



Trabajo Fin de Grado

Puesta a punto y validación de un método analítico:

Determinación de sodio y potasio por espectroscopía de emisión atómica en continuo.

Jorge Marcelino Morales

Dirigido por: Óscar M. Hernández Torres

OSCAR M. HERNÁNDEZ TORRES, PROFESOR TITULAR EN QUÍMICA
ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA,

INFORMA: que el Trabajo de Fin de Grado titulado “Puesta a punto y validación de un método analítico: Determinación de sodio y potasio por espectroscopía de emisión atómica en continuo”, ha sido realizado por JORGE MARCELINO MORALES, bajo mi dirección, en los laboratorios de área de Química Analítica, Departamento de Química de la Universidad de La Laguna durante el curso 2019-2020, autorizando en esta fecha su presentación.

La Laguna, a 9 de JULIO de 2018

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.

La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 2565821□□□□ Código de verificación: ZOMCetex

Firmado por: Óscar Miguel Hernández Torres
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 17/06/2020 13:35:29

Agradecimientos.

Por supuesto, a mis padres, por haber confiado en que conseguiría llegar a la meta, que no es tan importante cuanto se tarde en llegar mientras se llegue.

A mi familia, los Morales, por su ánimo y apoyo incondicional.

A Iru por soportar tantas horas de videollamada, especialmente durante el confinamiento, y ser uno de mis pilares.

A Tatiana y Dayi, por haber empezado compartiendo asignaturas para acabar haciendo absolutamente todo juntos.

A mi tutor Óscar, por haber sido tan diligente y la paciencia demostrada a lo largo de todo el TFG. Gracias por reconciliarme con la química analítica.

Y en general, a todas las personas que han conseguido que llegue hasta aquí, desde profesorado hasta la gente que he conocido en la facultad.

Resumen

En este trabajo se lleva a cabo la puesta a punto y posterior validación de un método analítico para la determinación de sodio y potasio por espectroscopía de emisión atómica.

Como elemento diferenciador, se determinan los analitos mediante un sistema en continuo que elimina la necesidad del tratamiento previo de la muestra, realizándose este en línea y reduciéndose de forma drástica el gasto de muestra y reactivos utilizados en el análisis.

En el desarrollo del método se han tratado de seguir las directrices de calidad para los laboratorios de ensayo, así como los principios de la química analítica verde.

La puesta a punto consiste en la optimización de todos los parámetros que afectan a la medida, tanto instrumentales como químicos. La validación se llevó a cabo mediante el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos al someter el método a las adiciones estándar y posterior estudio de la recuperación de los analitos.

Summary

In this project, It's carried the set-up and validation of an analytical method for determination of sodium and potassium by atomic emission spectroscopy (AES).

As different, the analytes are determined by a continuous system that eliminates the pre-treatment of the sample, being carried online with a drastically reducing waste of sample and reagents used in the analysis. Developing the method, we've tried to follow the quality guidelines for testing laboratories and the principles of green analytical chemistry.

The set up consists in the optimizing of all the parameters that can affect the measure, both instrumental and chemical. Validation was made by statistical treatment of the results obtained by doing the standard additions and studies of analyte recovery to the proposed method.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sodio y potasio: presencia e interés analítico	1
1.2 Legislación aplicable	2
1.3 Técnica instrumental	2
1.4 Principios de química verde	4
1.5 Validación de los métodos analíticos	4
1.6 Tratamiento estadístico de los resultados	5
2. OBJETIVOS	7
3. PARTE EXPERIMENTAL	8
3.1 Reactivos	8
3.2 Materiales e instrumentación	8
3.3 Procedimiento experimental	9
3.4 Toma de muestras	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1 Estudio de parámetros instrumentales	12
4.2 Toma de muestras	14
4.3 Parámetros experimentales	15
4.4 Curvas de calibrado y parámetros de calidad	16
4.5 Validación del método	21
5. CONCLUSIONES	31
6. GLOSARIO	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

INTRODUCCIÓN

1.1 Sodio y potasio: presencia e interés analítico

El sodio y el potasio son relativamente abundantes suponiendo el 2,6% y el 2,4% de los elementos presentes en la corteza terrestre, si bien no se encuentran como metales, sus sales están muy extendidas, siendo la principal fuente del sodio la sal de roca (NaCl de alta pureza) y el agua del mar, mientras que el potasio se encuentra en su mayoría como silvita (KCl) o silvinita (KCl/NaCl).

El sodio, junto con el cloro, es el principal elemento disuelto en el exterior de las células, lo que incluye, entre otros, el plasma sanguíneo y el fluido extracelular. La absorción del sodio tiene lugar en el intestino delgado y está relacionado con la reabsorción de nutrientes como aminoácidos, glucosa y cloro en los riñones.

En mamíferos, el sodio es regulado en el sistema circulatorio por los riñones, donde se perciben los cambios en la presión sanguínea y se envían las señales a las glándulas endocrinas para modificar la concentración. La retención de sodio se corresponde de forma general con la retención de agua mientras que la eliminación de este da lugar a la pérdida de agua. (1)

Un consumo excesivo de sodio está relacionado con la aparición de hipertensión en humanos, consistente en un aumento de la presión sistólica por encima de 120 mm Hg y de la presión diastólica por encima de 80 mm Hg (2). La dosis máxima diaria recomendada para disminuir el riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas con el consumo de sodio está en aproximadamente 2,3 gramos en adultos sanos. (3)

El potasio es un elemento esencial en mamíferos. Está implicado fundamentalmente en el mantenimiento del potencial de membrana mediante la regulación de la concentración de ión K^+ en el líquido intracelular, al contrario que el sodio, que está en mayor proporción en el líquido extracelular tal y como se ha comentado anteriormente.

En contraposición a lo que ocurre con el sodio en las dietas actuales la cantidad de potasio es baja, lo que, unido al exceso de sodio, contribuye a un aumento del riesgo de padecer hipertensión en humanos. Se estima que el consumo de potasio es tres veces menor respecto al del sodio. (4) Hay indicios de que un aumento del potasio en la dieta podría favorecer un descenso de la tensión arterial. (5)

La hiperkalemia, exceso de potasio en el suero intracelular, puede producirse en humanos al consumir más de 18 gramos de potasio, dando lugar a la imposibilidad de los riñones para eliminarlo. La dosis diaria recomendada en humanos adultos y sanos es de aproximadamente 2,3 gramos, coincidente con la dosis de sodio. (6)

La relación entre la concentración de sodio y potasio tiene implicaciones en funciones fisiológicas en animales superiores, la conocida como bomba de sodio-potasio. Los gradientes de concentración entre ambas especies producen una diferencia de potencial transmembrana, que se traduce en transmisión de los impulsos nerviosos en las células nerviosas y musculosas. (7)

La dieta, junto con el agua, son la principal vía de incorporación de estos elementos en el cuerpo humano, si bien la aportación del agua porcentualmente es inferior respecto a la dieta. El potasio es además un nutriente esencial en las plantas por lo que conocer su concentración en las aguas de consumo es de interés.

1.2 Legislación aplicable

La base legal que regula la concentración de ambos elementos se encuentra en el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. En el anexo I se establece un límite paramétrico de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sodio como parámetro indicador de las aguas de consumo. La legislación actual no establece ningún límite superior o inferior de concentración para potasio. (8)

Ya que el RD 140/2003 únicamente establece un límite superior para el sodio, se plantea la opción de utilizarse el Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas naturales de manantial envasadas para consumo humano. Si bien este real decreto está enfocado a las aguas embotelladas, podrían aplicarse los límites para el agua del grifo. En este, se establece la obligatoriedad de añadir la mención de “Sódica” siempre que se supere una concentración de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sodio y la de “Indicada para dietas pobres en sodio” siempre que la concentración sea menor a $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sodio. No hay referencias al potasio en este real decreto. (9)

Por tanto, al no presentar toxicidad a las concentraciones usuales, no se ha establecido ningún límite para ninguno de los dos elementos. (10)

Si bien el sodio no tiene una implicación directa en la seguridad para su consumo sí que la tiene en el sabor, siempre dependiente del contraión con el que se encuentre, estando establecido el umbral de sabor promedio en $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, a partir del cual el agua deja tener un sabor aceptable en humanos.

A pesar de que el potasio presente en las aguas de consumo suele provenir del tratamiento de potabilización del agua y como consecuencia de los minerales disueltos en ella, no se suele encontrar en concentraciones que puede considerarse nociva para personas sanas. Es por ello, que, al no haber límites establecidos, se considera que las concentraciones son seguras para su consumo. (11)

1.3 Técnica instrumental

La técnica utilizada, la espectroscopía de emisión en llama, está especialmente indicada para la determinación de metales alcalinos, aprovechando que estos elementos se excitan a temperaturas más bajas que el resto, dando lugar a espectros simples de alta intensidad sin demasiadas interferencias. (12)

Su base se fundamenta en las transiciones entre estados de energías atómicas, produciéndose la emisión en el proceso de caída desde un estado excitado a un estado fundamental.

Esta emisión por parte de la muestra proporciona una intensidad de luz que es proporcional a la concentración de analito. Al tratarse de espectros atómicos, se requiere que la luz sea monocromática, para esto se dispone el monocromador entre la llama y el detector. A continuación, en la figura 1 se muestra de forma esquemática el equipo.

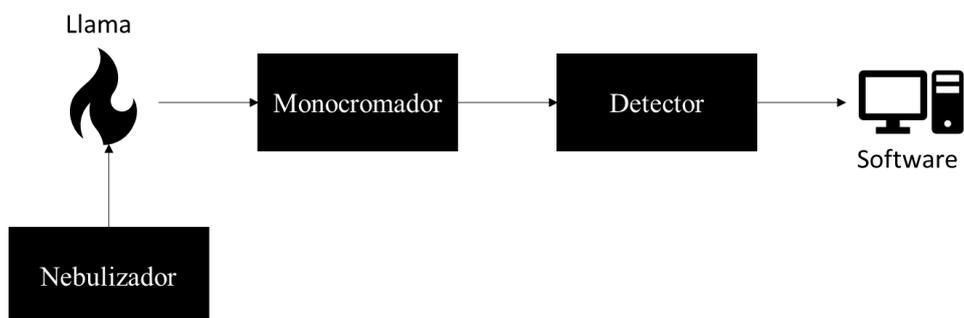
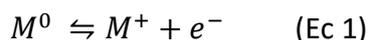


Figura 1: Esquema de un instrumento de espectroscopía de emisión atómica en llama.

Se utiliza esta técnica por la sencillez, no siendo necesario el tratamiento previo de la muestra, lo que redundaría en un menor uso de reactivos.

1.3.1 Espectros atómicos y supresor de ionización

En la técnica utilizada se determinan los espectros de los átomos y no de los iones, por lo que tiene una especial importancia asegurar que tanto sodio como potasio se encuentren en su forma atómica en la llama y no como iones. Esta relación entre átomo e ión viene influenciada por la concentración de las especies, así como por la temperatura de la llama. El equilibrio entre átomo e ión se muestra a continuación en la ecuación 1.



Para que el equilibrio se encuentre desplazado hacia el metal en forma atómica es necesario utilizar un supresor de ionización. Puede ser un metal más fácilmente ionizable u otro metal en una concentración mayor, que asegure que una cantidad de electrones suficiente para desplazar el equilibrio.

1.3.2 Aspectos instrumentales

Con la intención de obtener la mejor intensidad se hace uso de un mechero de flujo laminar con un paso óptico de 10 cm. Al producirse un aumento del paso óptico se produce un aumento de la intensidad, de acuerdo con la ecuación de Beer-Lambert.

Este mechero va acoplado a un nebulizador, cuya función es mejorar la atomización, transformando la muestra líquida en un aerosol de finas gotas que asciende al mechero, empujado por la mezcla de gases utilizada en la combustión y que se detallará más adelante.

1.4 Principios de química verde

En este trabajo se ha intentado seguir las metodologías de la química analítica verde (GAC) que se resumen en el reemplazo de los reactivos más tóxicos y la miniaturización y automatización de los métodos siempre que sea posible. Con esto se logra en gran medida una reducción de la cantidad de reactivos consumidos y desechos generados, reduciendo o eliminando los efectos secundarios de los métodos analíticos. (13)

Si bien en el apartado 3.1 se explica el montaje experimental utilizado, es posible avanzar que, si bien no se ha conseguido la total automatización del método, si se ha conseguido utilizar un método en continuo que reduce la interacción del operador con las muestras además de la miniaturización del método gracias a la dilución en continuo llevada a cabo, con la disminución de la cantidad de muestra y supresores utilizados en la medida.

La poca utilización de reactivos supone una gran reducción de los desechos originados en el tratamiento de la muestra, en consonancia con la química analítica verde. Si bien en el método propuesto es necesario utilizar reactivos para el tratamiento de la muestra, los utilizados no suponen un peligro para el medio ambiente por su baja toxicidad.

1.5 Validación de los métodos analíticos

Para la validación del método se ha seguido lo recomendado en la norma ISO/IEC 17025:2017, que establece en el punto 7.2.2.1 las técnicas que deberán ser utilizadas en la validación de un método no normalizado. En este caso en concreto se hará una evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado. (14)

En un primer lugar se estudian todos los factores, instrumentales e interferencias, que pudiesen afectar a los resultados obtenidos. El estudio sistemático abarca desde los parámetros puramente instrumentales como es la elección de la mezcla de los gases que se utilizarán en la llama, el tiempo entre medidas o la posición óptima del mechero. En los aspectos químicos se estudia la influencia del inhibidor en las medidas o la concentración de este.

Para la validación del método se comparan las pendientes obtenidas en la curva de calibrado con la obtenida mediante el método de las adiciones estándar. Con esta comparación lo que se busca es poder determinar si existe un efecto matriz en el método planteado o no.

En el caso de no existir efecto matriz se podrá construir la curva de calibrado utilizando la forma usual, diluyendo el analito de interés a concentración conocida en agua destilada y leyendo la señal que proporciona. Si existe efecto matriz, la propia naturaleza de la muestra afecta a las señales obtenidas, por lo que únicamente podría determinarse la concentración de analito por el método de las adiciones estándar.

El método de calibración por adiciones estándar consiste en añadir una cantidad constante de muestra junto con cantidades conocidas del analito de interés que van variándose. Esta mezcla de muestra y analito se enrasa a un volumen conocido y se mide normalmente. De esta forma, el corte con eje de abscisas será la concentración inicial de la muestra. (15)

Una vez se ha comprobado que no existe efecto matriz, se realiza una prueba t de comparación de varianzas. Esta prueba t puede ser tanto suponiendo varianzas iguales como varianzas desiguales. Esta prueba estadística nos da información sobre si ambas pendientes son comparables, aceptando que en caso de que se supere la prueba t, ambas pendientes son comparables y por tanto no existe un efecto matriz en las muestras.

De forma adicional y opcional a la prueba t puede realizarse una prueba F de Fisher, si bien este último estudio estadístico no aporta mucha más información respecto a la prueba t.

Por último, es necesario realizar también estudios de reproducibilidad y repetibilidad del método. La reproducibilidad interdía se estudió midiendo durante un mínimo de tres días las mismas muestras y observando como varía la señal en los diferentes días. La repetibilidad intradía se estudió midiendo las mismas muestras el mismo día con un mínimo de tres réplicas no consecutivas, con la intención de que la variabilidad de la medida fuese lo máximo posible.

Las medidas de reproducibilidad y repetibilidad fueron estudiadas con una prueba Q de Dixon entre valores extremos, dándose por buena si ambos valores superan la prueba. Adicionalmente, es posible calcular valores de desviación estándar y desviación estándar relativa entre las medidas.

1.6 Tratamiento estadístico de los resultados

Las señales obtenidas para cada concentración son el resultado de tres medidas de dos segundos. La recta de calibrado se obtiene posteriormente tras representar estas señales frente a las concentraciones y hacer el estudio de regresión, en el que se evaluarán diferentes parámetros como son la desviación estándar de los residuales ($S_{y/x}$), su disposición y su valor entre otros. Se llevó a cabo un proceso de eliminación de puntos discordantes, asegurando siempre un mínimo de puntos, de forma que las curvas fuesen lo más representativas posibles.

En el caso de este trabajo, se optó por determinar los parámetros de calidad en función de la variación de la relación entre ruido y señal en lugar de realizar repeticiones del blanco instrumental, por lo que los parámetros de calidad del método se obtuvieron de la siguiente manera. (16)

La determinación del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se obtuvo siguiendo las ecuaciones 2 y 3 tal y como está establecido por Miller.

$$[LOD] = \frac{3 \cdot s_{y/x}}{b} \quad (\text{Ec } 2)$$

$$[LOQ] = \frac{10 \cdot s_{y/x}}{b} \quad (\text{Ec } 3)$$

El intervalo de trabajo se expresa como el rango de concentraciones en las que se puede utilizar el método diseñado para la determinación de concentración de analito. Está acotado entre el límite de cuantificación y el último punto de la recta de calibrado, también conocido como límite de linealidad (LOL).

Los parámetros de la recta, su ordenada en el origen (a), así como la pendiente (b), tienen asociados unos límites de confianza. Para su cálculo se han utilizado las ecuaciones 4 y 5, donde t es un valor tabulado de la distribución t de Student de dos colas y n el grado de libertad, en este caso el número de puntos en la curva de calibrado.

$$a \pm t_{(n-2)}s_a \quad (\text{Ec 4})$$

$$b \pm t_{(n-2)}s_b \quad (\text{Ec 5})$$

En el momento de determinar concentraciones a partir de la curva de calibrado, es importante tener en cuenta los errores asociados tanto a la ordenada en el origen como a la pendiente, además de los errores aleatorios a los que están sujetas siempre las medidas. Para determinar este error global (S_{x_0}) se utiliza la ecuación 6.

$$S_{x_0} = \frac{s_{x/y}}{b} + \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 + \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Ec 6})$$

Ecuación 1: Formula para la obtención de S_{x_0}

En la ecuación 6 debe aclararse que m corresponde al número de réplicas de esa muestra y n al número de puntos utilizados en la curva de calibrado. Una vez obtenido el error asociado a la medida es necesario establecer su límite de confianza, el cual viene establecido por la ecuación 7.

$$X_0 \pm t_{(n-2)} \cdot s_{x_0} \quad (\text{Ec 7})$$

Donde X_0 corresponde con el valor obtenido y $t_{(n-2)}$ es el valor tabulado de la t de Student con $n - 2$ grados de libertad.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo es la puesta a punto de un método no validado desde cero, haciendo un estudio detallado de los diferentes factores que afectan al resultado obtenido. Desde el estudio de los parámetros instrumentales, como puede ser las condiciones de la llama, hasta los parámetros más puramente químicos, como puede ser las interferencias en la matriz de la muestra.

Resultará también importante en este trabajo la validación final del método de acuerdo con las directrices de calidad en los laboratorios que actualmente imperan.

Con el método seleccionado se busca la determinación de sodio y potasio en muestras de agua para consumo humano en diferentes municipios de la isla de Tenerife haciendo uso de las directrices marcadas en las normas de calidad para la toma de muestra.

La puesta en marcha de un método sistemático y sencillo para llevar a cabo el análisis de la muestra, en el que se produce el tratamiento de esta mediante un sistema en continuo, que evitará el gasto excesivo de reactivos que generalmente son utilizados en las determinaciones por espectrofotometría de llama. Esto enmarca el método dentro de las nuevas tendencias en química en las que prevalece el uso de compuestos poco contaminantes.

La revisión de la legislación vigente tanto de carácter nacional como europeo para conocer los límites paramétricos permitidos en las aguas de consumo. Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de los métodos de análisis relacionados con la determinación por espectroscopía de emisión atómica.

De forma complementaria, durante el trabajo en el laboratorio, aparecerán problemas y dificultades que se tratarán de solucionar con los medios disponibles y la formación recibida durante todo el proceso de aprendizaje.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos

Se utilizó cloruro sódico de Scharlab, con una pureza superior al 99,5% para análisis y código de producto SO02270500, como fuente de sodio, tanto a la hora de preparar las disoluciones para la curva de calibrado como cuando se utilizó como inhibidor de ionización en la determinación de potasio. Se preparó una disolución de 5000 mg·L⁻¹ a partir de la cual se prepararon las de concentraciones menores por dilución. (17)

Se utilizó cloruro potásico de Sigma Aldrich - Merck, con una pureza superior al 99,0% y código de producto P3911, para análisis como fuente potasio, tanto en las curvas de calibrado como cuando se utilizó como inhibidor de ionización en la determinación de sodio. Al igual que en el caso del sodio, se preparó una disolución de 5000 mg·L⁻¹ a partir de la cual se prepararon las de menor concentración.

Las disoluciones preparadas con las sales anteriormente descritas se compararon con patrones certificados. Para sodio se utilizó disolución patrón de sodio 1 g/L para EAS, código de producto 313192, de PanReac AppliChem mientras que para potasio se utilizó disolución patrón de potasio 1 g/L para EAS, código de producto 313190, también de PanReac AppliChem. Al comparar las señales obtenidas con el patrón certificado y las realizadas por disolución directa de sal no se apreciaron diferencias significativas, así que, por cuestiones de ahorro económico, se utilizaron las sales, incurriendo en un menor coste que al utilizar los patrones certificados.

Fue necesario hacer uso de acetileno (C₂H₂) disuelto *Alphagaz*TM de Air Liquide Healthcare, utilizado como gas oxidante en el instrumento de espectrofotometría de absorción atómica.

El agua desionizada se obtuvo directamente del servicio de agua desionizada instalado en la Sección de Química. Se utilizó como disolvente en todas las preparaciones.

3.2 Materiales e instrumentación

- Espectrofotómetro de emisión atómica SpectrAA 50B de Varian Inc con una cámara de atomización y mechero de aire/acetileno acoplado Mark 7 de Agilent Technologies.
- Software de control y análisis del instrumento suministrado por Varian Inc. El tratamiento de los datos se realizó con el software Microsoft Excel 365
- Bomba peristáltica Minipulse 3 de Gilson con un cabezal R8 de 8 canales. Se utilizaron tubos de silicona de dos diámetros diferentes.
- Aire comprimido obtenido directamente de la red del servicio de aire comprimido y vacío de la Sección de Química.
- Material de vidrio volumétrico y no volumétrico propiedad del Departamento de Química.

3.3 Procedimiento experimental

El montaje principal consiste en una bomba peristáltica de varios canales en los que se produce la dilución de la muestra con el supresor de ionización. Esta mezcla llega a un tubo donde es aspirado hacia el espectrofotómetro. (18)

La opción de utilizar un sistema en continuo es prioritaria por las ventajas que conlleva en el consumo de reactivos y la poca cantidad de muestra que se requiere para el análisis, lo que entra en consonancia con los principios de la química verde analítica, tal y como se ha comentado anteriormente.

En la figura 2 se muestra de forma resumida el montaje experimental utilizado en el método.

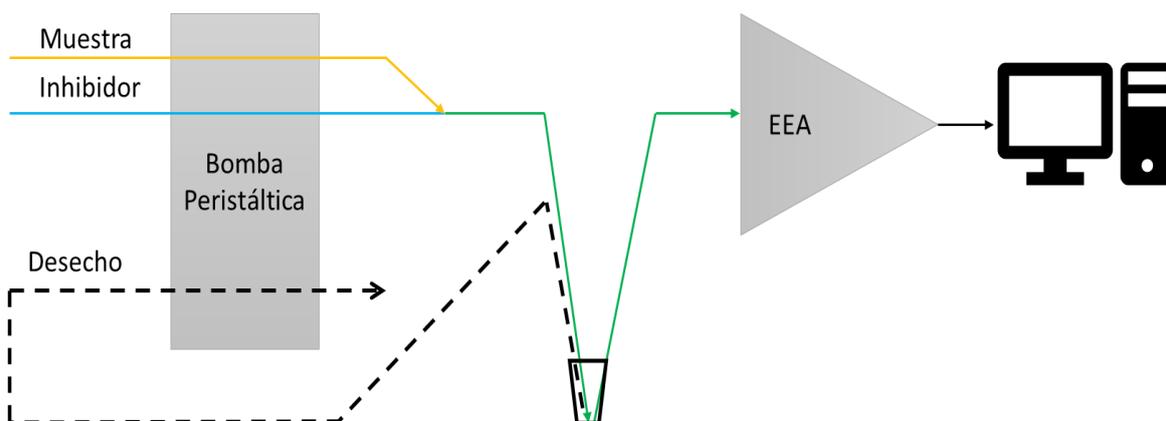


Figura 2: Esquema del montaje experimental

Se utilizó un total de tres canales de la bomba peristáltica. Para cada canal se disponen de tres tipos de tubos de silicona intercambiables; los de color negro con un caudal aproximado de $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a la velocidad establecida, los de color amarillo con un caudal de $5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y finalmente los de color violeta con un caudal de $6,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Estos caudales se calcularon a posteriori de forma experimental tal y como se explica en el apartado 4.1.3. ya que cada caudal depende directamente de la velocidad a la que se ha puesto la bomba peristáltica. Lo importante es distinguir que existen tres tipos de tubos (negros, violetas y amarillos) con diámetros internos que aumentan de la misma forma y que el caudal dependerá de la velocidad a la que se ponga en la bomba.

Para el canal de muestra se decidió utilizar un tubo de silicona con caudal de $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ mientras que para el canal de supresor se utilizó uno con caudal de $6,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Ambos canales se unían en una conexión en forma de T que desembocaba en un tubo de centrífuga. Dado que el caudal de aspiración del instrumento de EEA es inferior al del sistema, es necesario introducir un tercer canal como desecho.

Este tercer canal, equipado también con un tubo con caudal de $6,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ se utilizó como desecho. Su función consistía en mantener la dilución constante en el tubo de centrífuga, aspirando el sobrante hacia el desecho. Fue de vital importancia garantizar que la dilución siempre fuese la misma, por lo que este canal se encontraba aproximadamente a un cm por encima de la entrada de muestra. Esto permitía una rápida absorción del exceso y que la cantidad depositada en el tubo fuese la mínima posible.

El propio capilar del espectrofotómetro de llama se encontraba dentro del mismo tubo de centrífuga, ligeramente por debajo del canal de entrada de muestra y este a su vez debajo del canal de aspiración a desecho. De esta forma se garantizaba que llegase al instrumento la mezcla de forma óptima y se realizase la medida, que quedaba registrada en el software del PC.

3.3.1 Optimización de la señal en el espectrofotómetro

Para obtener la máxima señal posible fue necesario orientar el mechero acoplado al espectrofotómetro mientras se hacía pasar la disolución de mayor concentración en el analítico de interés, en este caso, las disoluciones madre de $5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada elemento. En este paso no fue necesario utilizar el inhibidor de ionización por lo que se producía la aspiración directa al espectrofotómetro.

El propio software del instrumento da una estimación de la señal así que únicamente fue necesario dejarlo en la posición con mayor señal, que coincidía aproximadamente con la posición del haz de luz.

El mechero utilizado tenía un paso óptico de 10 cm con una llama de flujo laminar de aire/acetileno.

3.3.2 Determinación del tiempo de recorrido de la muestra

El cálculo del tiempo de permanencia de la muestra en el sistema fue experimental, para ello, se determinó el tiempo que tardaba la muestra en llegar hasta el espectrofotómetro tras introducir el capilar dentro del recipiente de la muestra. El estudio se realizó únicamente para sodio, aunque el tiempo de recorrido es independiente del elemento a determinar, por lo que es el mismo para potasio.

Se hizo pasar por el canal de muestra agua destilada mientras que por el de supresor de ionización se pasó una disolución $5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de potasio. Una vez purgado el canal con el agua destilada, se ponía en marcha el espectrofotómetro e inmediatamente se cambia el capilar a la muestra de agua del grifo.

El tiempo de recorrido es aquel que transcurre desde que se cambia el capilar de disolución hasta que se produce un aumento de señal, debido a la llegada del sodio presente en el agua del grifo.

Tras hacer diferentes modificaciones en la velocidad, se decide establecer la bomba a 29 rpm, en sentido horario, consiguiendo que el tiempo de recorrido sea de 20 segundos aproximadamente. Para asegurar la entrada de la muestra y asegurar la mayor estabilidad en la medida, se establece que las medidas consistirán en 5 repeticiones de 1 segundo, con un tiempo de espera entre medidas de 22 segundos.

3.4 Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en botellas de PET que garantiza que no haya transferencia de sodio y potasio del envase hacia la muestra y por tanto se evita la contaminación por el envase. (19)

Puesto que los análisis son puramente fisicoquímicos se utilizaron botellas de aguas previamente lavadas y enjuagadas con la muestra. Se optó por utilizar botellas recicladas para seguir acorde a los principios de la química analítica verde, además de por cumplir las condiciones descritas en la norma para los envases de PET. Para la toma de la muestra se deja correr el grifo durante unos treinta segundos, se lava la botella y tras desechar las aguas de lavado, se recoge la muestra.

Se toman muestras de diferentes zonas de Tenerife, a diferentes altitudes y vertientes de la isla, tratando que las muestras sean lo más heterogéneas posibles. Esto se consigue acudiendo a recoger muestras a municipios donde el agua corriente provenga de la desalación de aguas como puede ser las de los municipios de Santa Cruz de Tenerife o Arona frente a otras provenientes de galerías o pozos entubados como pueden ser las de San Cristóbal de La Laguna. (20)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de parámetros instrumentales

4.1.1 Estudio de caudales de gases

Una vez optimizado el mechero en la posición de máxima señal, se varió el flujo de oxidante, en este caso acetileno, que llegaba a la llama. El flujo de oxígeno no se modificó, por lo que los valores de acetileno son a caudal de oxígeno constante. Los valores de la señal son la media de cinco medidas durante un segundo.

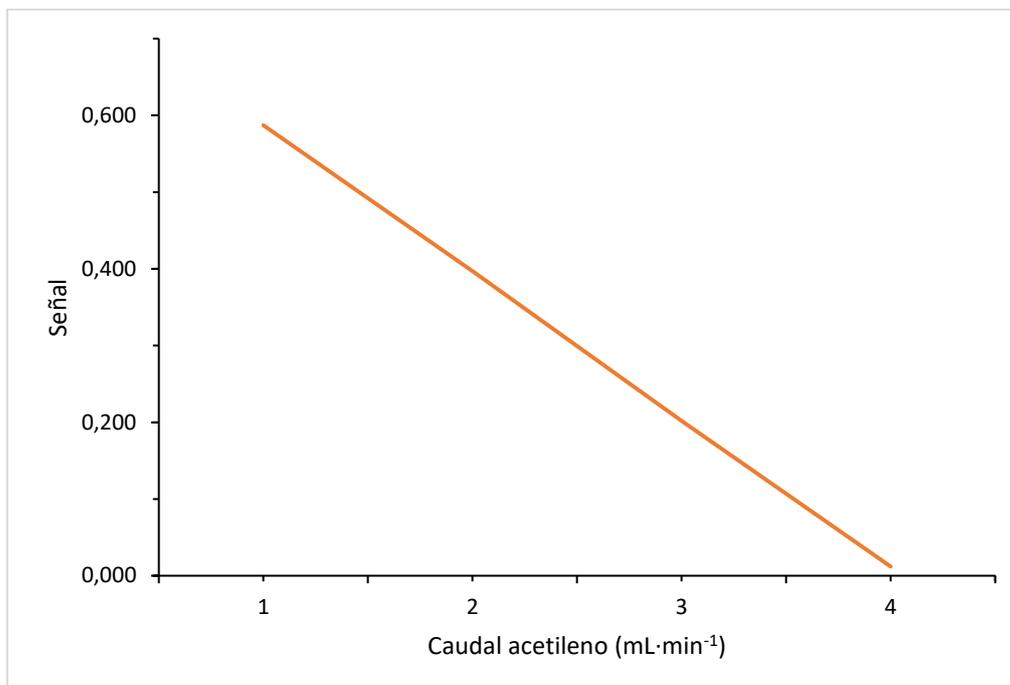


Figura 3: Variación de la señal con el caudal de acetileno para potasio

Como se observa en la figura 4 hay una relación inversamente proporcional entre el valor de la señal y el caudal de acetileno en el instrumento. Si bien la señal inicial puede parecer elevada ésta se trata de una medida directa sobre agua del grifo del propio laboratorio, sin supresor de ionización ni dilución, puesto que el parámetro de interés era la variación de la señal.

A medida que aumenta la cantidad de acetileno, la llama es más energética, por lo que mayor cantidad de iones se excitan, produciéndose un aumento de la ionización entre átomos iguales. Los iones no pueden medirse por EEA, por lo que la señal decae a mayor poder oxidante. Este aumento también afecta a la llama, que pasa de un color naranja oscuro hacia amarillo intenso, probablemente debido a la presencia de acetona, utilizada como disolvente en las presentaciones comerciales de acetileno comprimido.

Se decide utilizar un caudal de 1 mL·min⁻¹, llegando a una situación de compromiso en la que se obtiene una sensibilidad aceptable con el menor gasto de oxidante posible, maximizando el ahorro de reactivos en el método.

El caudal de oxígeno se mantiene constante a 1,5 mL·min⁻¹ ya que actualmente no es posible modificarlo en el instrumento. Al utilizar un caudal bajo de oxidante no es necesario aumentar el caudal de aire, quedando de forma óptima en 1 mL·min⁻¹ acetileno/ 1,5 mL·min⁻¹ de aire.

No se plantea el uso de llamas más energéticas como puede ser la de óxido nitroso/acetileno ya que únicamente favorecería la ionización de los analitos, no pudiendo ser detectados.

4.1.2 Influencia de la concentración del supresor de ionización

La determinación de los caudales de cada uno de los tubos utilizados en los diferentes canales de la bomba se realizó de forma experimental. Para ello se hizo pasar por cada uno de los tubos, previamente purgados, agua del grifo durante dos minutos exactos.

Cada canal desembocaba en una probeta, por lo que era posible medir el volumen directamente. Para obtener el volumen únicamente es necesario dividir entre el tiempo en minutos que se mantuvo la bomba en funcionamiento tal y como se expresa en la ecuación 8.

$$Q \text{ (mL} \cdot \text{min}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Volumen (mL)}}{\text{tiempo (min)}} \quad \text{(Ec. 8)}$$

De esta forma se obtiene un caudal para cada tubo, permitiendo conocer de manera aproximada el factor de dilución al que se está sometiendo a la muestra, si bien no es un parámetro necesario en el momento de realizar la cuantificación de los analitos.

4.1.3 Influencia de la concentración del supresor de ionización

Se realizó el estudio de la señal de analito variando la concentración del supresor. Como muestra de estudio también se utilizó la propia agua del grifo del laboratorio. Como supresor de ionización se utiliza el elemento contrario en una concentración mucho más alta, de forma que se reduce considerablemente la ionización del analito de interés con la consiguiente disminución del ruido en la señal.

Como supresor de ionización en la determinación de sodio se utilizó el cloruro potásico (KCl) mientras que para el potasio se utilizó cloruro sódico (NaCl). (21)

La relación entre la señal y la concentración del supresor de ionización para ambos elementos se puede ver en la figura 4.

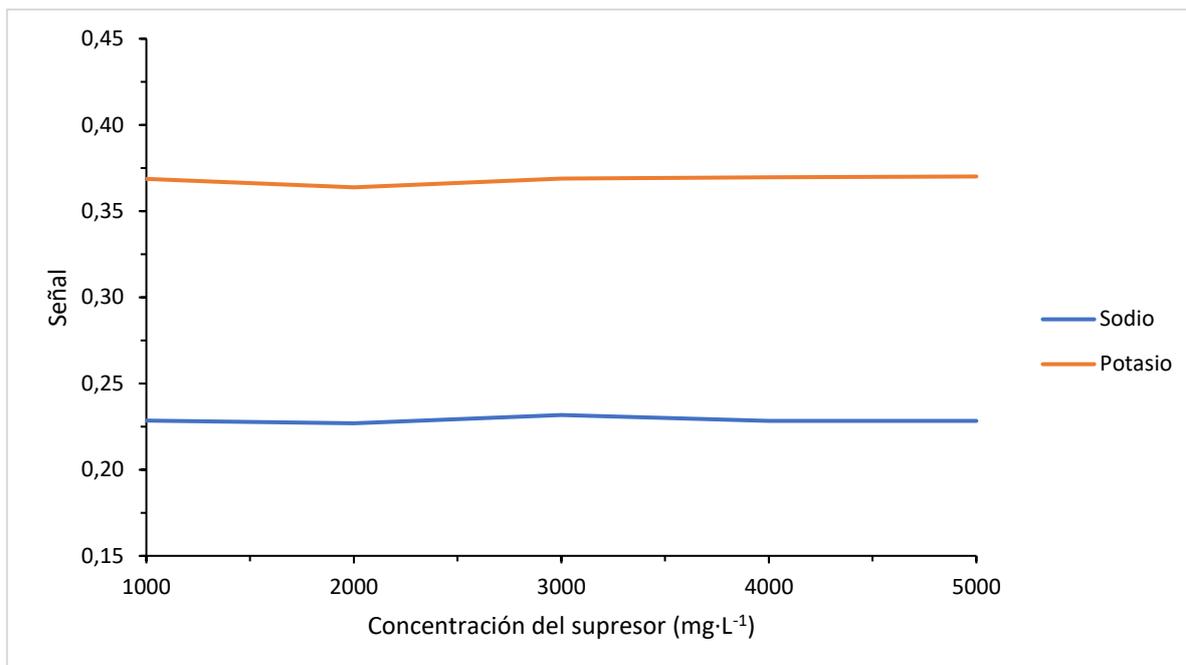


Figura 4: Variación de la señal respecto a la concentración de supresor

Al no apreciarse una diferencia considerable entre las diferentes concentraciones de supresor, se decide utilizar el supresor de ionización a la menor concentración estudiada, es decir, a 1000 mg·L⁻¹.

Es de esperar que una concentración tan alta del elemento contrario favorezca su ionización y por tanto se reduzca la del analito de interés.

Se plantea la posibilidad de utilizar litio como supresor de ionización en lugar del elemento contrario. Para estudiar el comportamiento del litio, se utilizó una disolución de cloruro de litio (LiCl), repitiendo el proceso del estudio anterior. (22)

No se apreció una diferencia considerable en las señales para ninguno de los dos elementos que indicase que fuese necesario utilizar litio como supresor de ionización, teniendo además su sal un mayor un coste, por lo que se mantuvo el metal contrario a una concentración de 1000 mg·L⁻¹ como supresor.

4.2 Toma de muestras

En la etapa inicial del estudio se tomaron cinco muestras de aguas de consumo repartidas por toda la isla de Tenerife. Las primeras tres se encuentran en la vertiente sur y coinciden en orden con Las Galletas (Arona), Cho (Arona), y Candelaria. Las dos últimas fueron tomadas en la zona metropolitana, respectivamente en los barrios de Los Andenes y en el de Las Chumberas, ambos situados en el término municipal de San Cristóbal de La Laguna.

Si bien la intención era recoger más muestras, en torno a la veintena, a lo largo de toda la isla de Tenerife, debido al desarrollo del COVID-19 y las medidas de asociadas, no fue posible analizar todas las muestras de las que se disponía.

En la figura 5 se muestra una aproximación de donde fueron recogidas las muestras analizadas.



Figura 5: Distribución geográfica de las muestras

Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente en el laboratorio, siendo analizadas en los siguientes cuatro días desde la recogida de la muestra.

4.3 Parámetros experimentales

4.3.1 Caudales de muestra y supresor de ionización

Inicialmente se probaron diferentes disposiciones de los canales, variando el tipo de tubo que se utilizaba en cada uno y modificando también la velocidad a la que se ponía la bomba peristáltica. Se llegó a una situación óptima del sistema en el que la dilución en el tubo de mezcla permanecía constante, es decir, el volumen que entraba en el tubo era igual al que salía hacia el espectrofotómetro de llama y hacia el tubo de desecho. Se mantuvo un tubo violeta ($6,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) para el supresor de ionización y uno negro ($2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) para la muestra. El desecho se mantuvo con uno violeta.

Con este estudio se plantea observar la variación de señal al invertir los caudales fijados inicialmente. Esto implica que el caudal de muestra sea aproximadamente 3,3 veces superior al del supresor de ionización.

Con esta disposición se obtiene que la señal de sodio se reduce a 0,2617 y la de potasio a 0,4243 respecto a las de la disposición normal en las que el sodio tiene una señal de 0,1165 y el potasio de 0,2385.

Un valor demasiado alto de la señal puede ir contra la linealidad del método. Al introducirse mucha más muestra que inhibidor pueden producirse procesos de autoabsorción en la llama.

Al disminuir la dilución de la muestra, es muy probable que haya que tener que trabajar en rangos de concentración mayores, provocando que sea necesaria el tratamiento de la muestra en aquellas que presentan una alta concentración de los analitos a determinar. Se produce además un mayor gasto de muestra lo cual es justamente lo contrario a lo buscado si bien se produce una reducción del inhibidor, al no ser sustancias tóxicas, no tiene tanta importancia.

Por todo esto, se optó por dejar los caudales como estaban establecidos, siendo el caudal de inhibidor aproximadamente 3,3 veces superior al de la muestra lo que asegura una buena dilución.

4.4 Curvas de calibrado y parámetros de calidad

4.4.1 Falta de linealidad en las curvas

En la preparación de la curva de calibrado para el sodio se utilizó un intervalo de trabajo con concentraciones que iban desde $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, aumentando cada punto en $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ su concentración.

La recta de calibrado obtenida para el sodio, sin realizar el estudio de regresión, se presenta a continuación en la figura 6.

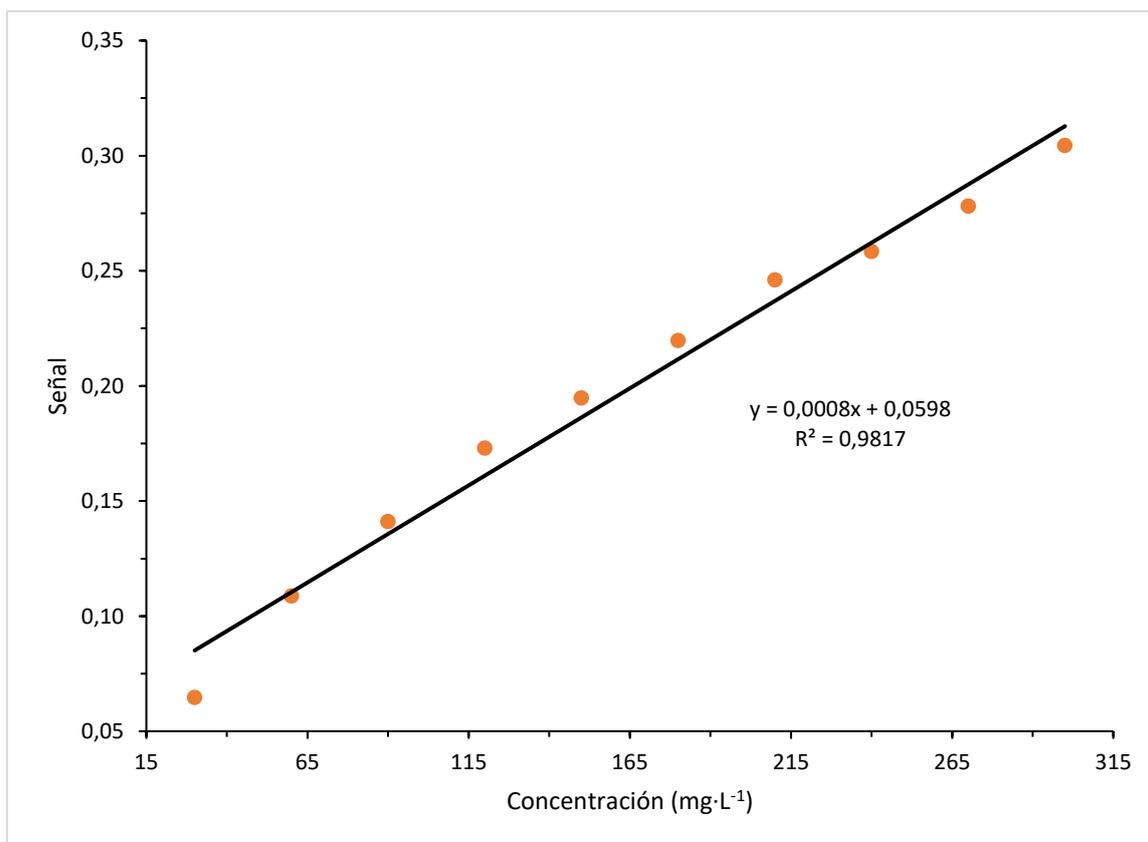


Figura 6: Curva de calibrado para el sodio incluyendo todo su rango de concentraciones

De la forma de la curva se desprende la falta de linealidad en el intervalo estudiado. Como posible solución, se optó por dividir la curva de calibrado en dos diferentes, una con concentraciones que van desde 15 mg·L⁻¹ hasta 150 mg·L⁻¹ de sodio, para cubrir el intervalo inferior, y otra con concentraciones desde 120 mg·L⁻¹ hasta 260 mg·L⁻¹ de sodio con el fin de cubrir el intervalo superior.

Esta división en dos de las curvas de calibrado se llevó a cabo también en el caso del potasio, donde existe el mismo problema de linealidad que con el sodio tal y como se puede observar a continuación en la figura 7.

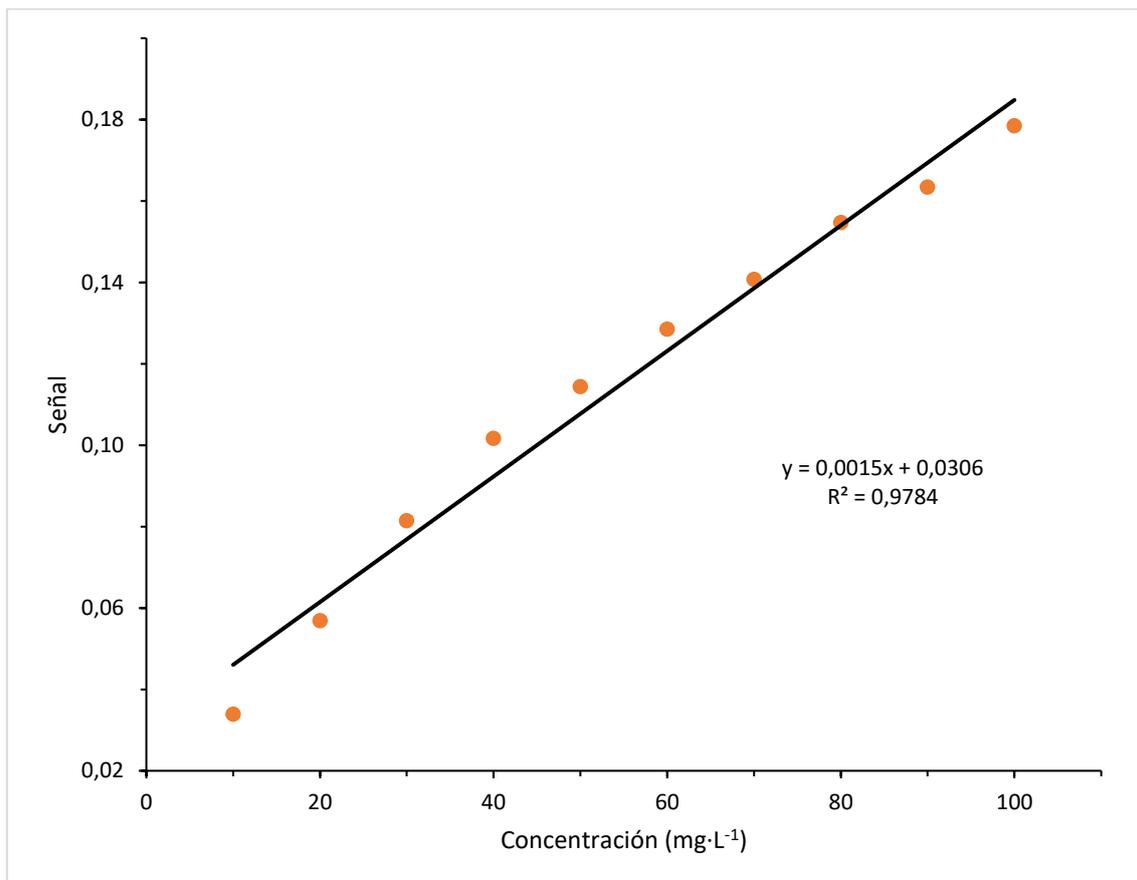


Figura 7: Curva de calibrado para el potasio incluyendo todo el rango de concentraciones

Para el caso del potasio se optó por trabajar con una curva con concentraciones desde 10 mg·L⁻¹ de potasio hasta 45 mg·L⁻¹ de potasio para el intervalo más bajo mientras que el superior el rango de concentración fue desde 45 mg·L⁻¹ de potasio hasta 90 mg·L⁻¹ de potasio.

Este comportamiento de las curvas se explicaría por fenómenos de autoabsorción en la llama además de la propia naturaleza de las curvas en espectrofotometría de emisión atómica, que siempre poseen cierta curvatura. Al trabajar en rangos de concentración menores lo que se intenta es trabajar en un intervalo en el que la relación entre la concentración y la señal sea lo más lineal posible. Además, se insertó un patrón inicial en el instrumento del orden de cien veces mayor concentración, lo que obliga a una mayor linealidad en los rangos de concentración estudiados.

El haber dividido las rectas de calibrado en dos supone el uso de un total de cuatro curvas de calibrado para poder hacer frente a todos los tipos de muestra, en función de la concentración de los analitos de interés.

A pesar de esto, la gran mayoría de las muestras utilizarán la curva de altas concentraciones de sodio mientras que en el caso del potasio se utilizará la de baja concentración, motivo por el que se le da más importancia a estas, ya que cubren la práctica totalidad de las muestras estudiadas.

4.4.2 Curva de calibrado de sodio

Se procede por tanto a la división de la curva de calibrado para el sodio, de acuerdo con las dos pendientes observables en la figura 8.

A continuación, en la tabla 2, se muestran las concentraciones preparadas para ambas curvas de calibrado en el caso del sodio, correspondiendo la primera columna con el intervalo inferior y la segunda con el superior. En ambos casos las unidades corresponden a $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sodio.

Tabla 1: Valores de concentración para las curvas de sodio

Baja concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Alta concentración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
15	120
30	140
45	150
60	170
75	180
90	200
105	210
120	220
135	240
150	260

Tras realizarse el estudio de regresión para ambas curvas de calibrado y eliminando los puntos discordantes, de acuerdo con los criterios anteriores, se obtuvieron las siguientes curvas de calibrado para sodio. En la figura 8 se presentan las curvas de calibrado y además se acompañan de las ecuaciones de la recta, así como de los coeficientes de correlación (R^2).

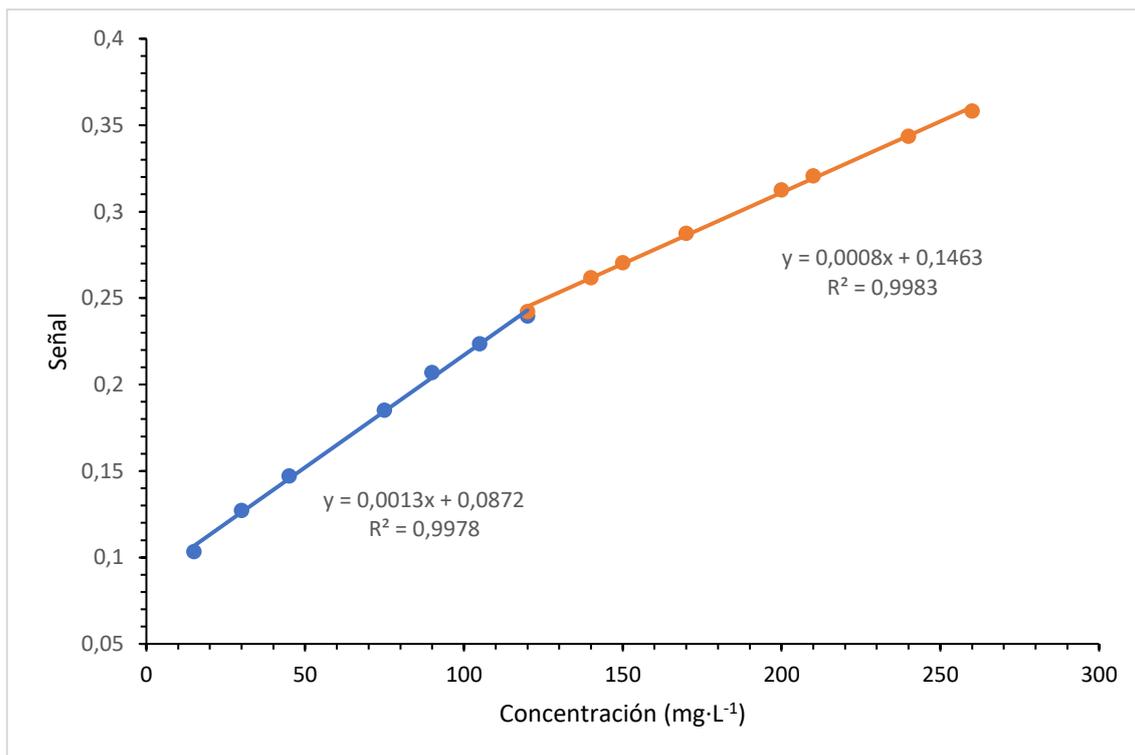


Figura 8: Curva de calibrado para el sodio

En la tabla 3 se presentan los parámetros de calidad para ambas curvas de calibrado de sodio. Los intervalos de confianza y los diferentes límites se han obtenido de acuerdo con las ecuaciones explicadas en el apartado 4.3.1

Tabla 3: Ecuaciones de la recta y parámetros de calidad para el sodio		
	Concentración baja	Alta concentración
Ec. recta	$(0,0013 \pm 7,03 \cdot 10^{-5})x + (0,0872 \pm 5,47 \cdot 10^{-3})$	$(0,0008 \pm 3,35 \cdot 10^{-5})x + (0,1463 \pm 6,43 \cdot 10^{-3})$
LOD (mg·L⁻¹)	6,13	-
LOQ (mg·L⁻¹)	20,4	-
LOL (mg·L⁻¹)	20,4 - 120	120,0 - 260,0

Analíticamente carece de sentido hablar de límite de detección y de cuantificación en la recta para concentraciones altas, ya que siempre que haya una concentración menor a 120 mg·L⁻¹ se utilizará la curva correspondiente a concentraciones bajas, motivo por el que no se detalla ni el LOD ni el LOQ en ese caso.

4.4.3 Curva de calibrado de potasio

Se repitió el proceso de división de la curva de calibrado del potasio. A continuación, en la tabla 4 se muestran las concentraciones preparadas para ambos intervalos. En ambos casos las unidades se corresponden a mg·L⁻¹ de potasio.

Tabla 4: Concentraciones utilizadas en la calibración de potasio	
Concentración baja	Concentración alta
-	45
5	50
10	55
15	60
20	65
25	70
30	75
35	80
40	85
45	90

Tras realizarse el análisis de regresión y el estudio de los residuales, se presentan en la figura 8 las curvas de calibrado para potasio. Se añaden además las ecuaciones de la recta junto a los coeficientes de correlación.

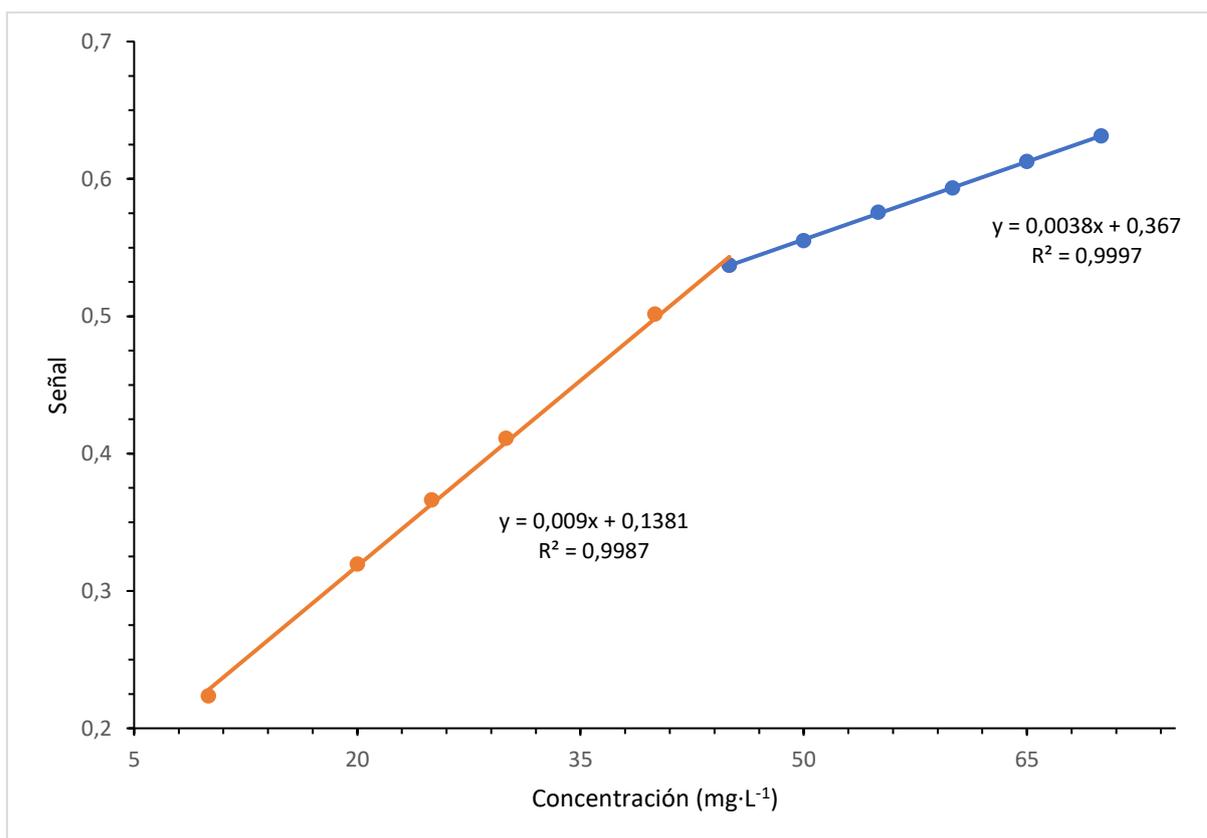


Figura 9: Curva de calibrado para el potasio

Las ecuaciones de cada una de las curvas, así como sus parámetros de calidad se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Ecuaciones de la recta y parámetros de calidad de potasio		
	Baja concentración	Alta concentración
Ec. recta	$(0,0090 \pm 4,57 \cdot 10^{-4})x + (0,1414 \pm 1,40 \cdot 10^{-2})$	$(0,0038 \pm 8,8 \cdot 10^{-5})x + (0,3669 \pm 5,16 \cdot 10^{-3})$
LOD (mg·L⁻¹)	1,58	-
LOQ (mg·L⁻¹)	5,28	-
LOL (mg·L⁻¹)	5,28 - 45,00	45,00 - 70,00

Siempre que haya una concentración menor a 45 mg·L⁻¹ se utilizará la curva correspondiente a concentraciones bajas, al ser un acaso análogo al explicado para el sodio, donde carece de sentido la determinación del LOQ y el LOD en la curva de alta concentración.

4.5 Validación del método

4.5.1 Análisis estadístico

La validación del método se llevó a cabo por comparación con el método de las adiciones estándar. Para ello, se preparó una curva de calibrado siguiendo el método propuesto y se comparó la pendiente obtenida con la de las adiciones estándares.

Si ambas pendientes resultan paralelas, se considera que no existen interferencias apreciables y por tanto no hay efecto matriz. Esto daría por válido el método de determinación planteado.

Se realizó un estudio estadístico de los resultados obtenidos con el fin de dar mayor solidez a la validez del método. Para ello, se realizaron un mínimo de tres réplicas de calibrados y adiciones estándar de forma que tras comprobar que no hay efecto matriz se realiza una prueba t para comprobar si son significativamente iguales, lo que desembocará en una prueba F de Fisher posterior, que determinará que ambas varianzas son iguales, y los métodos comparables.

4.5.2 Estudio de interferencias de la matriz

4.5.2.1 Estudio de adiciones estándar en el sodio

La validación por adiciones estándar del sodio se realizó tanto para la curva de concentraciones más bajas como a la de concentraciones elevadas. Tras obtener ambas pendientes, se representan en un mismo gráfico las dos pendientes. En la figura 10 se presentan los resultados obtenidos para las concentraciones más bajas.

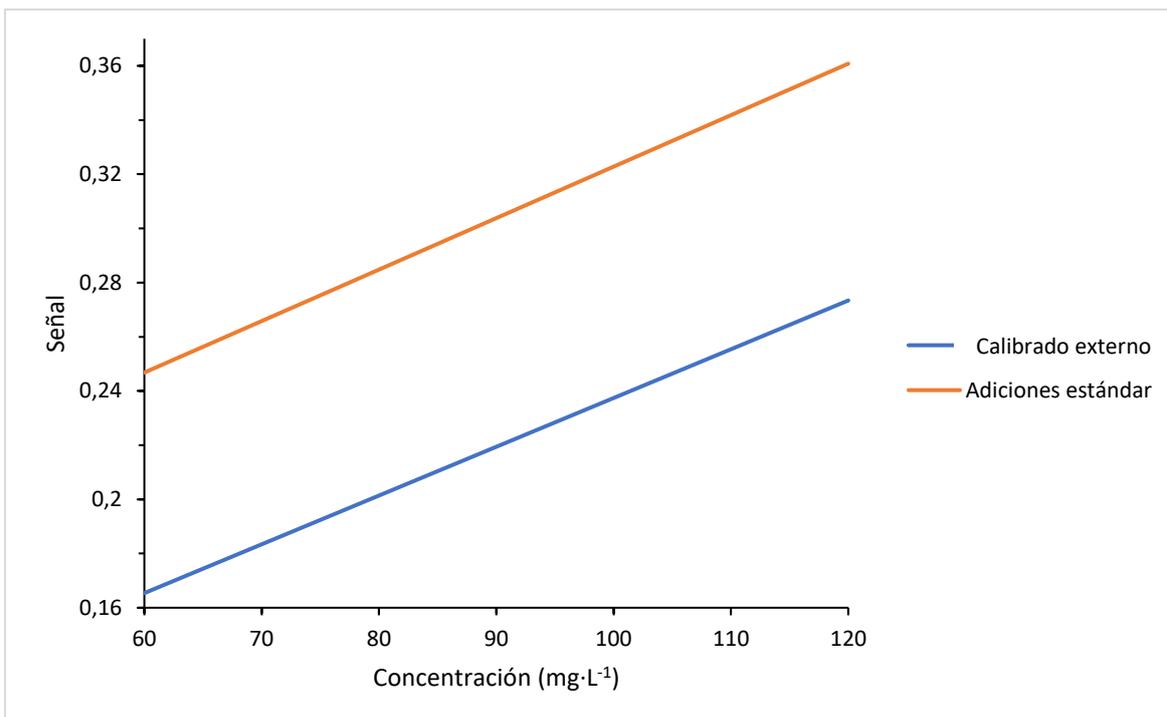


Figura 10: Comparativa de adiciones estándar y calibrado para el sodio en concentración baja

Para llevar a cabo el estudio de la curva de concentraciones más altas, se estimó la concentración de sodio en el agua del grifo utilizada, y se prepararon las adiciones estándar de la misma forma, tratando que el mínimo de sodio en las muestras de adiciones estándar coincidiese con el primer valor de concentración en la curva de calibrado, es decir, 140 mg·L⁻¹.

En la figura 11 se representan ambas rectas. Como puede observarse, en este caso el gráfico comienza en 140 mg·L⁻¹ en consonancia con lo expresado en el párrafo anterior.

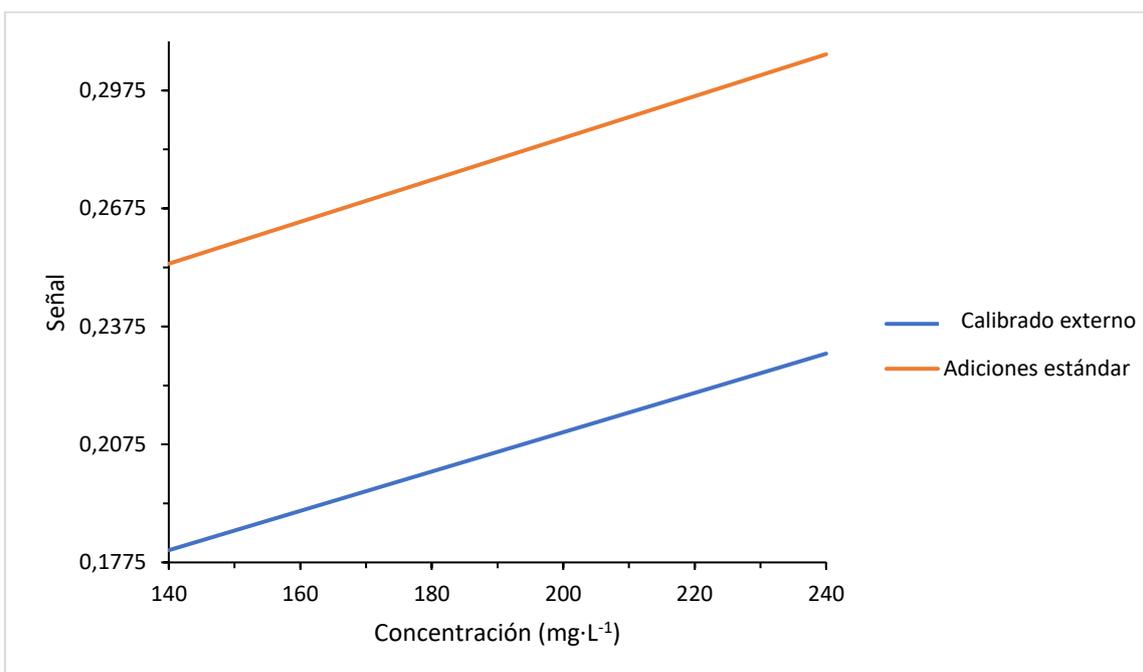


Figura 11: Comparativa de adiciones estándar y calibrado para el sodio en concentración alta

Aunque se había establecido un mínimo de tres réplicas, este estudio se realizó con cinco tanto de la curva como del calibrado, lo que da una mayor solidez estadística a los datos obtenidos.

Teniendo, por tanto, dos valores de las pendientes para cada réplica, correspondiente a la curva de calibrado y otro a la de adiciones estándar, se realizó una prueba t suponiendo varianzas iguales. En función del resultado de este, se realizó para finalizar una prueba F de Fisher, con la intención de confirmar que las varianzas de ambos conjuntos de pendientes son homogéneas.

Los resultados obtenidos en la prueba t se presentan a continuación en la tabla 6. Se entenderá que la prueba t es superada siempre que el valor experimental de la t sea inferior al valor de t tabulado en las distribuciones de dos colas.

	Curva conc. Baja	Curva conc. Alta
Grados de libertad	5	5
t experimental	1,45	3,31
Valor crítico de t (una cola)	2,90	3,75
Valor crítico de t (dos colas)	3,36	4,60

Tras superar la prueba t y tener la seguridad de que se trata de varianzas iguales, se realiza la prueba F de Fisher para el estudio de varianzas homogéneas. En caso de que el valor experimental de F sea menor que el valor tabulado, se aceptará que ambas varianzas siguen una distribución F, y queda por tanto validado el método.

	Curva conc. Baja	Curva conc. Alta
Conjunto de datos	4	5
Valor crítico para F (una cola)	29,46	15,98
F	12,96	6,56

Puesto que en ambos casos el valor de F es inferior al de los valores críticos de F, con un intervalo de confianza del 99%, se puede afirmar que no existen diferencias apreciables entre ambas pendientes y el método queda finalmente validado tanto para la curva de concentración baja como para la de concentración alta.

4.5.2.2 Estudio de adiciones estándar en el potasio

El procedimiento de validación del método por adiciones estándar en el caso de potasio es el mismo que el seguido para sodio. En la figura 12 se muestra el resultado para la curva correspondiente a las concentraciones más bajas.

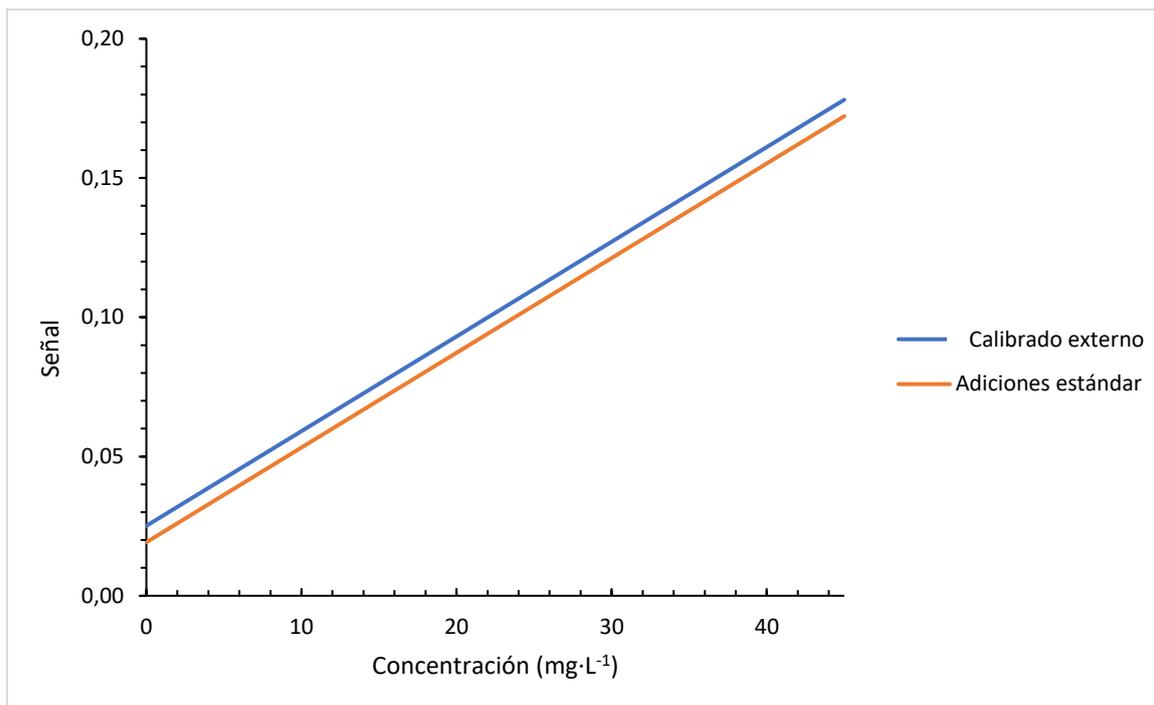


Figura 12: Comparativa entre la curva de calibrado y la de adiciones estándar para concentraciones bajas de potasio

En este caso se ve como ambas curvas son paralelas y hay muy poca distancia entre ellas, por lo que queda descartado el efecto matriz para muestras con concentraciones inferiores a 45 mg·L⁻¹ de potasio.

Al igual que se hizo en el caso del sodio, se estudió también el posible efecto matriz en la curva de mayor concentración de potasio. La comparativa entre la curva de calibrado y las adiciones estándar se presentan en la figura 13.

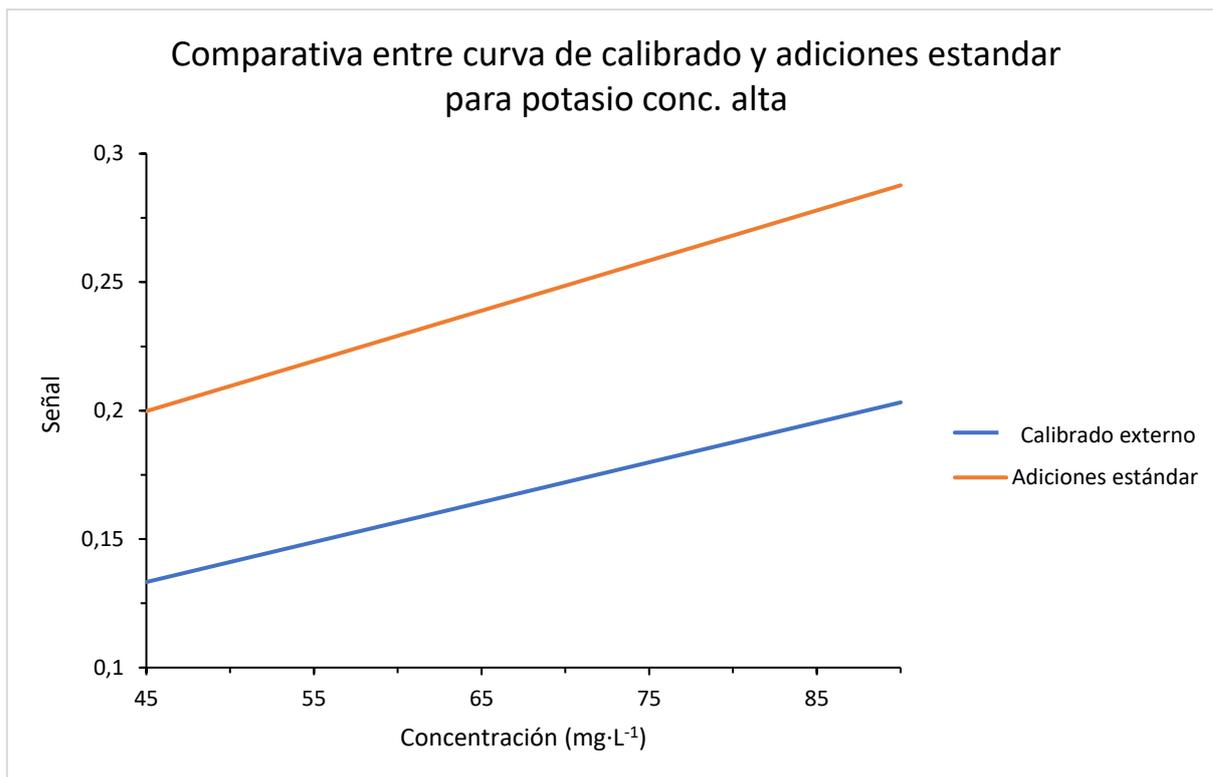


Figura 13: Comparativa entre la curva de calibrado y la de adiciones estándar para concentraciones altas de potasio.

En principio, ambas curvas parecen ser relativamente paralelas, si bien hay una diferencia significativa entre ellas. Se saldrá de dudas al realizar la prueba t.

Los resultados obtenidos en la prueba t suponiendo varianzas homogéneas se presentan a continuación en la tabla 8.

Tabla 8: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Curva conc. Baja	Curva conc. Alta
Grados de libertad t experimental	5	-
Valor crítico de t (una cola)	2,02	-
Valor crítico de t (dos colas)	2,57	-

Tal y como se puede ver en la tabla 8, el método propuesto supera la prueba t para concentraciones bajas de potasio, aunque no lo supera en el caso de concentraciones altas de potasio. En caso de que las muestras de potasio analizadas contengan concentraciones superiores a 45 mg·L⁻¹ en potasio.

Si hubiese muestras de concentración superior, sería necesario la adaptación de diferentes medidas como pueden ser el tratamiento previo de la muestra por dilución o modificar los parámetros del montaje instrumental, de forma que la dilución sea mayor, aumentando por ejemplo la velocidad de la bomba o utilizando otro tubo.

No puede achacarse esto a un posible efecto matriz, ya que como se observa en la Figura 13, la recta de la curva de calibrado y la de las adiciones estándar son paralelas entre sí, descartándose el efecto matriz. Es probable que sea una cuestión de linealidad que impide que ambas curvas sean comparables.

Una vez superada la prueba t se realiza la prueba F para terminar de validar el método.

Tabla 9: Prueba F para varianzas de dos muestras		
	Curva conc. Baja	Curva conc. Alta
Conjunto de datos	5	-
Valor crítico para F (una cola)	15,98	-
F	9,15	-

Al ser el valor crítico menor al valor tabulado de F, se da por validado el método en el caso de la curva de baja concentración. En el caso de la curva de alta concentración, al no superar la prueba t anterior no tiene sentido estadístico realizarle la prueba F, ya que no la superará.

Por tanto, se considera que no existe efecto matriz en ninguno de los casos y queda validado el método para la zona de bajas concentraciones de potasio.

4.5.3 Repetibilidad y reproducibilidad

La repetibilidad intradía se llevó a cabo con cinco réplicas tanto de la curva de calibrado como de muestras reales. Posteriormente se realizó una prueba Q de Dixon a las concentraciones obtenidas para cada muestra, tomando los valores más alejados entre sí. Al ser la prueba superada, se considera que no hay diferencias apreciables entre los valores registrados en un mismo día.

Además de la prueba Q de Dixon, se presenta como dato adicional la desviación estándar relativa (RSD) entre las medidas de una misma muestra.

La reproducibilidad interdía se estudió determinando la concentración de muestras reales y realizando también la prueba Q de Dixon, al igual que con la repetibilidad. Se hicieron medidas durante tres días consecutivos.

4.5.3.1 Repetibilidad del sodio

Los valores obtenidos para el sodio se presentan en la tabla 10, que incluye además los resultados de la prueba Q de Dixon junto con los valores de RSD. Se realizaron cinco réplicas de cada una de las muestras.

	M1 - Las Galletas	M2 - Cho	M3 - Candelaria	M4 - Las Chumberas	M5 - Los Andenes
Q₀ Intradía	0,248	0,653	0,211	0,271	0,328
RSD (%)	1,2%	0,6%	1,8%	1,1%	0,9%

El valor crítico de la prueba Q de Dixon para cinco grados de libertad es 0,710 para un grado de confianza del 95% y de 0,821 para un grado de confianza del 99%. En este caso, los valores son todos aceptados en las condiciones más estrictas, con un 95% de confianza.

Las RSD obtenidas para todas las muestras analizadas es baja, inferior en todos los casos al 2%, lo que indica que hay poca variabilidad entre las medidas realizadas en un mismo día. Para dar más variabilidad a los valores, las medidas de las muestras no se hicieron de forma consecutiva, sino que fueron aleatorias, alternando entre ellas.

4.5.3.2 Reproducibilidad del sodio

Del mismo modo que para la repetibilidad, se realizó una prueba Q de Dixon entre los valores extremos, de forma que, si se aceptan, se da por buena la serie de medidas obtenidas.

	M1 - Las Galletas	M2 - Cho	M4 - Las Chumberas	M5 - Los Andenes
Q₀ Intradía	0,405	0,210	0,502	0,536
RSD (%)	2,8%	3,5%	1,1%	3,1%

Puesto que las muestras se midieron durante tres días consecutivos, los grados de libertad para la prueba Q de Dixon son 3. El valor tabulado para esos grados de libertad y un grado de confianza del 95% es de 0,970 mientras que para un grado de confianza del 99% es de 0,994. En este caso se aceptan todos los valores en las condiciones más estrictas, con un 95% de confianza.

En este caso las RSD obtenidas son un poco superiores, oscilando entre el 1,1% y el 3,5%, inferior al 5% en todos los casos, por lo que se puede considerar que el método tiene alta reproducibilidad, más aun teniendo en cuenta la alta variabilidad de las medidas en los sistemas de fotometría de llama.

4.5.3.3 Repetibilidad del potasio

En la tabla 12 se muestran los valores obtenidos para el potasio, así como el valor experimental de la prueba Q de Dixon así como la RSD. Se realizaron cinco réplicas de cada una de las muestras.

Tabla 12: Valores de Q de Dixon y RSD obtenidos en la determinación de la repetibilidad del potasio en muestras reales

	M1 - Las Galletas	M2 - Cho	M3 - Candelaria	M4 - Las Chumberas	M5 - Los Andenes
Q₀ Intradía	0,332	0,029	0,145	0,608	0,365
RSD (%)	1,2%	0,6%	1,5%	1,1%	0,7%

El valor crítico de la prueba Q de Dixon para cinco grados de libertad es 0,710 para un grado de confianza del 95% y de 0,821 para un grado de confianza del 99%. En este caso, los valores son todos aceptados en las condiciones más estrictas, con un 99% de confianza.

Al igual que en el sodio, se obtienen RSD inferiores al 2% en todos los casos, indicando que existe poca variabilidad entre las medidas dentro de un mismo día.

4.5.3.4 Reproducibilidad del potasio

Se realizó el test Q de Dixon a los valores extremos como en los apartados anteriores, así como se calculó la RSD. Se realizaron un total de tres medidas de cada muestra en días consecutivos.

Tabla 13: Valores de Q de Dixon y RSD obtenidos en la reproducibilidad del potasio en muestras reales

	M1 - Las Galletas	M2 - Cho	M3 - Candelaria	M4 - Las Chumberas	M5 - Los Andenes
Q₀ Intradía	0,530	0,035	0,176	0,768	0,067
RSD (%)	3,73%	0,73%	1,28%	1,67%	1,12%

El valor tabulado de la Q de Dixon para un 95% de confianza, el más restrictivo, es de 0,970 por lo que todos los valores extremos estarían aceptados. En general las RSD son bajas, oscilando entre el 0,73% y el 3,73%, mejores que en el caso del sodio, excepto para la muestra M-10, donde aumenta ligeramente hasta el 3,73%. Aun así, son valores óptimos de desviación estándar relativa.

Como valor de concentración para calcular la RSD se calculó la media de los valores obtenidos, al desconocerse la concentración real de las muestras.

4.5.4 Recuperación

Para el estudio de la recuperación se añadieron diferentes cantidades de analito a las muestras analizadas y posteriormente se calculó la concentración. Al tener los valores de concentración en dichas muestras, la recuperación puede obtenerse haciendo uso de la ecuación 9:

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración exp}}{\text{Concentración teórica}} \cdot 100 \quad (\text{Ec } 9)$$

La concentración experimental se obtuvo directamente de la determinación en el instrumento con la curva de calibrado. La concentración teórica es la concentración asignada a cada muestra de acuerdo al apartado 4.5.6 y la suma aritmética de la cantidad de potasio añadido.

4.5.4.1 Recuperación de sodio

Debido a la suspensión de la actividad docente con motivo de la alerta sanitaria por el COVID-19, no pudo llevarse a cabo el análisis.

4.5.4.2 Recuperación de potasio

Los resultados obtenidos para la recuperación del potasio, así como los añadidos inicialmente se muestran en la tabla 12. Los datos obtenidos son la media de tres series de medidas, cada una con cinco réplicas de un segundo en cada medida.

Muestra	Recuperación (%)
M1	93,08%
M2	93,35%
M3	95,64%
M4	91,12%

Como se observa en la última columna, el porcentaje de recuperación es aceptable, siendo la media de la recuperación del 93,24%, lo cual es una buena recuperación, teniendo en cuenta los posibles errores a la hora de adicionar el analito y de realizar las medidas, con la variabilidad típica de las medidas en espectrofotometría de llama.

Estos valores altos de recuperación son un impulso más a la validación del método, pues se ha sido capaz de medir pequeñas variaciones en la cantidad de analito.

4.5.5 Análisis de muestras reales

Los valores obtenidos para las muestras M1-M5 se presentan en la tabla 15 con su respectivo intervalo de confianza.

Muestra	Potasio (mg·L⁻¹)	Sodio (mg·L⁻¹)
M1 - Las Galletas	-	144±5
M2 - Cho	-	143±5
M3 - Candelaria	-	179±5
M4 - Las Chumberas	-	182±5
M5 - Los Andenes	-	240±5

A pesar de las pocas muestras que se consiguieron analizar, se puede observar como las muestras M1 y M2 parecen contener la misma cantidad de sodio a pesar de pertenecer a diferentes redes de distribución dentro del mismo municipio, perteneciendo M1 a la red de distribución de Costa del Silencio y M2 a la red de distribución Parque La Reina – Cho II, ambas dentro del municipio de Arona.

El origen del agua sería una mezcla de agua costera/puerto/mar junto con cinco procedentes de galería, mientras que en el caso de Cho II sería mezcla entre agua costera/mar/puerto con cuatro aguas procedentes de galería.

Se observan diferencias en la concentración de sodio en las muestras M4 y M5. Esto podría explicarse en parte de que la muestra M4 pertenece a la red de distribución Montaña del Aire – Mesa Mota, mientras que la M5 pertenece a la red de distribución de Montaña Pancho – Los Andenes, ambas localidades dentro del municipio de San Cristóbal de La Laguna.

El origen del agua de Las Chumberas es una mezcla de agua de galería junto a dos procedentes de pozo entubado mientras que la de Los Andenes procede de galería mezclada con tres de pozo entubado.

5. CONCLUSIONES

Se ha conseguido desarrollar y validar un método analítico en continuo para la determinación de sodio en todo el rango de concentraciones estudiado y para potasio a concentraciones menores a $45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en aguas de consumo humano.

Se han establecido las condiciones instrumentales para el desarrollo del método propuesto:

1. La dilución de la muestra en el sistema es de aproximadamente 3,3 veces su volumen.
2. La llama óptima es de aire/acetileno en un mechero de flujo laminar.
3. El elemento contrario puede utilizarse como inhibidor de ionización a concentraciones de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Respecto a la validación del método se puede concluir que se ha logrado validar ya que:

Se han obtenido LOD y LOQ relativamente bajos a pesar de haber tenido que dividir las curvas de calibrado debido a la pérdida de linealidad típica de las curvas en fotometría de llama. El inconveniente de esto radica en que deberá ser necesario realizar dos series de calibrados externos para cada uno de los elementos, aunque el ahorro de reactivos sigue siendo considerable.

Las varianzas en las pendientes del método propuesto y por adiciones estándar son comparables de acuerdo con la prueba t para varianzas homogéneas con un 99% de confianza. No habría por tanto efecto matriz exceptuando en el caso de la curva para concentración alta de potasio, que con más tiempo podría optimizarse.

La validación se refuerza tras superar la prueba F con un 99% de confianza en todos los casos exceptuando la curva de concentración alta de potasio.

Los valores obtenidos no distan demasiado entre sí al realizarse la comparación de las medidas dentro del mismo día y entre días, de acuerdo con las pruebas Q de Dixon realizados y las RSD obtenidas, todas inferiores al 4%. Por tanto, podría concluirse que el método presenta una repetibilidad y reproducibilidad buena.

En el caso del potasio, se obtienen recuperaciones superiores al 90%, lo cual es una recuperación aceptable, con un 93,24% entre todas las muestras.

Debido a la suspensión de la actividad docente con motivo de la alerta sanitaria por el COVID-19, no pudo llevarse a cabo la recogida de todas las muestras que se tenían planteada, en torno a las veinte. Diferentes estudios que estaban previstos, como la determinación de potasio en muestras o su recuperación no pudieron llevarse a cabo.

6. GLOSARIO

GAC	Química analítica verde
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LOL	Límite de linealidad
EEA	Espectroscopía de emisión atómica
EAS	Espectroscopía de absorción atómica
RSD	Desviación estándar relativa
PET	Tereftalato de polietileno

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Sullivan S, Alpers D, Klein S; *Modern Nutrition in Health and Disease*; 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins; **2014**, pp 540-573.
- (2) Chrysant G. S; *Nutrition*: ELSEVIER; **2000**: 16(7-8): pp 662-664.
- (3) Eckel R. H.; AHA/ACC; Kendall K. A; Anderson J. L; Smith S. C; *Circulation*; American Heart Association Journals; **2013**: pp S82.
- (4) Young DB, Lin H, McCabe RD.; *Am J Physiol*. American Physiological Society: **1995**, 268, pp 825-83.
- (5) Binia A.; Jaeger J.; Hu Y.; Singh A.; Zimmermann D.; *Journal of Hypertension*; Wolters Kluwer: **2015**, Vol 33 (8), pp 1509 – 1520
- (6) The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. *Dietary Reference Intakes for Sodium and Potassium - uncorrected proofs.*: National Academy Press; **2019**: pp 121-154
- (7) Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE nº 45, de 21 de febrero de 2003. pp 7228-7245.
- (8) Real Decreto 1798/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano. BOE nº 16, de 19 de enero de 2011. Anexo III.
- (9) *Guías para la calidad del agua de consumo humano*; 4^a Edición; Organización Mundial de la Salud. Suiza, **2011**, pp 227, 411-412, 416.
- (10) Erdman J. W.; Macdonald I. A.; Zeisel S. H. ; *Present Knowledge in Nutrition*; 10th ed. John Wiley & Sons; **2012**, pp 475-492
- (11) Skoog D. A.; Holler F. J; Nieman T. A.; *Análisis Instrumental*; 5^a Edición; Mc Graw Hill: Madrid, **2001**, pp 266-267.
- (12) Rubinson K. A.; Rubinson J. F.; *Análisis Instrumental*; 1^a Edición; Pearson Educación: Madrid, **2001**, pp 290, 378-381, 387.
- (13) Norma EN ISO/IEC 17025:2017; *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Diciembre de 2017
- (14) Armenta S.; Garrigues S.; De la Guardia M.; *Trends in Analytical Chemistry*; ELSEVIER: **2008**, Vol 27, Nº 6, pp 497-511
- (15) M. Bader; *J. Chem. Educ.*: **1980**, 57, 10, pp 703-705
- (16) Miller J. N.; Miller J. C.; *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*; 4^a Edición; Ed. Pearson Educación: Madrid, **2002**, pp 119-127.
- (17) Chaves E. S.; Saint'Pierre T. D; dos Santos E. J; Tormen L.; Bascuñan V. L.; Curtius A. J; *J. Braz. Chem. Soc.*; **2008**, vol 19, nº 5, pp 856-861.
- (18) O. M. Hernández; J. M. G. Fraga; A. I. Jiménez, F. Jiménez, J. J. Arias; *Food Chemistry*; ELSEVIER: **2005**, 93, 449-458.
- (19) Norma UNE-EN ISO 5667-1:2007; *Calidad del agua. Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo y técnicas de muestreo*. Septiembre de 2007.

- (20) Ministerio de Sanidad del Gobierno de España. *Sistema de Información Nacional de Aguas de Consumo (SINAC)* – Consultado en junio de 2020
- (21) Goodney D. E.; *J. Chem. Educ.*: **1982**, vol 59, nº 10, pp 875-876.
- (22) Pak, Y. ; Hieftje, G. M.; *Spectrochimica Acta*; Pergamon Press: **1985**, Vol 40B, pp 209-106.