	62696.4853
	40	87749.8333	87434.3415	88785	87989.7249
	50	108484.064	99806.2727	105022.15	104437.496
	60	130411	112682.637	134626.158	125906.598
	70	153991	141320.429	154368.391	149893.273
	80	172231	166222.929	179389.006	172614.312
100	222344.8	222842.158	221552.657	222246.538	
3° curva de calibración	1	4090.52	4095.03053	4077.25217	4087.6009
	5	12886.5	12677.6944	13089.6233	12884.6059
	7.5	18627.6731	18010.1481	18115.7042	18251.1752
	10	23986	23403.1831	24057.8596	23815.6809
	15	33032.6667	33011.8868	33298.787	33114.4468
	30	64766.7717	65597.9877	65327.6122	65230.7905
	40	85543.4963	86936.8366	85439.1235	85973.1521
	50	111460.767	107827.112	111584.952	110290.944
	60	132133.636	131804.401	135592.633	133176.89
	70	158502.907	155683.683	155126.75	156437.78
	80	178604.807	175465.54	180196.469	178088.939
100	224170.208	221981.172	223444.057	223198.479	

NITRATO

	Concentración	n=1	n=2	n=3	promedio
		Área (mV)			
1° curva de calibración	1	1970	1890.88571	1982	1947.62857
	5	11533.7797	10067	9798.90909	10466.5629
	7.5	19265	18098.8793	18601	18654.9598
	10	23911.6379	23846.5	23846.5	23868.2126
	15	38167.8824	38338.1053	38364.7636	38290.2504
	30	63745.7143	62948.6557	63682	63458.79
	40	84262.7143	84694.5	85523	84826.7381
	50	107011.571	116336	106439	109928.857
	60	130326.5	132111.5	133064	131834
	70	149858.353	152964.5	149457.733	150760.195
	80	184758	171872.918	180455	179028.639
	100	235231.448	239803	233400	236144.816
2° curva de calibración	1	1956.5	1949.22857	1955	1953.57619
	5	9516.5	11279.0625	11719.9596	10838.5074
	7.5	18763.5	17586.1429	18099.2476	18149.6302
	10	24534.9661	23981.8144	24041.5464	24186.109
	15	37593.614	37008.8889	37488.68	37363.7276
	30	60798.8983	61521	60340.9706	60886.9563
	40	85160.5	84835.5	85621	85205.6667
	50	104947	119764.5	104308	109673.167
	60	136927.385	132852	132313.515	134030.967
	70	150186	150412.291	158010.039	152869.443
	80	177194.5	177636.117	186152.313	180327.643
	100	235201	229221.5	238407.626	234276.709
3° curva de calibración	1	1991.23077	1922.14516	1956.4186	1956.59818
	5	10332	10895.7297	10937.7358	10721.8219
	7.5	18901	18108.7273	19558.9524	18856.2266
	10	21224.5	25683	25550.8969	24152.799
	15	38877.25	38680.7172	38493.6132	38683.8601
	30	62931	62568.6731	62078.2556	62525.9762
	40	85492	85085.3048	85190.6408	85255.9818
	50	116360	106373.8	116520.923	113084.908
	60	138683	134601.72	130885.177	134723.299
	70	150531.746	157984.96	156995.053	155170.586
	80	173164	188256.562	183016.286	181478.949
	100	234587.905	233339.165	228842.588	232256.553

BROMURO

	concentración	1°	2°	3°	Promedio
		Área (mV)			
1° curva de calibración	1	2971	2811	2671	2817.66667
	5	11177.25	11285.3793	11279.5	11247.3764
	7.5	14563.5	16547	16411.5	15840.6667
	10	21190.5	22263.3208	22511	21988.2736
	15	31266.9057	30986.7059	31583	31278.8705
	30	60220.5849	60449.5	59867.3704	60179.1518
	40	80268.4615	78100	81888	80085.4872
	50	99924.3673	98614.3333	99463.5472	99334.0826
	60	120919.472	121571.083	123030.14	121840.232
	70	140568.235	141128.925	140475.208	140724.122
	80	160059.041	161196	164500.077	161918.373
100	203663.235	205595.471	205805.38	205021.362	
2° curva de calibración	1	2866.51064	2943	2989	2932.83688
	5	10475	10412.1176	11121.98	10669.6992
	7.5	15707.5	15785	15516.5	15669.6667
	10	20339	20654.3846	21134.4906	20709.2917
	15	31098	30197	30798	30697.6667
	30	58539	55394.5	60003.451	57978.9837
	40	78816.0588	82951.069	82157	81308.0426
	50	98687	100974.796	98002.75	99221.5153
	60	118029.434	120809	122995.5	120611.311
	70	137719.091	142127.74	138990.265	139612.365
	80	158663	162776.667	161048	160829.222
100	201228.54	205343.196	203480.6	203350.779	
3° curva de calibración	1	2863.54167	2935	3046.35294	2948.2982
	5	11168	10831.8679	10927.0784	10975.6488
	7.5	15176.0769	15729.9231	15908	15604.6667
	10	22121.1667	21349.5106	21054.9583	21508.5452
	15	30647	30377.1429	30236.3725	30420.1718
	30	60978.0556	60324.88	60100.3333	60467.7563
	40	78719	78889.8889	79788	79132.2963
	50	101864.259	99206.3265	101125.294	100731.96
	60	119631.118	119109.538	121822.698	120187.785
	70	139254.462	137670	141360.259	139428.24
	80	161369.64	168433.667	158109	162637.436
100	201227.091	208460.397	199394.63	203027.372	

CLORURO

	concentración	1°	2°	3°	promedio
		Área (mV)			
1° curva de calibración	1	6375	6868.5	7087	6776.83333
	5	31326	31376.4189	33432.8462	32045.0884
	7.5	41124	45705.9167	45605.5263	44145.1477
	10	64397.6813	62525.3043	65432.0571	64118.3476
	15	92277.6301	92358	91514.4865	92050.0389
	30	181231.632	178724.5	181230	180395.377
	40	237979.5	239697.114	239527.325	239067.98
	50	303035.5	296181	297269	298828.5
	60	360510	367917	364080	364169
	70	425741	421134.41	420262	422379.137
	80	487136.5	487275	484580	486330.5
100	612708	612821	612987.5	612838.833	
2° curva de calibración	1	6009	6690.35294	6272.5942	6323.98238
	5	30044.6471	31360.381	29250.7097	30218.5792
	7.5	45211.3824	45951.8276	45056.7143	45406.6414
	10	61630.1429	62361	60333.5556	61441.5661
	15	92469.2317	92699.5	90477.1098	91881.9472
	30	176759.164	170994.5	181676.543	176476.736
	40	234844	242360.5	241271	239491.833
	50	295442	290876	296789.348	294369.116
	60	360421	357968.806	368284	362224.602
	70	424515.552	417829	423300.5	421881.684
	80	483099	488826	495141	489022
100	613966	609412.5	624883.5	616087.333	
3° curva de calibración	1	7167.35294	7104	7083.81818	7118.39037
	5	30752.3692	31893.5	31058.2029	31234.6907
	7.5	44030.3429	44252.0682	44939.1059	44407.1723
	10	62417.5	61590.4839	62699.5882	62235.8574
	15	90755	90471	90143.3776	90456.4592
	30	181554	182851.874	183021.402	182475.759
	40	240239.056	236285.5	242982	239835.519
	50	307716.697	316592	310532	311613.566
	60	365648.163	358868	369293.5	364603.221
	70	427472.5	419724	427796.5	424997.667
	80	488977	485372	488012	487453.667
100	616050	612332.5	621452	616611.5	

BICARBONATO

	Concentración	n=1	n=2	n=3
		Área (mV)		
Curva de calibración	100 ppm	49557.5	48882	50091
		50378	49631.6829	49330
		49674.9302	49141	49719.7674
		49870.1434	49218.2276	49713.5892
	75 ppm	36913	37465	36429.0233
		36336	36943.5	35640
		37261.5	36877	35797.4884
		36836.8333	37095.1667	35955.5039
	50 ppm	23777.7368	23439.5	22993.8372
		24351.5	23519	23479.7857
		23859.3902	23087	23157
		23996.209	23348.5	23210.2076
	10 ppm	12967.5	13089.5	12936
		12983	13846	12852.8
		13194.8333	13505.1667	12913.2667
		3256.5	3507	2861.16216
	5 ppm	1386	1203.76923	878.5
		1202	906	1294
		1276	1213	814
		1288	1107.58974	995.5
	1 ppm	No Detectado	No Detectado	No Detectado
		No Detectado	No Detectado	No Detectado
		No Detectado	No Detectado	No Detectado