



**Centro de Investigación en  
Materiales Avanzados, S. C.**

**Sistema de Análisis por Inyección Secuencial para el  
Monitoreo Automatizado de Nitrito, Nitrato y Sulfato  
en Aguas**

“Tesis que como requisito para obtener el grado de Maestro en  
Ciencia y Tecnología Ambiental presenta:”

**Alejandro Ayala Quezada**

Directores de Tesis:

**Dra. Luz Olivia Leal Quezada  
Dra. Laura Ferrer Trovato  
Dr. Víctor Cerdà Martín**

Chihuahua, Chih. Diciembre de 2010

***A mis padres Graciela y José Luis***

***A mi hermana Aída Elisa***

## Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó para realizar la maestría.
- Al Laboratorio de Química Analítica Automatización y Medio Ambiente de la UIB por permitirme la estancia para realizar una gran parte de esta tesis.
- A mis directores de tesis por su excelente guía para la realización del trabajo: Dra. Luz Leal, Dra. Laura Ferrer y Dr. Víctor Cerdà. ¡Moltes gracies!
- Agradecer también a la Dra. Teresa Alarcón, Dra. Myriam Moreno y Maestro Benito Aguirre por ser los sinodales en la presentación de este trabajo y por sus aportaciones.
- Al Ing. Alejandro Benavides del Laboratorio de Calidad del Agua del CIMAV por su gran apoyo para la obtención y conservación de muestras.
- A las integrantes del Laboratorio de Análisis Químico del CIMAV: Ing. Alma Rubio, Dra. Myriam Moreno y Quím. Silvia Miranda por su valiosa ayuda para hacer la preparación de muestras y reactivos.
- También al Ing. Luis de la Torre del Laboratorio de Catálisis del CIMAV por su cooperación en el acceso y uso del equipo de espectrofotometría.
- Quisiera mencionar a todas las personas que me dieron la oportunidad, la motivación y el apoyo desde el inicio de la maestría hasta el final, que son muchas afortunadamente, pero el poco espacio destinado para esto me impide hacerlo. ¡Muchas gracias a todos ustedes!

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	II
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	III
<b>RESUMEN</b> .....	IV
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1: Generalidades .....	6
2: Fuentes antropogénicas y naturales.....	8
3: Usos y aplicaciones .....	10
4: Problemática ambiental .....	11
5: Normatividad .....	15
<b>II. REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA</b> .....	17
1: Métodos analíticos.....	17
2: Métodos de análisis en flujo.....	20
3: Antecedentes.....	27
<b>III. OBJETIVO</b> .....	28
1: Objetivo general .....	28
2: Objetivos específicos .....	28
<b>IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	29
1: Preparación de reactivos .....	29
2: Descripción del método .....	30
3: Procedimiento analítico.....	39
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	44
1: Construcción del sistema .....	44
2: Optimización del procedimiento.....	44
3: Características analíticas del método optimizado.....	52
4: Evaluación de interferencias .....	55
5: Validación del método .....	56
6: Aplicación a muestras .....	57
7: Comparación de las características analíticas del método propuesto con las de los métodos estándar .....	59
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>REFERENCIAS</b> .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo del nitrógeno-----	6
Figura 2: Ciclo del azufre-----	8
Figura 3: Nitrato total en aguas superficiales, 2006-----	15
Figura 4: Representación esquemática de un sistema SFA-----	21
Figura 5: Representación esquemática de un sistema FIA-----	22
Figura 6: Representación esquemática de un sistema SIA-----	23
Figura 7: Representación esquemática de un sistema MCFIA-----	24
Figura 8: Representación esquemática de un sistema MSFIA-----	26
Figura 9: Representación esquemática de un sistema MPFS-----	26
Figura 10: Módulo multijeringa utilizado en el sistema SIA-----	31
Figura 11: Representación de las válvulas solenoides-----	32
Figura 12: Detalle de la válvula de selección utilizada en SIA-----	33
Figura 13: Bucle de carga y bucle de reacción-----	34
Figura 14: Detalle de la columna de reducción-----	34
Figura 15: Sistema de detección espectrofométrica-----	35
Figura 16: Pantalla del panel de control de conexiones del software Autoanalysis-----	36
Figura 17: Pantalla del panel de edición de métodos analíticos del software Autoanalysis-----	37
Figura 18: Pantalla del registro de la señal analítica del software Autoanalysis-----	38
Figura 19: Representación del sistema SIA propuesto-----	39
Figura 20: Gráfico de Pareto para las variables químicas-----	45
Figura 21: Gráfico de Pareto para las variables dinámicas-----	46
Figura 22: Gráfico de superficie de respuesta para nitrato y nitrito-----	48
Figura 23: Gráfico de superficie de respuesta para sulfato-----	49
Figura 24: Gráfico de la optimización de nitrato y nitrito-----	50
Figura 25: Gráfico de la optimización de sulfato-----	50
Figura 26: Sistema SIA implementado para la determinación secuencial de nitrato, nitrito y sulfato-----	51
Figura 27: Curva de calibración para nitrito-----	53
Figura 28: Curva de calibración para nitrato-----	54
Figura 29: Curva de calibración para sulfato-----	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Niveles máximos de contaminantes regulados en diferentes países -----	16
Tabla 2: Programa SIA usado para la determinación automática de nitrito, nitrato y sulfato---	43
Tabla 3: Valores usados en el diseño experimental para la optimización del sistema-----	47
Tabla 4: Valores óptimos obtenidos con el diseño experimental-----	52
Tabla 5: Características analíticas del método SIA para determinación de nitrato, nitrito y sulfato-----	55
Tabla 6: Resultados del análisis del material de referencia certificado ION-96.3 a través del método SIA propuesto-----	56
Tabla 7: Resultados analíticos y de la prueba de recuperación obtenidos para nitrito con las metodologías SIA y estándar-----	58
Tabla 8: Resultados analíticos y de la prueba de recuperación obtenidos para nitrato con las metodologías SIA y estándar-----	58
Tabla 9: Resultados analíticos y de la prueba de recuperación obtenidos para sulfato con las metodologías SIA y estándar-----	59
Tabla 10: Comparación de las características analíticas entre ambas metodologías-----	60

## RESUMEN

Las determinaciones de nitrito, nitrato y sulfato son de gran interés debido a su importancia como indicadores de contaminación de agua causada por procesos de nitrificación o acidificación de cuerpos de agua superficial, entre otras.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un sistema automatizado de monitoreo multiparamétrico basado en el análisis por inyección secuencial (SIA) para la determinación de nitrito, nitrato y sulfato en aguas.

El método de análisis en flujo multiparamétrico propuesto, está basado en el análisis por inyección secuencial (SIA) para la determinación automática de los iones nitrito, nitrato y sulfato en muestras de agua. Este método utiliza detección espectrofotométrica de los analitos, previa transformación química de los mismos. Para la determinación de nitrito se empleó el método colorimétrico de Shinn (Griess-Ilosvay modificado), el cual consiste en la formación de un colorante azo púrpura rojizo, producido por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorohidrato de NED). Considerando que el nitrato se reduce a nitrito en presencia de cadmio (Cd), se utilizó cadmio comercial en gránulos tratado con sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) como relleno de una columna de vidrio. El nitrito así producido se midió colorimétricamente y se calculó por diferencia de concentración el contenido de nitrato. El método turbidimétrico fue realizado para determinar sulfato, ya que éste precipita en un medio de ácido acético con cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ), de modo que forma cristales de sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ) de tamaño uniforme. Se midió la turbidez de la suspensión de  $\text{BaSO}_4$ .

Los límites de detección obtenidos para nitrato, nitrito y sulfato fueron de  $0.0207 \text{ mg N L}^{-1}$ ,  $0.0022 \text{ mg N L}^{-1}$  and  $3 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados demuestran que el sistema de monitoreo SIA propuesto constituye una metodología eficaz para la determinación de nitrito, nitrato y sulfato, puesto que puede determinar los niveles requeridos por las agencias internacionales que regulan estos parámetros en agua.

La técnica desarrollada ofrece también las características típicas de los sistemas multiconmutados, como portabilidad, bajo consumo de reactivos y una frecuencia alta de muestreo. El sistema propuesto fue satisfactoriamente aplicado a muestras de agua potable y agua residual, así como a materiales de referencia certificados.

## ABSTRACT

The determination of nitrite, nitrate and sulfate are of general relevance due to their importance as indicators of water contamination, such as nitrification or acidification processes of surface waters.

The aim of this work was to develop an automated multiparametric monitoring system based on sequential injection analysis (SIA) for the determination of nitrite, nitrate and sulfate in waters.

A multiparametric flow analysis method has been developed based on sequential injection analysis (SIA) for the automatic determination of the nitrite, nitrate and sulfate ions in water samples. This method uses spectrophotometric detection for the analytes after a previous chemical transformation. For the determination of nitrite, the colorimetric Shinn method (modified Griess-Ilosvay) was used, which consists in the formation of colored azo reddish purple complex. It is produced by the reaction between diazotizade sulfanilamide with N-(1-naftil) with etilendiamine dihydratechloride (NED dihydratechloride). Nitrate ion was reduced to nitrite in the presence of cadmium (Cd). Commercial cadmium grains coated with copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) were used to fill a glass column. The concentration of nitrate was calculated by the difference of the total determination and nitrite measurement. The turbidimetric method was carried out to determine sulfate. The sulfate ion precipitates in acetic acid with barium chloride ( $\text{BaCl}_2$ ). Thus, it forms barium sulfate crystals ( $\text{BaSO}_4$ ) of uniform size. The absorbance of the suspension of  $\text{BaSO}_4$  was also measured.

The SIA technique is able to determine levels that are required by water regulation international agencies. Detection limits of  $0.0207 \text{ mg N L}^{-1}$ ,  $0.0022 \text{ mg N L}^{-1}$  and  $3 \text{ mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$  were obtained for nitrate, nitrite and sulfate, respectively. These results showed that the proposed SIA monitoring system constitutes an effective approach for nitrite, nitrate and sulfate determination.

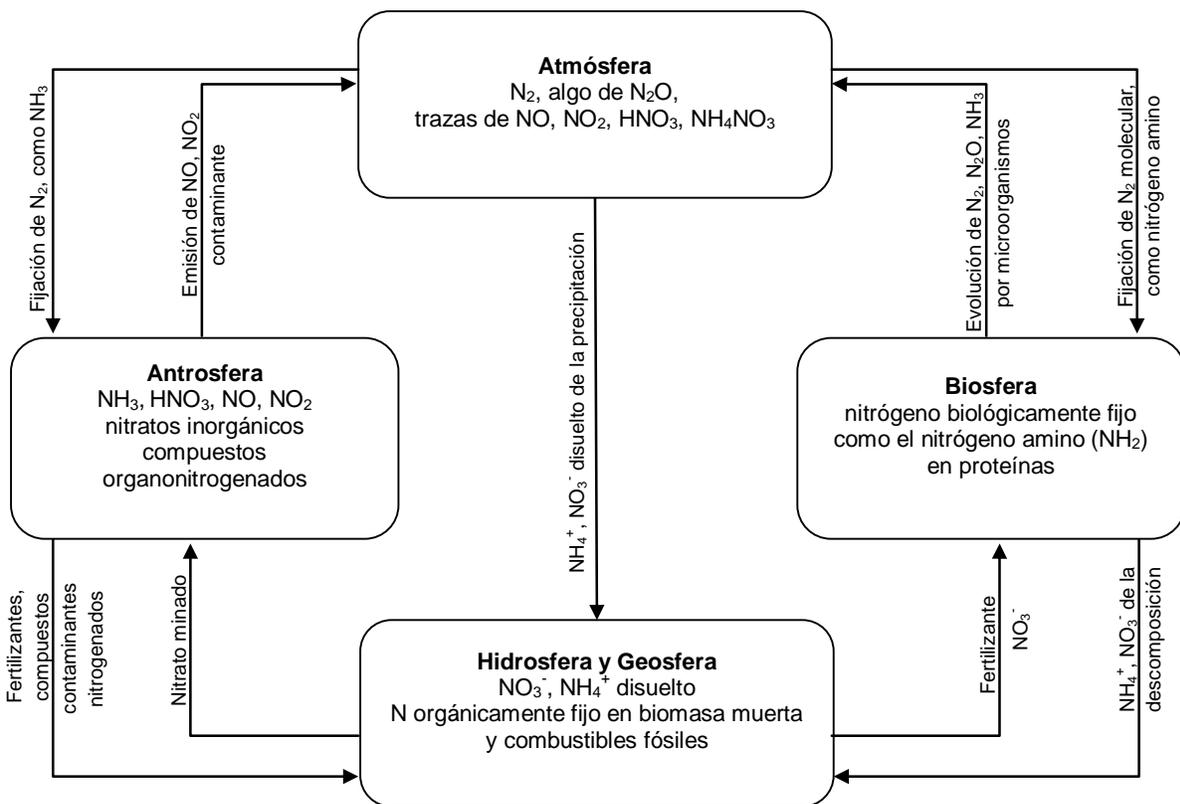
The developed technique offers also typical characteristics of the multicommutated systems, such as portability, low reagents consumption and a higher analysis frequency. The proposed system was satisfactorily applied to drinking water and wastewater samples as well as certified reference materials.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. GENERALIDADES

### Nitrato-nitrito

Los iones nitrato y nitrito son iones naturales que están íntimamente involucrados en el ciclo general del nitrógeno (Figura 1), tomando parte en muchas transformaciones importantes del nitrógeno en el medio ambiente (Ensafi y Kazemzadeh, 1999; Kazemzadeh y Ensafi, 2001; Cabrera *et al.*, 2003; Kanda y Taira, 2003; Yue *et al.*, 2004; Reis Lima *et al.*, 2006; Noroozifar *et al.*, 2007; WHO, 2007). Estos iones son los productos principales de la oxidación del óxido nítrico (NO) y sus niveles biológicos son propuestos como índices de producción celular de NO (Akyüz y Ata, 2009).



**Figura 1.** Ciclo del nitrógeno (Manahan, 1994).

El ión nitrato ( $NO_3^-$ ) es la forma estable del nitrógeno combinado para sistemas oxigenados. Aunque es químicamente no reactivo, puede ser reducido por acción microbiana o química.

El ion nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) contiene nitrógeno en un estado de oxidación relativamente inestable. Los procesos químicos y biológicos pueden reducir el nitrito a varios compuestos nitrogenados u oxidarlo a nitrato (WHO, 2007). El nitrito puede ser formado durante la biodegradación de nitrato, nitrógeno amoniacal y otros compuestos orgánicos nitrogenados (Connolly y Paull, 2001).

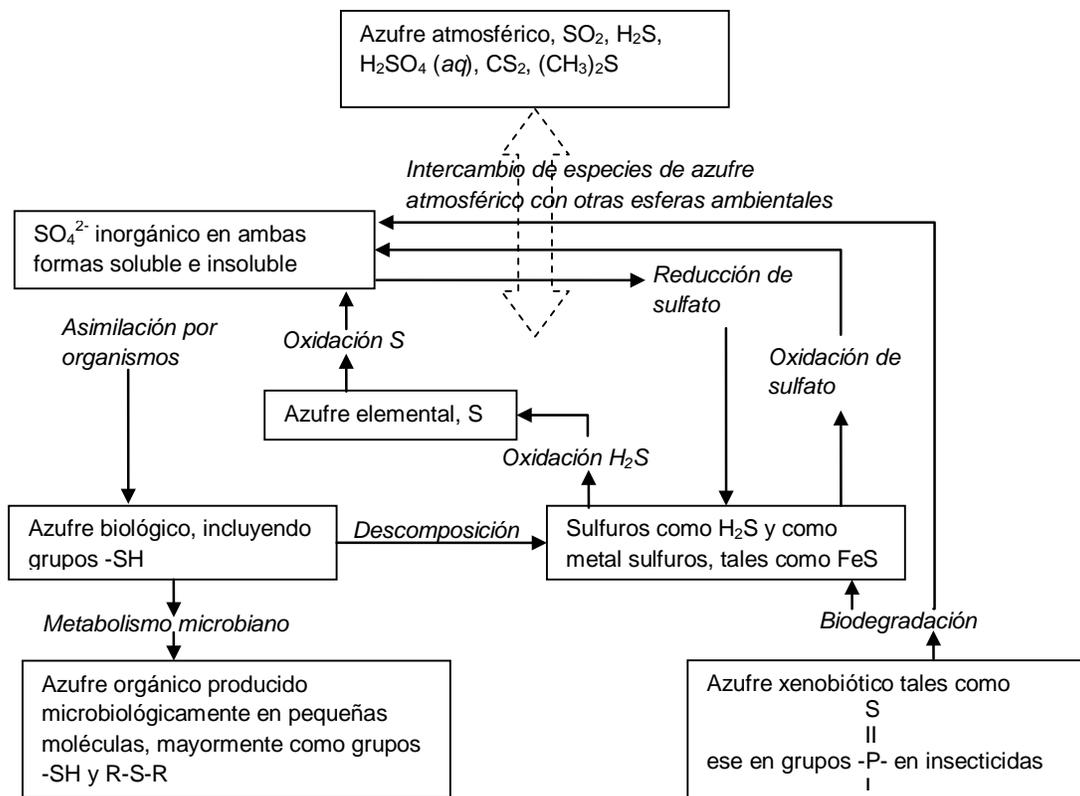
El nitrato es una sal o un producto final de la estabilización aeróbica de nitrógeno orgánico. También es un producto de conversión de material nitrogenado. El nitrógeno combinado debe ser considerado una fuente potencial de nitrato.

El nitrito es una sal formada por la acción bacteriana sobre el amonio y el nitrógeno orgánico. Se encuentra a una concentración no significativa en aguas superficiales debido a la pronta oxidación a nitrato (De Zuane, 1997).

### *Sulfato*

El sulfato es la especie predominante del azufre disponible en el medio ambiente (Meneses *et al.*, 2005; Fung *et al.*, 2008) y es un nutriente esencial para las plantas, ejerciendo una influencia importante en su crecimiento. Además de participar en el metabolismo para formar aminoácidos y otros compuestos orgánicos, su deficiencia afecta a las cosechas (Vieira *et al.*, 1998). Está presente en numerosos minerales, incluyendo la barita ( $\text{BaSO}_4$ ), la epsomita ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y el yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (WHO, 2004; Melchert y Rocha, 2008). Estos minerales disueltos contribuyen al contenido mineral de muchas aguas de consumo (WHO, 2004).

El sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) es una sal derivada del azufre elemental. La interconversión reversible del sulfato y del sulfuro en el ambiente natural es la reacción principal en el ciclo del azufre, como se puede apreciar en la Figura 2 (De Zuane, 1997; Melchert y Rocha, 2008).



**Figura 2.** Ciclo del azufre (Manahan, 1994).

## 2. FUENTES ANTROPOGÉNICAS Y NATURALES

### *Nitrato-nitrito*

El ión nitrato es encontrado naturalmente en el ambiente, y está presente en concentraciones que varían enormemente en plantas. El contenido de nitrato en vegetales puede ser influenciado por factores relacionados con la planta y el ambiente (Haghighi y Kurd, 2004; WHO, 2008). El ión nitrito no está usualmente presente en concentraciones significativas excepto en un ambiente reductor, debido a que el nitrato es el estado de oxidación más estable. Puede ser formado por reducción microbiana de nitrato. El nitrito puede ser también formado químicamente en tuberías de distribución por las bacterias *Nitrosomonas sp.* durante el estancamiento de agua que contenga nitrato y poco oxígeno en tuberías de acero galvanizado o si se usa cloración como desinfectante residual.

Las fuentes de nitrato incluyen la sobre-fertilización, heces animales, efluentes industriales y residuos humanos (Li *et al.*, 2009).

El nitrato puede alcanzar aguas superficiales y subterráneas como consecuencia de la actividad agrícola (incluyendo aplicación excesiva de fertilizantes inorgánicos nitrogenados y abonos), la disposición de su agua residual, así como de la oxidación de residuos nitrogenados producto de la excreta humana y animal, incluyendo tanques sépticos (Hassan *et al.*, 2007; WHO, 2008). En el agua superficial, las concentraciones de nitrato pueden cambiar rápidamente. Esto se atribuye a la escasez de fertilizante en la superficie, el consumo por el fitoplancton y la desnitrificación bacteriana. Algunos cuerpos de agua subterráneos también pueden tener contaminación por nitrato como consecuencia de lixiviados de la vegetación natural, aunque este tipo de agua muestra relativamente pocos cambios (WHO, 2008).

Otras fuentes de nitrato son también los depósitos minerales (nitrato de sodio o de potasio), suelos, agua de mar (actuando como reserva principal de nitrógeno combinado en océanos y ejerciendo una influencia controladora en la vida marina) y la atmósfera (De Zuane, 1997; Silva *et al.*, 2007).

Concentraciones insignificantes de nitrito son encontradas en agua superficial debido a su rápida oxidación a nitrato.

### *Sulfato*

El ión sulfato es uno de los componentes mayoritarios en aguas naturales, motivo por el cual es un analito comúnmente monitoreado (Burakham *et al.*, 2004). En aguas naturales, el azufre es transportado como sulfato disuelto desde ambientes terrestres a ambientes marinos por los ríos (Santelli *et al.*, 1995).

La concentración de sulfato puede ser afectada por el uso tecnológico de sulfito. El sulfato es el ión usualmente determinado como el producto final de la oxidación total de los compuestos azufrados, cuando es necesario cuantificar la cantidad total de las especies del azufre (Liawruangrath y Phakthong, 2006).

Los sulfatos se encuentran naturalmente en numerosos minerales y son usados comercialmente, principalmente en la industria química. Son descargados al agua en residuos industriales y a través de la deposición atmosférica; sin embargo, los niveles usualmente más altos se encuentran en agua subterránea y son provenientes de fuentes naturales. En general, el promedio ingerido diariamente de sulfato a través de agua de consumo, aire y alimentos es aproximadamente de 500 mg, siendo los alimentos la mayor fuente. Sin embargo, en áreas con abastecimientos de agua de consumo que contienen altos

niveles de sulfato, el agua de consumo puede constituir la fuente principal de ingesta (WHO, 2008).

El sulfato es encontrado en aguas naturales en la fase final de la oxidación del sulfuro o en el estado oxidado de la materia orgánica en el ciclo del azufre (De Zuane, 1997).

### 3. USOS Y APLICACIONES

#### *Nitrato-nitrito*

El nitrito es usualmente adicionado a los productos cárnicos procesados en forma de sales de sodio o potasio para retener el color rojo y el sabor fresco de la carne y proveer protección contra microorganismos como el *Clostridium botulinum*, que puede causar descomposición de los alimentos provocando una enfermedad llamada botulismo si éstos son ingeridos; en ocasiones también se adiciona nitrato como reservorio de nitrito (Badea *et al.*, 2001; WHO, 2007; Akyüz y Ata, 2009; Zarate *et al.*, 2009). El nitrato es usado principalmente en fertilizantes inorgánicos. También es usado como agente oxidante, en la producción de explosivos y medicinas. El nitrato de potasio purificado es usado en la elaboración de vidrio y otros productos industriales (Hassan *et al.*, 2007; WHO, 2007).

Aunque el nitrógeno se encuentra entre los macronutrientes requeridos para el metabolismo y crecimiento de organismos biológicos, no puede ser tomado directamente por los organismos eucarióticos de la forma molecular presente en la atmósfera, donde es la especie más abundante (alrededor del 80%). El nitrógeno debe ser primero atrapado y convertido a nitrato (proceso de nitrificación). Por esta razón, los fertilizantes nitrogenados basados en nitrato son tan comúnmente usados (Mesquita *et al.*, 2009).

#### *Sulfato*

Las especies de sulfato tienen mucha importancia en la industria, mineralogía, bioquímica y en muchas otras áreas en las actividades humanas (Miranda Prada *et al.*, 1996).

El azufre y sus compuestos son altamente usados en la agricultura debido a su elevada eficacia como pesticidas (Liawruangrath y Phakthong, 2006).

Los productos de sulfato son usados en la producción de fertilizantes, tintes, vidrio, papel, jabones, textiles, fungicidas, insecticidas, astringentes y eméticos. También son usados en la minería, la fabricación de pulpa de madera, la industria del metal y la galvanoplastia, en tratamientos de agua residual y en el procesamiento de pieles. El sulfato de aluminio es usado como floculante en el tratamiento de agua de consumo. El sulfato de cobre ha sido

usado para el control de algas en abastecimientos de agua (WHO, 2004) y en el tratamiento de la vid (El conocido como “caldo bordolés”, es usado como fungicida tradicional contra una amplia gama de enfermedades fungosas y bacterianas en una gran variedad de cultivos. En el caso de la vid es utilizado para controlar el mildú y la botritis entre otras enfermedades).

#### 4. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

##### *Nitrato-nitrito*

En general, la fuente más importante de exposición humana al nitrato y nitrito es a través de vegetales y carne en la dieta. En algunas circunstancias, sin embargo, el agua de consumo puede hacer una contribución significativa a la ingesta de nitrato y ocasionalmente de nitrito. En el caso de infantes, el agua de consumo puede ser la fuente externa de mayor exposición a nitrato y nitrito (WHO, 2008).

La presencia de nitrito a altas concentraciones en sangre puede hacer que éste reaccione con el hierro (III) de la hemoglobina, formando metahemoglobina, la cual no tiene la habilidad de transportar oxígeno -y esto causa la condición conocida como metamoglobinemia, o “síndrome del bebé azul”. El nitrito puede reaccionar especialmente con aminas secundarias y amidas para formar nitrosaminas y nitrosamidas carcinogénicas en productos alimenticios y dentro del sistema digestivo humano (Monser *et al.*, 2002; Akyüz y Ata, 2009).

Aunque el nitrato es más estable y menos tóxico que el nitrito, puede ser inmediatamente convertido a nitrito por reducción microbiana en productos alimenticios y saliva.

En los seres humanos, los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ) destruyen la capa protectora de la superficie respiratoria, de tal modo que reducen la asimilación de oxígeno por el cuerpo llevando a alergias respiratorias como el asma. Los  $\text{NO}_x$  son contaminantes primarios del aire y forman  $\text{NO}_3^-$  y sus ácidos conjugados ( $\text{HNO}_3$ ), siendo componentes mayoritarios de los aerosoles atmosféricos. El  $\text{HNO}_3/\text{NO}_3^-$  no sólo representa un flujo significativo de la atmósfera al agua superficial, sino que también contribuye substancialmente a la acidez de la precipitación.

El nitrito y su ácido nitroso conjugado ( $\text{HNO}_2$ ) están involucrados en la formación de nitrosaminas en fases condensadas y la fotólisis de esas especies de N(III) son consideradas como fuente predominante de radicales OH en la atmósfera baja, particularmente en la madrugada, cuando las concentraciones de otras fuentes de radicales hidroxilo tales como formaldehído y ozono, son bajas.

Los iones nitrito y nitrato son contaminantes que están dispersos tanto en agua subterránea como superficial. Los niveles de estos compuestos se incrementan como resultado de excrementos de ganado y humanos, así como residuos orgánicos de industrias químicas, residuos domésticos, efluentes de tanques sépticos y el uso de fertilizantes nitrogenados y herbicidas en la agricultura (Aküyz y Ata, 2009). En ambientes acuáticos pueden producir eutroficación.

La contaminación de agua por pesticidas y nitrato resultado de las prácticas agrícolas rutinarias es un problema común y creciente en la mayoría de las áreas agrícolas del mundo. En las últimas décadas, la preocupación sobre la contaminación de fuentes de agua ha crecido debido al incremento de las concentraciones de nitrato y pesticidas. En regiones donde la contaminación por pesticidas es un problema, la concentración de nitrato es a menudo alta (Aslan, 2005).

El nitrato puede ser reducido a nitrito en la cavidad oral y en el estómago. Una vez en el estómago, el ión nitrito puede reaccionar con aminos y amidas, las cuales contienen nitrógeno orgánico como los aminoácidos, para formar un grupo de carcinogénicos conocidos como compuestos N-nitrosos. El estómago está en riesgo por la síntesis endógena de compuestos N-nitrosos debido a que la acidez estomacal cataliza las reacciones de nitrificación. La alta ingesta de nitrato fue asociada con cáncer gástrico en Inglaterra, Colombia, Chile, Japón, Dinamarca, Hungría e Italia. La exposición a compuestos N-nitrosos formados endógenamente ha sido asociada con el riesgo incrementado de cáncer de estómago, esófago y vejiga (Hsu *et al.*, 2009).

La determinación de nitrato y nitrito es de gran interés ambiental para entender su biogeoquímica en sistemas acuáticos y su rol en el proceso de eutrofización (Pons *et al.*, 2008).

### *Sulfato*

Los sulfatos son descargados en el agua procedente de minas y fundiciones, de pulpa kraft y molinos de papel, molinos de materia textil y de curtidurías. Los sulfatos de sodio, potasio y magnesio son todos altamente solubles en agua, mientras que los sulfatos de calcio y bario así como muchos sulfatos de metales pesados son menos o muy poco solubles (WHO, 2004).

La aparición de compuestos azufrados que contienen oxígeno en la más baja tropósfera y en la más alta estratósfera es responsable de la acidulación regional de los cuerpos de agua

modificando la biosfera, así como también de la formación de nubes altas afectando los cambios climáticos globales (Dedkov *et al.*, 2006).

El sulfato es una de las especies dominantes del azufre en ambientes acuáticos y su nivel es elevado en ambientes contaminados, como resultado de la deposición ácida debido al uso de carbón, aceite y otros combustibles que contienen azufre. El dióxido de azufre atmosférico, formado por la combustión de combustibles fósiles y en procesos de metalurgia, puede contribuir a elevar el contenido de sulfato en aguas superficiales (WHO, 2004). Aunque la presencia de sulfato en agua de consumo afecta su calidad sensorial y no posee una amenaza inmediata a la salud, el incremento del nivel de sulfato en agua provee un fuerte indicador de la acidificación de cuerpos de agua afectando la calidad de la misma (Fung *et al.*, 2008). El trióxido de azufre, producido por la oxidación fotolítica o catalítica del dióxido de azufre, se combina con vapor de agua para formar ácido sulfúrico diluido, el cual es depositado como “lluvia ácida” (WHO, 2004).

Los datos existentes no relacionan un determinado nivel de sulfato en agua de consumo con un efecto adverso a la salud humana. Los datos de un estudio en conejillos de indias de una dieta líquida y de estudios de agua embotellada con voluntarios humanos indican un efecto laxativo a concentraciones de 1000–1200 mg L<sup>-1</sup>, pero no un incremento en diarrea, deshidratación o pérdida de peso (WHO, 2008).

Altas concentraciones de sulfato pueden interferir en la eficiencia de cloración en suministros de agua y las sales de sulfato pueden incrementar las propiedades corrosivas del agua. Las bacterias sulfato-reductoras, a menudo encontradas en suministros de agua, producen sulfuro de hidrógeno que resulta en un indeseable sabor y olor, y también provoca efectos tóxicos. El sulfuro de hidrógeno también incrementa las propiedades corrosivas del agua (Melchert y Rocha, 2008).

#### *Situación en México*

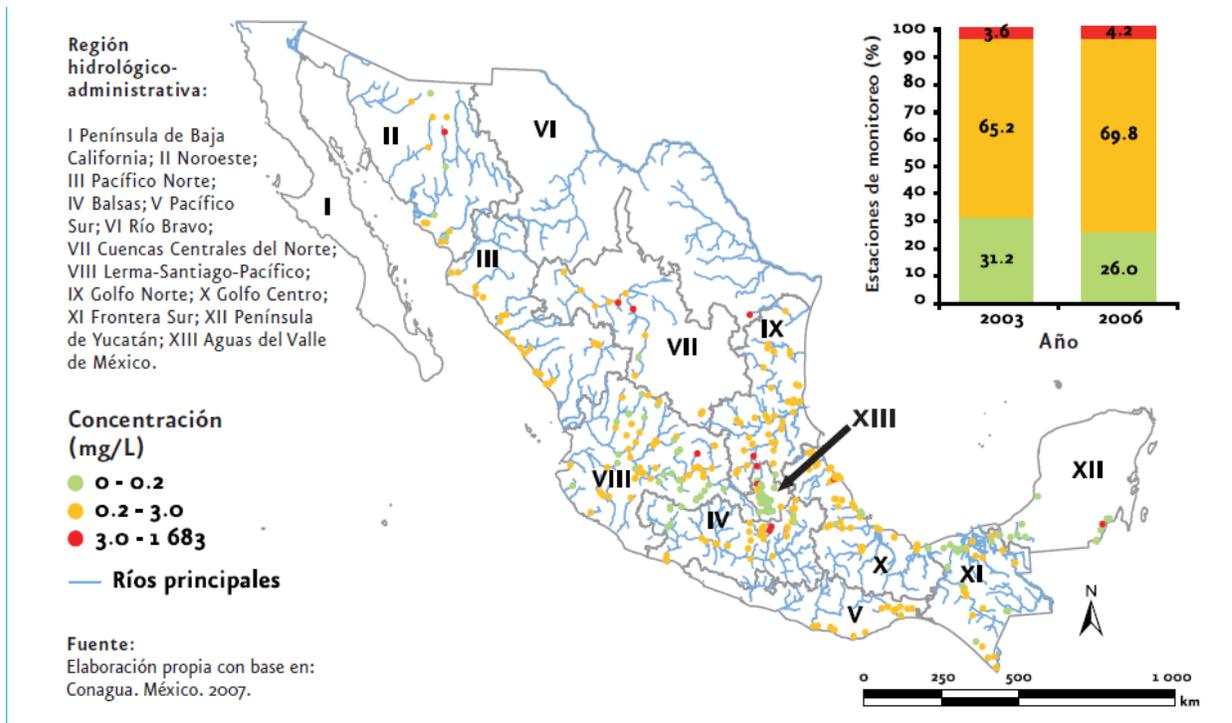
La Comisión Nacional del Agua (Conagua) realiza la medición sistemática de la calidad del líquido a través de su Red Nacional de Monitoreo (RNM). En 2007, la RNM contó con 1014 sitios de muestreo, de los cuales 389 corresponden a la red primaria, con 207 ubicados en cuerpos de agua superficiales, 52 en zonas costeras y 130 en acuíferos. La red secundaria comprendía 285 estaciones de muestreo, de las cuales 241 estaban localizadas en aguas superficiales, 19 en zonas costeras y 25 en aguas subterráneas. El resto (251), pertenece a la red de estudios especiales y a la red de referencia de agua subterránea (89). Es

importante mencionar que los sitios con monitoreo de calidad del agua están ubicados en los principales cuerpos de agua del país, incluyendo zonas con alta influencia antropogénica.

Actualmente, la Conagua publica entre sus principales indicadores de la calidad del agua la demanda bioquímica de oxígeno a cinco días ( $DBO_5$ ), la demanda química de oxígeno (DQO) y la concentración de sólidos suspendidos totales (SST). Estas variables muestran la influencia humana por la presencia de centros urbanos e industriales. Otros parámetros que se registran en la mayoría de los sitios de la RNM de la calidad del agua son las concentraciones de nitratos y fosfatos, dureza, oxígeno disuelto y pH.

Los nitratos son componentes importantes de los fertilizantes que pueden originarse también de la oxidación del amonio ( $NH_4^+$ ) y de otras fuentes presentes en los restos orgánicos. Los nitratos tienen efectos adversos en la salud humana, causando cianosis y hasta asfixia. En 2006 se detectaron concentraciones superiores a  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  (Valor guía provisional para el consumo a largo plazo (WHO, 2008)) en 74% de los sitios de monitoreo de la RNM (Figura 3). En las regiones Pacífico Norte, Balsas, Pacífico Sur, Cuencas Centrales del Norte, Golfo Norte y Golfo Centro, más de 75% de los sitios de monitoreo sobrepasaron ese nivel. Ese mismo año, 7.7% de los sitios de monitoreo de la región Cuencas Centrales del Norte registró concentraciones de nitrato mayores a  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , lo que significa que en los ecosistemas acuáticos se puede favorecer el crecimiento de algas y la disminución de los niveles de oxígeno (SEMARNAT, 2009).

Desafortunadamente, la situación sobre el estado actual de sulfato en las aguas nacionales se desconoce debido a que, como se vió anteriormente, la Conagua solamente determina los niveles de nitrato, fosfato, dureza, oxígeno disuelto y pH, como parámetros de calidad del agua.



**Figura 3.** Nitrato total en aguas superficiales, 2006 (SEMARNAT, 2009).

## 5. NORMATIVIDAD

Existe normatividad que establece los límites máximos permisibles para nitrato, nitrito y sulfato en diferentes países alrededor del mundo, regulados por sus respectivas autoridades. En México, los límites máximos permisibles para nitrato, nitrito y sulfato están regulados por la Secretaría de Salud en la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, en la cual se establecen las concentraciones máximas permisibles de los tres aniones en agua potable para uso y consumo humano.

La Unión Europea (UE), establece en su Directiva 98/83EC las concentraciones máximas permitidas en agua destinada para consumo humano en sus estados afiliados. Mientras que en Estados Unidos (EU), la Agencia de Protección Ambiental (US EPA, por sus siglas en inglés) en su Código 40 CFR Cap. I Partes 141 y 143, establece los niveles máximos de contaminantes para sistemas de agua comunitarios.

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) emite unas Guías para la Calidad del Agua de Consumo, en las cuales establece las concentraciones máximas recomendadas de nitrato, nitrito y sulfato en agua de consumo

para la protección de la salud pública. Al ser recomendaciones, su cumplimiento no es de carácter obligatorio. Sin embargo, la WHO establece valores de referencia con el objetivo de que sirvan como punto de partida para que las autoridades desarrollen regulaciones y estándares apropiados para la situación nacional de cada país.

Tanto el nitrato como el nitrito son establecidos como contaminantes primarios por su efecto tóxico, mientras que el ión sulfato es tomado como contaminante secundario debido a su baja toxicidad.

En la Tabla 1 se muestran en detalle los valores establecidos como niveles máximos permitidos de contaminantes en las diferentes regulaciones de los países antes mencionados y los valores recomendados por la WHO.

**Tabla 1.** Niveles máximos de contaminantes regulados en diferentes países.

	<b>Nitrito</b>	<b>Nitrato</b>	<b>Sulfato</b>
México NOM-127-SSA1-1994 (SSA, 2000)	1 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>	400 mg L <sup>-1</sup>
Unión Europea (EU, 2009)	0.5 mg L <sup>-1</sup>	50 mg L <sup>-1</sup>	250 mg L <sup>-1</sup>
Agencia de Protección Ambiental (US EPA, 2009)	1 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>	250 mg L <sup>-1</sup>
Organización Mundial de la Salud (WHO,2008)	3 mg L <sup>-1</sup>	50 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>

## II. REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Existen diferentes métodos para las determinaciones de nitrato, nitrito y sulfato. Dentro de los más utilizados cabe mencionar las metodologías tradicionales o métodos estándar, como el método colorimétrico, la espectrometría UV selectiva, el método de ion selectivo, la reducción con cadmio cuperizado, la gravimetría, la turbidimetría y la cromatografía iónica (Eaton, 1998).

En las últimas décadas se han desarrollado nuevas metodologías analíticas, con el objeto de realizar una vigilancia y control continuos de un gran número de parámetros ambientales que permitan obtener resultados fiables, seguros y económicos, de un gran número de muestras en un corto lapso de tiempo. La automatización de los métodos analíticos permite obtener numerosas ventajas, tales como el incremento de la calidad de los análisis y la flexibilidad de los sistemas, lo que mejora la sensibilidad y selectividad en la determinación de los distintos parámetros sin realizar grandes modificaciones en los instrumentos. Además hace posible el almacenamiento de los datos experimentales, de modo que pueden ser procesados en cualquier momento, reduce el tiempo de análisis y libera al personal especializado de las labores más rutinarias.

Entre las técnicas de análisis en flujo se pueden destacar: el análisis en flujo segmentado (SFA, *Segmented Flow Analysis*), el análisis por inyección en flujo (FIA, *Flow Injection Analysis*), el análisis por inyección secuencial (SIA, *Sequential Injection Analysis*), el análisis por inyección en flujo multiconmutado (MCFIA, *Multi-Commutation Flow Injection Analysis*), el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA, *Multi-Syringe Flow Injection Analysis*) y el sistema de flujo multibomba (MPS, *Multi-Pumping System*) (Cerdà, 2006).

### 1. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### *Método colorimétrico*

El método de Griess-Ilosvay es el más tradicionalmente utilizado para la determinación de nitritos. Se basa en una reacción de diazoación entre la  $\alpha$ -naftilamina y el ácido sulfanílico. No obstante, debido al carácter cancerígeno de la  $\alpha$ -naftilamina, este reactivo ha sido sustituido por la N-(1-naftil)-etilendiamina, dando lugar al método de Shinn, o también denominado método de Griess modificado.

Así, el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) se determina mediante la formación de un colorante azo púrpura rojizo, producido por acoplamiento de la sulfanilamida diazotizada con diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorohidrato de NED).

El reactivo cromogénico se mezcla con la muestra produciendo el desarrollo del colorante azo, que se mide a 543 nm en un espectrofotómetro.

#### *Método espectrofotométrico ultravioleta selectivo*

La medida de la absorción UV a 220 nm hace posible la determinación rápida de  $\text{NO}_3^-$ . Dado que la materia orgánica disuelta puede absorber también a 220 nm y el ión  $\text{NO}_3^-$  no lo hace a 275 nm, se puede utilizar una segunda medida a 275 nm para corregir el valor de  $\text{NO}_3^-$ . Esta corrección empírica dependerá de la naturaleza y concentración de la materia orgánica y puede variar de unas aguas a otras. Se lee la absorbancia o transmitancia frente a agua tridestilada, ajustada a absorbancia cero o transmitancia 100%. Se utiliza la longitud de onda de 220 nm para obtener la lectura de  $\text{NO}_3^-$  y 275 nm para determinar la interferencia debida a materia orgánica disuelta.

#### *Método del electrodo de nitrato*

El electrodo de ión  $\text{NO}_3^-$  es un sensor selectivo que desarrolla un potencial a través de una membrana delgada, porosa e inerte, que es mantenida en posición en un intercambiador iónico en un líquido inmiscible con agua. Después de realizar el correspondiente proceso de calibrado del electrodo, se realiza la medición de la muestra con la adición de una solución amortiguadora o *buffer* y se agita. Se introducen los extremos de los electrodos en la muestra y se registra la lectura de potencial.

#### *Método de reducción de cadmio*

El  $\text{NO}_3^-$  se reduce cuantitativamente a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en presencia de cadmio (Cd). Este método utiliza Cd comercial en gránulos tratado con sulfato de cobre ("cadmio cuperizado", en donde el cobre actúa de catalizador) y como relleno de una columna. El  $\text{NO}_2^-$  así producido se mide colorimétricamente.

El procedimiento en su etapa inicial comprende la preparación de la columna de reducción; que es como sigue: se llena la columna de vidrio con agua y después se añaden los gránulos de cadmio cuperizado, evitando que quede aire atrapado. Se activa la columna pasando a través de ella una solución compuesta por un patrón de  $\text{NO}_3^-$  y una solución de cloruro de amonio y etilendiamino tetraacetato de sodio ( $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$ ). Después se lleva a cabo la

reducción de la muestra y posteriormente, se añade reactivo cromogénico a la muestra y se mezcla. Se mide la absorbancia a 543 nm en un espectrofotómetro.

#### *Método gravimétrico con combustión de residuos*

En esta técnica, el sulfato precipita en una solución de ácido clorhídrico (HCl) como sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ) por adición de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ). La precipitación se realiza cerca de la temperatura de ebullición y, tras un período de digestión, el precipitado se filtra, se lava con agua hasta eliminar el ión cloruro, se somete a combustión y se pesa como  $\text{BaSO}_4$ .

La determinación por este método se realiza después de hacer la precipitación de sulfato de bario. Se calienta a ebullición y se añade lentamente, con agitación, una solución templada de  $\text{BaCl}_2$  hasta precipitación. Se digiere el precipitado a 80-90 °C. Después se filtra a temperatura ambiente y se ponen el filtro y precipitado en un crisol de platino. Se lleva a ignición a 800 °C durante 1 hora. Se enfría en desecador y se pesa.

#### *Método gravimétrico con secado de residuos*

El fundamento de este método es similar al anteriormente descrito. La diferencia está en que una vez filtrado el precipitado, no se lleva a ignición sino que se seca en un horno mantenido a 105 °C o más. Se enfría en desecador y se pesa.

#### *Método turbidimétrico*

En esta técnica, el ion sulfato precipita en un medio de ácido acético con cloruro de bario de modo que forma cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme. Se mide la turbidancia de la suspensión de  $\text{BaSO}_4$  con un espectrofotómetro.

Para la formación de turbidez con sulfato de bario, se añade a la muestra una solución *buffer* (que contiene cloruro de magnesio, acetato de sodio, nitrato potásico y ácido acético) y se mezcla. Mientras se agita, se añaden cristales de cloruro de bario, empezando el recuento del tiempo inmediatamente. Se agita un minuto y se vierte la solución en la cubeta del espectrofotómetro y se mide la turbidez a los 5 minutos.

#### *Método cromatográfico de iones*

Con frecuencia resulta conveniente hacer la determinación de aniones comunes, como bromuro, cloruro, fluoruro, nitrato, nitrito, fosfato y sulfato, para conocer la naturaleza precisa de una determinada muestra de agua y/o determinar la necesidad de un tratamiento concreto. Aunque se dispone de métodos convencionales para determinar los aniones

individuales, sólo la cromatografía iónica proporciona una técnica instrumental única que se puede utilizar para hacer una medida secuencial y rápida. La cromatografía iónica elimina la necesidad de utilizar reactivos peligrosos y distingue eficazmente los haluros ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{F}^-$ ) de los óxidos ( $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  ó  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ).

Se inyecta una muestra de agua en una corriente de disolvente carbonato-bicarbonato y se pasa a través de una serie de intercambiadores iónicos. Los aniones que interesan se separan según sus afinidades relativas mediante un intercambiador de baja capacidad, fuertemente aniónico (columna de protección y separación, denominada ésta última como “columna analítica”). Los aniones separados son dirigidos hacia un intercambiador catiónico fuertemente ácido (“columna supresora”, de lecho de empaquetamiento compacto), o a través de una fibra hueca de membrana intercambiadora de cationes (denominada “membrana supresora”); también puede pasar a través de un supresor de micromembrana bañado en una solución muy ácida de flujo continuo (solución regenerante). En el supresor, los aniones de ácidos fuertes separados se transforman en su forma ácida de alta conductividad, y el disolvente carbonato-bicarbonato se convierte en ácido carbónico, no disociado y por tanto poco conductor. Los aniones de ácidos débiles quedan en su forma poco disociada, y por lo tanto no son detectados debido a su baja conductividad. Los aniones de ácidos fuertes separados en sus formas ácidas se miden por conductividad. Se identifican sobre la base del tiempo de retención, comparado con los patrones. La determinación cuantitativa se realiza midiendo la altura del pico o la superficie que éste delimita.

## 2. MÉTODOS DE ANÁLISIS EN FLUJO

El desarrollo de técnicas de análisis en flujo continuo ha posibilitado la automatización parcial o total de los procesos analíticos. El grado de automatización se logra en función de los pasos del protocolo analítico que estén automatizados. En cualquier caso, se alcanzan una serie de ventajas respecto a los métodos manuales, mejorando la reproducibilidad y consiguiendo la disminución significativa del tiempo y costo por análisis.

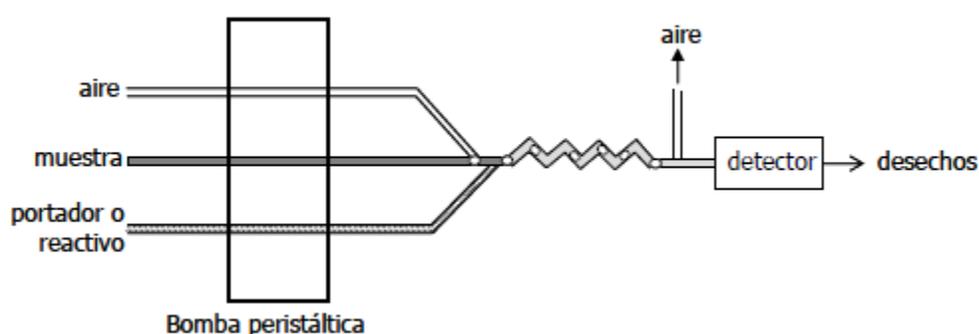
Los componentes básicos de los sistemas de análisis en flujo son un módulo de impulsión del líquido (bombas peristálticas, bombas de pistón bidireccional o microbombas) y un conjunto de tubos de plástico (*manifold*) que conducen los líquidos hacia el detector. Estos métodos se basan en la introducción de muestras en una tubería de pequeño diámetro a la que se agregan los reactivos que son conducidos al detector para realizar la medición que permita determinar la concentración de la especie de interés. El orden de adición de la

muestra y los reactivos, así como el tiempo de reacción y el caudal, se controlan automáticamente permitiendo una repetibilidad de la señal analítica y una frecuencia de muestreo elevadas. La propiedad de interés (absorbancia, fluorescencia, potencial, etc.) se registra continuamente mediante un sistema de detección adecuado, que produce una señal transitoria en forma rectangular o de pico, cuyas características (altura o área del pico) se relacionan con la concentración del analito en la muestra (Ferrer, 2007).

#### *Análisis en flujo segmentado*

El análisis en flujo segmentado (SFA) propuesto por Skegs en 1957, fue la primera técnica implementada en laboratorios de análisis clínicos y oceanográficos (Figura 4). En el SFA, las muestras son aspiradas secuencialmente y separadas por burbujas de aire, con el objetivo de segmentar el flujo e impedir la dispersión del bolo de muestra. En cada segmento de disolución, separado por dos burbujas de aire, se crea una mezcla homogénea entre muestra y reactivos, que necesita un elevado tiempo de residencia en el sistema (2 – 30 min) para alcanzar las condiciones de equilibrio estacionario antes de realizar la detección. La forma de la respuesta es rectangular, midiéndose la altura de banda.

El SFA presenta algunas desventajas, tales como la complicación de la introducción y eliminación de las burbujas, un elevado gasto de reactivos, un ciclo de lavado esencial, una baja frecuencia de análisis (60 inyecciones/hora), así como la imposibilidad de realizar valoraciones y métodos cinéticos, que fueron superadas por los consecutivos métodos de análisis en flujo desarrollados (Cerdà, 2006).



**Figura 4.** Representación esquemática de un sistema SFA.

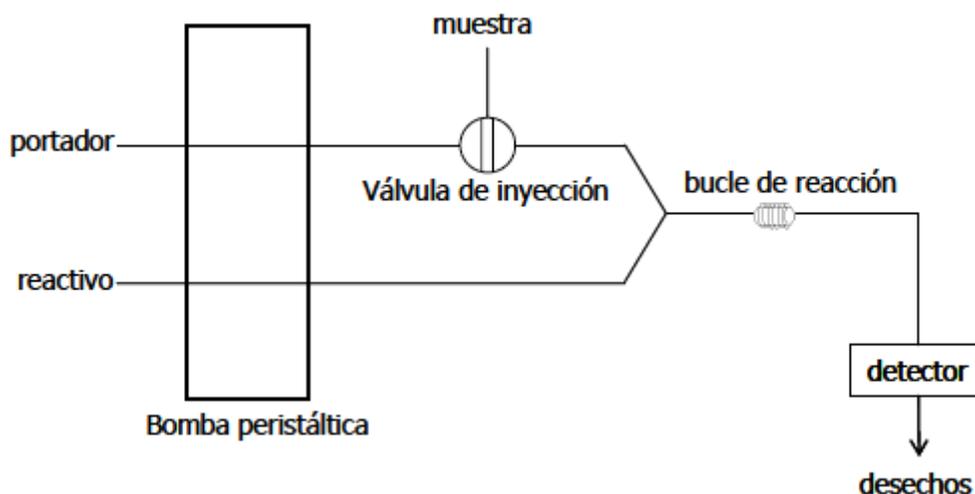
### Análisis por inyección en flujo

El análisis por inyección en flujo (FIA) fue propuesto por Ruzicka y Hansen en 1975, y posee ventajas que han conducido a esta técnica a un extraordinario desarrollo, no comparable con el resto de las técnicas en flujo.

En el FIA la muestra es insertada mediante una válvula de inyección en un canal por el que circula una corriente continua de fluido portador (*carrier*). Durante el transporte de la muestra hacia el detector se incorporan los reactivos necesarios en el canal del portador o mediante canales auxiliares conectados al principal como se muestra en la Figura 5.

Entre las características principales de los sistemas FIA caben destacar: la alta frecuencia de muestreo (100 inyecciones/hora), una elevada precisión, una disminución del consumo de reactivos y no se requieren ciclos de lavado para evitar la contaminación entre muestras. Entre otras ventajas fundamentales del FIA merece ser destacada la facilidad de implementación considerando que es una técnica que puede realizarse sin excesivas dificultades, con muy bajo costo de inversión y de mantenimiento.

No obstante, esta técnica tiene su punto débil en el uso de las bombas peristálticas para la impulsión de los líquidos. Estas bombas requieren el uso de tubos flexibles de Tygon<sup>®</sup>, lo que implica cambios en los caudales debido al aplastamiento progresivo que sufren los tubos, por lo que los sistemas deben ser re-calibrados frecuentemente. Por otro lado, la técnica FIA es básicamente monoparamétrica, característica que ha sido superada por otros métodos que permiten la determinación simultánea de diferentes parámetros (Ferrer, 2007).

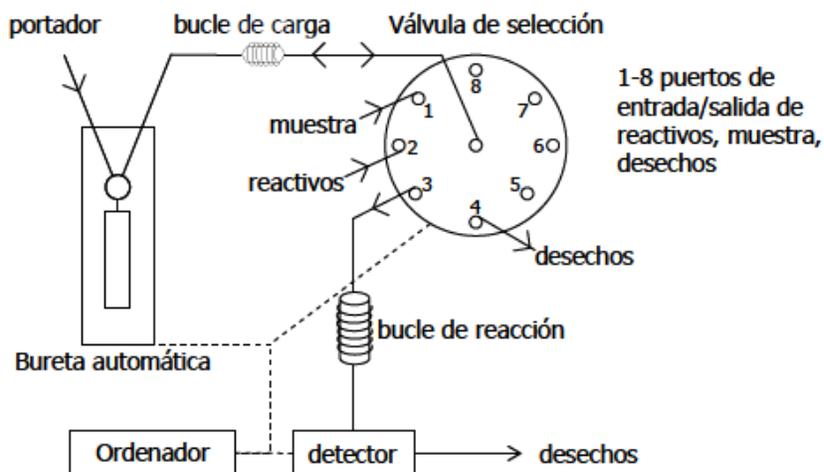


**Figura 5.** Representación esquemática de un sistema FIA.

### Análisis por inyección secuencial

La técnica de análisis por inyección secuencial (SIA), introducida por Ruzicka y Marshall en 1990, fue propuesta inicialmente como una alternativa del FIA, ya que ofrece algunas ventajas con respecto al FIA convencional.

Un sistema SIA está compuesto básicamente por una bomba de pistón bidireccional, y una válvula de selección, la cual posee un puerto central conectado a la bomba impulsora de líquidos y puertos laterales conectados a los recipientes de reactivos, muestra y al detector. El SIA se basa en la aspiración secuencial de volúmenes precisos de muestra y reactivos que se conducen, mediante un portador, hacia un bucle de carga donde permanecen en contacto hasta que se envían a través de un bucle de reacción al detector (Figura 6). El envío del contenido del bucle de carga al detector se realiza en el sentido inverso del flujo, lo que provoca la mezcla entre muestra y reactivos para dar lugar a la formación del producto de reacción que permitirá la detección de la propiedad seleccionada. La señal analítica transitoria es en forma de pico, cuya altura o área se relacionan con la concentración del analito en la muestra.



**Figura 6.** Representación esquemática de un sistema SIA.

Entre las ventajas del SIA cabe destacar que el conjunto de tuberías ó *manifold* es más simple y universal que el del FIA, ya que generalmente puede permanecer fijo y el control de los tiempos de reacción puede llevarse a cabo a través de una computadora, incluyendo técnicas de flujo detenido. Los tubos son de PTFE (politetrafluoroetileno, de 0.8 mm de diámetro interno), material resistente al uso de disolventes y reactivos agresivos. Las bombas peristálticas pueden ser eliminadas y remplazadas por bombas de pistón movidas

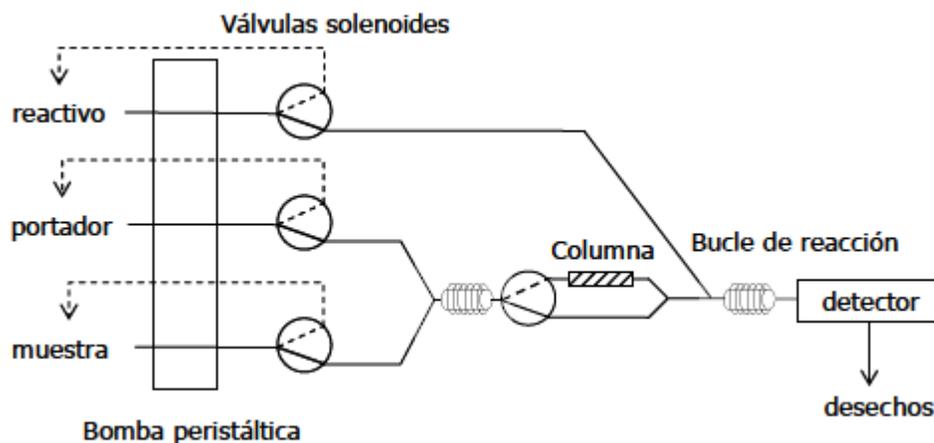
por un motor paso a paso y provistas de jeringas de vidrio, las cuales son también resistentes a diferentes tipos de reactivos agresivos. Además, dado que en la técnica SIA el sistema sólo funciona cuando se requieren mediciones, el ahorro en el volumen tanto de muestra como de reactivos es considerable respecto al FIA, al igual que en la generación de residuos.

Por otro lado, la técnica SIA puede funcionar en modo multiparamétrico, lo cual es de especial interés para el desarrollo de monitores ambientales. El análisis multiparamétrico se favorece al aumentar los puertos laterales, bien utilizando válvulas de selección de hasta 20 puertos o conectando un puerto lateral de la válvula principal con el puerto central de otras válvulas. Esta característica es hasta ahora única, ya que no existe otra técnica de flujo que tenga estas posibilidades multiparamétricas (salvo quizás los sistemas multibomba).

Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas, tales como una menor frecuencia de muestreo (70 inyecciones/hora) con respecto al FIA y dificultades en la mezcla de muestra y reactivos. El necesario control del sistema mediante una computadora provista de un programa adecuado puede explicar el menor desarrollo de esta técnica en comparación con el FIA (Cerdà, 2006).

#### *Análisis por inyección en flujo multiconmutado*

El análisis por inyección en flujo multiconmutado (MCFIA), es un nuevo enfoque del análisis en flujo propuesto por B.F. Reis y colaboradores en 1994. En la Figura 7 se muestra la representación esquemática de un sistema MCFIA que se basa en el uso de válvulas solenoides de tres vías de conmutación rápida.



**Figura 7.** Representación esquemática de un sistema MCFIA.

Las válvulas solenoides, cuya conmutación está controlada por una computadora, permiten el retorno de muestra y reactivos a sus reservorios cuando no son necesarios, por lo que se consigue un bajo consumo de los mismos.

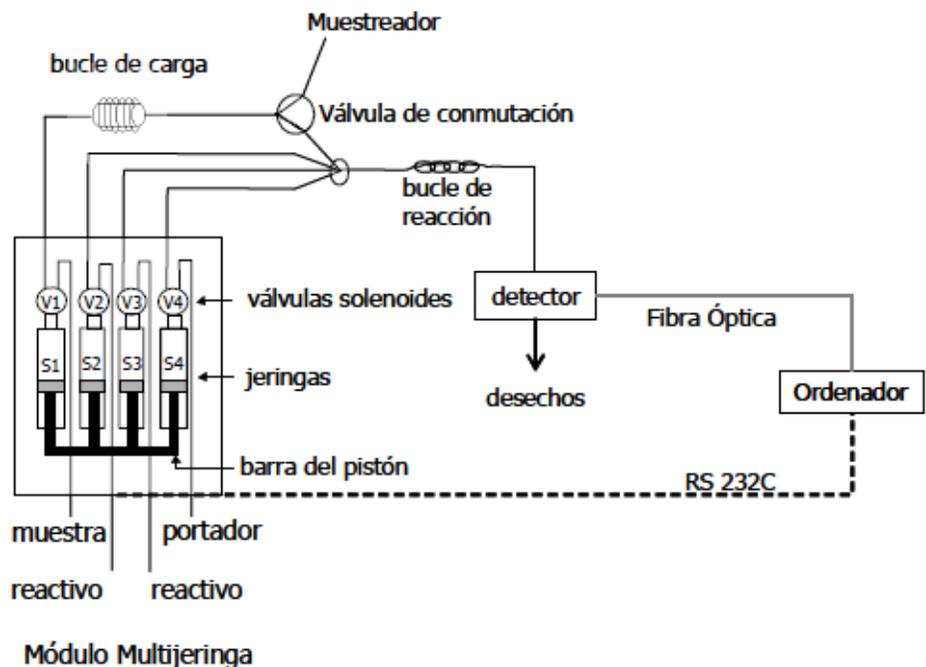
Otra ventaja del MCFIA es la alta frecuencia de inyección lograda (100 inyecciones/hora) debido a la rapidez con la que conmutan las válvulas. Sin embargo, un inconveniente que presenta este tipo de análisis en flujo es el sobrecalentamiento de las válvulas debido al calor disipado por el bobinado del solenoide cuando las válvulas están activadas durante un tiempo prolongado. Para evitar dicho sobrecalentamiento es aconsejable utilizar algún dispositivo de protección electrónico.

#### *Análisis por inyección en flujo multijeringa*

Esta técnica de análisis automático, denominada análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) ha sido propuesta en 1999 por el grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares (UIB), España. Esta técnica, que se presenta como una herramienta poderosa para la manipulación automática en flujo de disoluciones, reúne diversas ventajas de las otras técnicas de análisis en flujo ya existentes, tales como la alta frecuencia de análisis del FIA, la robustez y versatilidad del SIA y la simplicidad del MCFIA.

El MSFIA se beneficia de la versatilidad y robustez de los sistemas de inyección secuencial utilizando bombas de pistón provistas de jeringas como impulsores de líquidos. De este modo, se evitan los continuos procedimientos de re-calibración requeridos en los sistemas basados en bombas peristálticas, manteniendo la eficiencia de la mezcla radial de las zonas de muestra y reactivos de los métodos de inyección en flujo. Debido a que los líquidos entran en contacto solamente con tubos de vidrio o de PTFE, el MSFIA permite el uso de reactivos agresivos y disolventes orgánicos.

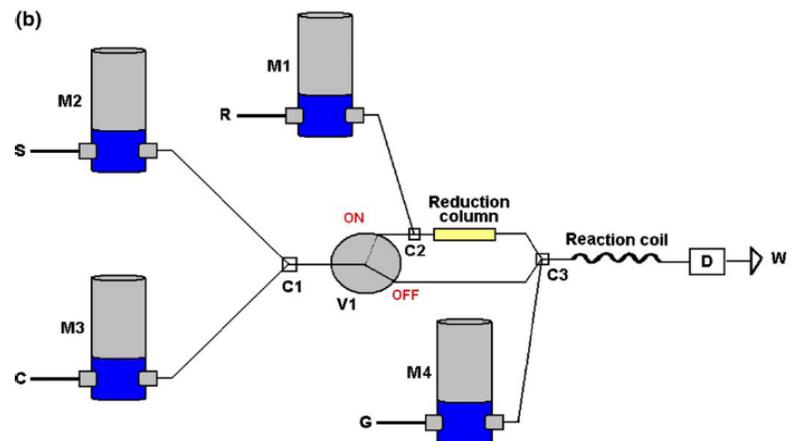
Como se puede ver en la Figura 8, un sistema MSFIA está compuesto básicamente por un módulo con cuatro jeringas, movidas conjuntamente por un mismo motor paso a paso. Cada jeringa tiene acoplada en su cabeza una válvula solenoide de tres vías, lo que permite una gran variedad de modalidades de inyección, como protocolos de multiconmutación. Además, gracias a estas válvulas, los reactivos son devueltos a sus recipientes cuando no son necesarios, sin perturbar el desarrollo de la reacción. Por lo tanto, se logra una reducción de más de 10 veces en la generación de residuos respecto a las técnicas convencionales de inyección en flujo (Ferrer, 2007).



**Figura 8.** Representación esquemática de un sistema MSFIA.

*Sistema de flujo multibomba*

El sistema de flujo multibomba (MPFS) fue propuesto por Lapa y colaboradores, en 2002. El MPFS se basa en la utilización de bombas solenoides de pistón, donde cada pistonada significa la impulsión de un volumen predeterminado de líquido (3, 8, 20, 25, 50 µl), y que junto con la frecuencia de dichas pistonadas definen el caudal del sistema (Figura 9).



**Figura 9.** Representación esquemática de un sistema MPFS.

Las características más destacables del MPFS son su gran versatilidad, fácil configuración, robustez y bajo costo, ya que cada bomba hace a la vez la función de propulsor del líquido y

de válvula. Además, se consigue una señal analítica más alta, efecto que se atribuye a que las pistonadas provocan movimientos turbulentos que facilitan la mezcla entre la muestra y los reactivos (Cerdà y Pons, 2006).

### 3. ANTECEDENTES

El análisis en flujo representa una buena alternativa sobre los métodos tradicionales de determinación usados en el campo ambiental. Entre sus ventajas se encuentran que consume menores volúmenes de muestra y reactivos, elevada frecuencia de análisis de muestras y principalmente la posibilidad de desarrollar sistemas de monitoreo automatizado adaptando diferentes técnicas e instrumentos. Muchas técnicas han sido adaptadas al análisis en flujo. En el caso del nitrato y nitrito, el método más usado para su determinación ha sido el método colorimétrico en combinación con la reducción en línea de nitrato a nitrito, para determinar uno o ambos aniones simultáneamente (Cerdà *et al.*, 1998; Gabriel *et al.*, 1998; Baeda *et al.*, 2001; Kazemzadeh y Ensafi, 2001; Miró *et al.*, 2001; Legnerova *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Burakham *et al.*, 2004; Ensafi *et al.*, 2004; Baeza *et al.*, 2005; Pons *et al.*, 2008; Somnam *et al.*, 2008; Tsoulfanidis *et al.*, 2008; Mesquita *et al.*, 2009). Otros métodos en flujo han sido desarrollados para determinar nitrato y nitrito adaptando otras técnicas o instrumentos de detección a los mencionados anteriormente, la detección por medio de sensores (Hassan *et al.*, 2007), métodos catalíticos (Yue *et al.*, 2004), técnicas basadas en la capacidad de oxidación de diferentes compuestos (Monser *et al.*, 2002), métodos quimiluminiscentes (Kanda y Taira, 2003; Mikuska y Vecera, 2003), espectrometría de absorción atómica (Noroozifar *et al.*, 2007) y absorción molecular en fase gaseosa (Haghighi y Tavassoli, 2002; Haghighi y Kurd, 2004). El método turbidimétrico ha sido el más empleado para la determinación de sulfato (Santelli *et al.*, 1995; van Staden y Taljaard, 1996; Vieira *et al.*, 2001; Fortes *et al.*, 2008; Melchert y Rocha, 2008). Mientras que para sulfato, diferentes arreglos han sido propuestos como el uso de un sensor (Fung *et al.*, 2008), una columna reactor (Burakham *et al.*, 2004) y espectrometría de fluorescencia atómica (Tyson y Palmer, 2009).

Sin embargo, las limitaciones de los métodos tradicionales y los problemas de algunos sistemas de análisis en flujo, han limitado su aplicación para determinar nitrato, nitrito y sulfato en aguas con el mismo sistema.

### **III. OBJETIVO**

#### **1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un sistema automatizado de monitoreo multiparamétrico basado en el análisis por inyección secuencial (SIA) para la determinación de nitrito, nitrato y sulfato en aguas.

#### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1) Diseñar y construir un sistema de análisis en flujo multiparamétrico, utilizando la técnica SIA y un espectrofotómetro UV-Visible como sistema de detección.

2) Optimizar el sistema implementado a través de ensayos analíticos para encontrar los valores óptimos (en términos de sensibilidad y reproducibilidad) de cada una de las variables que influyen en el sistema.

3) Determinar los parámetros analíticos del sistema propuesto, mediante ensayos utilizando las condiciones óptimas obtenidas en la etapa anterior. Estos parámetros analíticos serían curva de calibración, rango lineal, coeficiente de correlación, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección y frecuencia de análisis.

4) Validar los métodos desarrollados a través del análisis de materiales de referencia certificados.

5) Aplicar la metodología desarrollada al análisis de muestras de agua.

## IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Con excepción de la goma arábica comercial, todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y las disoluciones se prepararon con agua desionizada (Millipore, 18.2 MΩ-cm).

- Para la determinación de nitrito y nitrato, los reactivos utilizados se prepararon como se describe a continuación:

La disolución de reactivo cromogénico ( $0.23 \text{ mol L}^{-1}$ ) se preparó disolviendo 3.96 g de sulfanilamida (J.T. Baker) en aproximadamente 80 ml de agua para después adicionar 10 ml de HCl concentrado (J.T. Baker), y 0.01 g de N-(1-naftil) etilen diamina (J.T. Baker). Posteriormente se mezcló para disolver y se diluyó hasta 100 ml con agua.

La disolución buffer A se preparó disolviendo en 80 ml de agua 8 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (J.T. Baker), después se añadió 1.5 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$  (J.T. Baker) y por último 0.05 g de sal disódica de EDTA (J.T. Baker) para finalmente mezclar para disolver y diluir hasta 100 ml con agua.

La columna de reducción de cadmio se preparó usando gránulos de cadmio como fue descrito por Cerdà et al. (1998). Se pesaron gránulos de Cadmio (Fluka Analytical), los cuales fueron lavados con una disolución  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl (J.T. Baker) y subsecuentemente cubiertos con cobre sumergiéndolos en una disolución al 1% de  $\text{CuSO}_4$  (J.T. Baker) por aproximadamente 1 minuto. Los gránulos cuperizados fueron lavados con agua desionizada, y empacados en una columna de metacrilato (55 mm de largo y 4 mm de diámetro interno), cuyos extremos se taparon con lana de vidrio.

La disolución regeneradora de la columna de cadmio se preparó disolviendo 3.8 g de sal disódica de EDTA (J.T. Baker) en 50 ml de agua y después se agregaron 1.25 g  $\text{CuSO}_4$  (J.T. Baker). Posteriormente se ajustó el pH a  $7 \pm 0.05$  con una disolución de  $1 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH (J.T. Baker) y se diluyó hasta 100 ml con agua.

- Para la determinación de sulfato se prepararon los reactivos a utilizar de la siguiente forma:

La disolución buffer B se preparó disolviendo 7.5 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker), 1.25 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker), 0.25 g  $\text{KNO}_3$  (DEQ), 5 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  concentrado (J.T. Baker) y 12.5 g de goma arábica comercial (para obtener una concentración de alrededor del 5% m/v) en 250 ml de agua.

La disolución limpiadora compuesta por 0.3% de sal disódica de EDTA y 0.2 mol  $\text{L}^{-1}$  de NaOH, se preparó disolviendo 0.75 g de sal disódica de EDTA (J.T. Baker) y 2 g de NaOH (J.T. Baker), se mezcló y diluyó hasta 250 ml con agua.

La disolución de reactivo precipitante al 4% de  $\text{BaCl}_2$  (m/v) se preparó disolviendo 10 g de  $\text{BaCl}_2$  (J.T. Baker) y diluyendo hasta 250 ml con agua.

Las disoluciones patrón de 1000 mg  $\text{NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ , 1000 mg  $\text{NO}_3^- \text{-L}^{-1}$  y 1000 mg  $\text{SO}_4^{2-} \text{-L}^{-1}$  fueron preparadas diariamente disolviendo 0.493 g de  $\text{NaNO}_2$  (Sigma-Aldrich), 0.607 g de  $\text{NaNO}_3$  (J.T. Baker) y 0.147 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (J.T. Baker), respectivamente, en agua y diluidas hasta 100 ml. Los estándares de calibración fueron preparados por debida dilución de la disolución madre con agua.

El *carrier* o corriente portadora fue en todos los casos agua desionizada (Millipore, 18.2  $\text{M}\Omega\text{-cm}$ ).

## 2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

### *Sistema de análisis en flujo*

El sistema desarrollado en este estudio para la determinación de nitrito, nitrato y sulfato en agua potable y residual se basa en el análisis por inyección secuencial (SIA), el cual comprende una bureta automática como bomba tipo pistón, una válvula de selección y un espectrofotómetro CCD (*Charge-Coupled Device*) UV-VIS.

El SIA utiliza como impulsor de líquidos, una bomba de pistón multijeringa (Crison, España), equipada con una jeringa de un volumen de 10 ml (B-D Plastipak, EUA), la cual se halla conectada en bloque mediante la barra del pistón al mismo motor a pasos, tal como se muestra en la Figura 10. Existen una gran variedad de jeringas con volúmenes comprendidos

entre 0.5 y 25 ml, lo cual permite obtener diferentes caudales y volúmenes de inyección a través de un mismo conjunto de tuberías.

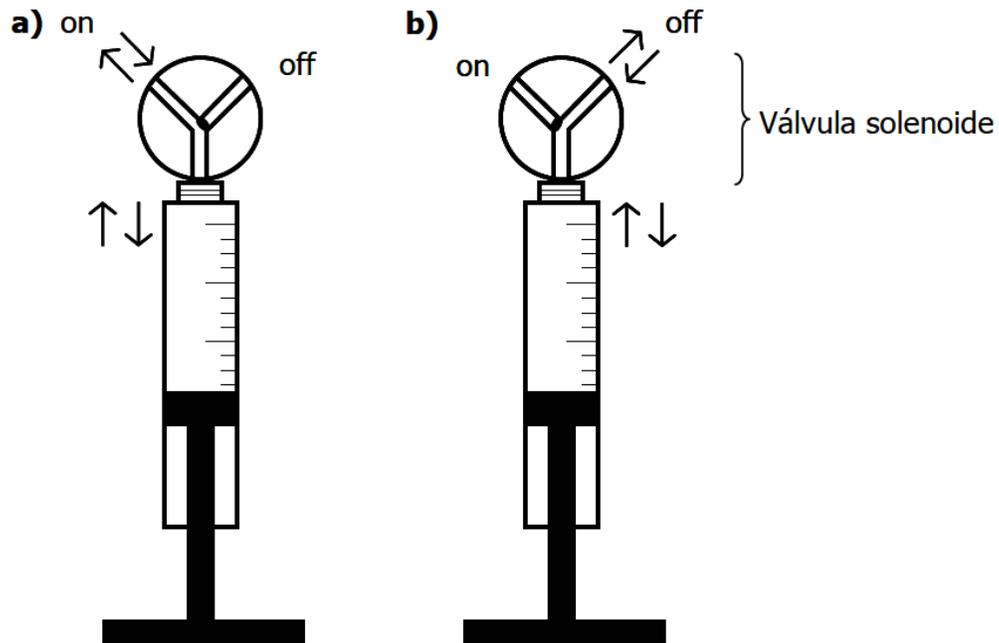


**Figura 10.** Módulo de multijeringa utilizado en el sistema SIA.

También cabe señalar que la velocidad del motor a pasos puede ajustarse dentro de un amplio rango, de modo que las reacciones con diferentes cinéticas pueden fácilmente acomodarse sin ninguna re-configuración del *manifold* (sistema de tubos que conducen los reactivos y la muestra).

La jeringa tiene en la parte superior una válvula solenoide de tres vías, la cual permite los esquemas de multiconmutación. Las válvulas solenoides de tres vías tienen dos posiciones: “on” y “off”, las cuales permiten la conexión de un canal común a dos diferentes canales de entrada/salida, mediante la activación y desactivación del solenoide. Las posiciones “on” y “off” del solenoide son independientes del desplazamiento del pistón, resultando dos direcciones opcionales de flujo para el movimiento ascendente del pistón y otras dos para el movimiento descendente, como se esquematiza en la Figura 11. Usualmente, la posición “on” se conecta al sistema, mientras que la posición “off” se asigna al reservorio de *carrier*. Sin embargo, ésta última se selecciona en los pasos largos, de modo de mantener el solenoide desactivado el mayor tiempo posible, y así evitar el recalentamiento de las válvulas.

La implementación de estas válvulas de conmutación en la cabeza de cada jeringa permite la inyección precisa de volúmenes bien definidos de muestras y reactivos de acuerdo con una programación establecida para efectuar las mediciones analíticas.



**Figura 11.** Representación de las válvulas solenoides.

a) Solenoide activado: posición “on” y b) Solenoide desactivado: posición “off”.

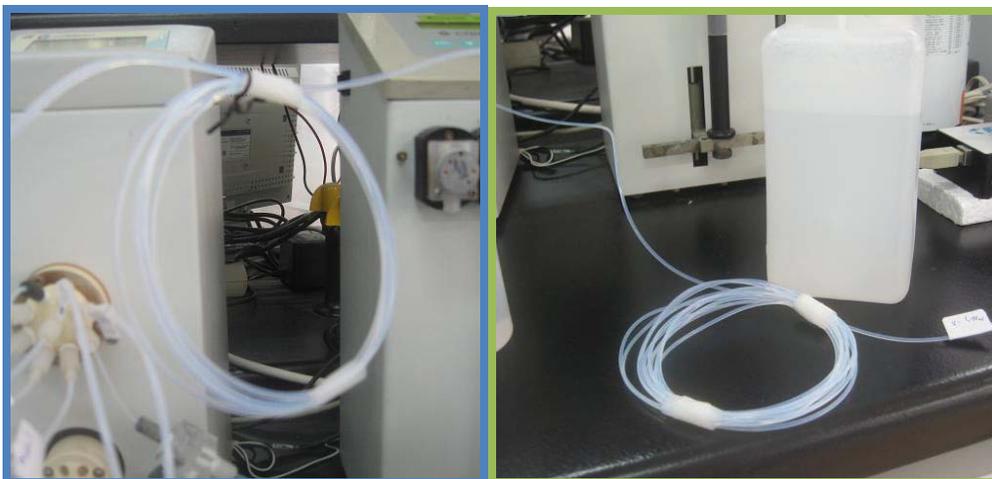
La técnica propuesta utiliza un módulo de válvulas equipado con una válvula de selección de ocho puertos (Crison, España). Este módulo se conecta mediante el puerto central de la válvula a la bureta automática y enlaza a los puertos laterales a través de un canal que conecta al puerto central con los laterales por la rotación de la válvula, haciendo al sistema más simple y barato (Figura 12). El sistema desarrollado tiene conectada la bomba de pistón al módulo de válvulas, lo que permite cargar los reactivos y la muestra al bucle de carga y luego dispensarla hacia el sistema. Este procedimiento tiene la gran ventaja de que permite que el sistema sea multiparamétrico, lo que significa la posibilidad de realizar la determinación de diferentes parámetros sin la necesidad de cambiar el *manifold*. Además, como no se introducen los reactivos y la muestra directamente en la jeringa, se evita un gran consumo de tiempo de pasos de lavado, necesarios para evitar la contaminación cruzada entre muestras consecutivas.



**Figura 12.** Detalle de la válvula de selección utilizada en SIA. A la derecha se muestra desmontada para poder apreciar su configuración.

El control automático del dispositivo de flujo mediante ordenador se realiza a través de una interfase RS232C. A su vez, esta interfase permite también la conexión de módulos en cadena, utilizando un solo puerto serie de la computadora.

El sistema comprende un conjunto de tuberías (*manifold*) de los cuales, el bucle de carga (BC) y los tubos utilizados para cargar los reactivos y la muestra a través de la conmutación de la válvula de selección fueron hechos con tubería de PTFE (politetrafluoroetileno) de 1.5 mm de diámetro interno, el bucle de reacción (BR) y los conductos del sistema conectados a la válvula de selección fueron hechos con tubería de 0.8 mm de diámetro interno, mientras que el tubo utilizado para cargar la jeringa fue de 1.5 mm de diámetro interno. Los bucles de carga y de reacción mostrados en la Figura 13, se prepararon atando 200 cm y 400 cm de la tubería de PTFE en círculos, respectivamente.



**Figura 13.** Bucle de carga (izquierda) y bucle de reacción (derecha).

#### *Columna de reducción de cadmio*

La columna de reducción (CR) utilizada en el método de análisis en flujo propuesta para realizar la determinación de nitrato mediante la reducción en línea del nitrato a nitrito, está formada por un tubo de PMMA (polimetilmetacrilato) de 55 mm de largo y 4 mm de diámetro interno (Figura 14).

La columna está rellena con gránulos de cadmio cuperizado y conectada a la válvula de selección y al bucle de reacción del sistema mediante un conector de tres vías construido en el laboratorio con PMMA (polimetilmetacrilato), de modo que la reducción de nitrato a nitrito se lleva a cabo antes del paso por el bucle de reacción.



**Figura 14.** Detalle de la columna de reducción.

### *Sistema de detección*

En el método desarrollado se utilizó un sistema de detección óptica. En la Figura 15 se muestra el detector óptico utilizado, que consistió en un espectrofotómetro CCD (Charge-Coupled Device) externo con conexión USB 2000 (Ocean Optics).

Como fuente de luz se utilizó un diodo emisor de luz o LED (*Light Emission Diode*) verde de una banda espectral entre 480 y 600 nm (Sciware, España) con una fuente de suministro de energía de intensidad de corriente constante ajustable (Sciware, España). Este dispositivo es sencillo y muy económico, de comportamiento muy estable y puede alimentarse por dispositivos electrónicos muy simples. Debido a que la radiación emitida es proporcional a la intensidad de corriente que circula a través del LED, normalmente se alimentan con fuentes de intensidad en vez de fuentes de tensión.



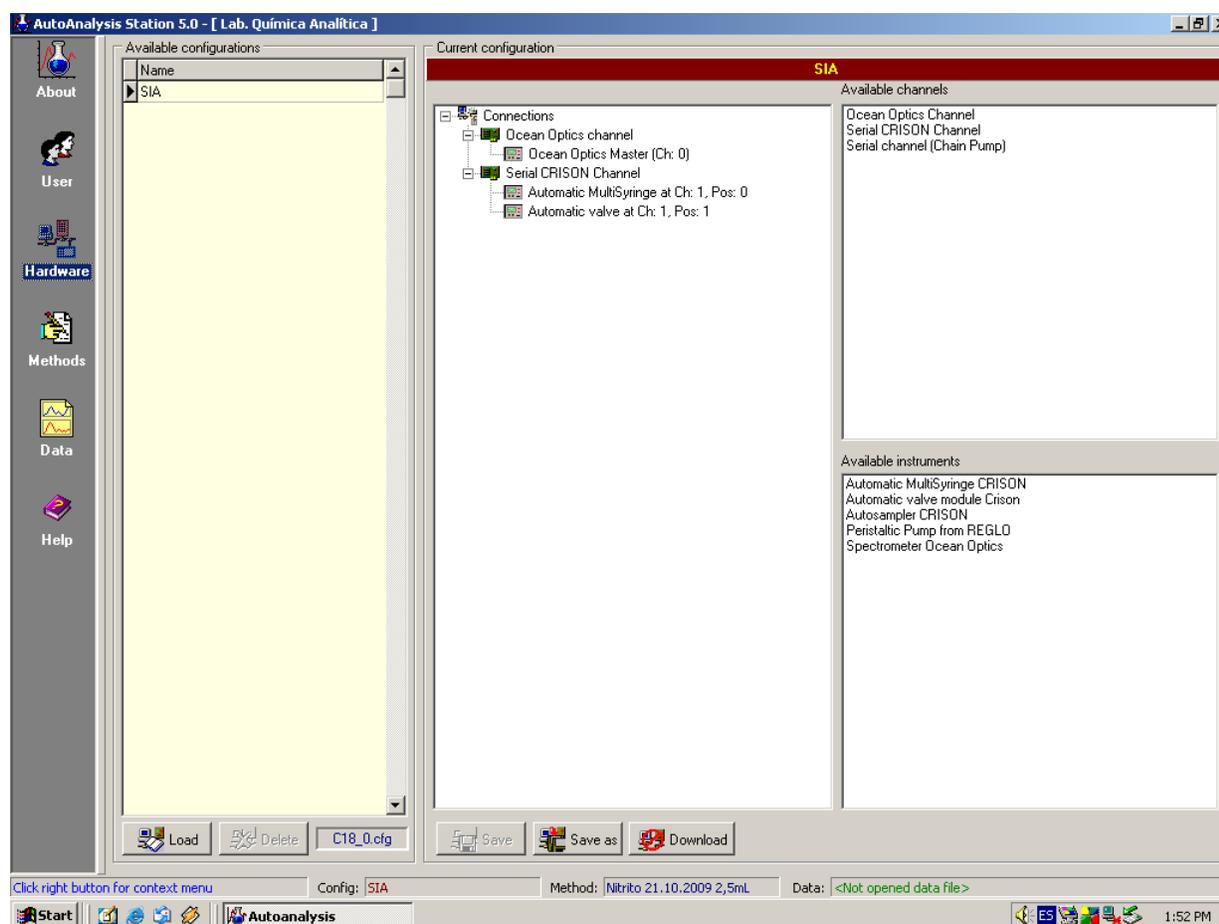
**Figura 15.** Sistema de detección espectrofotométrica, constituido por un espectrofotómetro CCD (USB 2000, Ocean Optics) y un cabezal de diodos LED alimentado por una fuente de intensidad.

### *Software*

El control instrumental, la adquisición de datos y el procesamiento de los mismos se realizaron mediante el programa AutoAnalysis 5.0 desarrollado por Sciware (España). La característica distintiva de dicho programa, realizado con Delphi 5.0 y Visual C++ 6.0 y basado en librerías de enlace dinámico (DLL's) a 32 bits, es la viabilidad de usar una aplicación simple y versátil, para cualquier instrumentación y sistema de detección utilizados. Además, el trabajar a 32 bits ha permitido desarrollar un programa multitarea, que permite

simultáneamente la aplicación del método en flujo desarrollado, el tratamiento de datos por el mismo programa y la edición de documentos con otros programas comerciales.

El programa incluye un menú de configuración de los equipos que conforman el analizador en flujo montado. Para comenzar se seleccionan de una lista de disponibles, las DLL's de los canales de comunicación necesarios para el detector y demás instrumentos. Luego se cargan las DLL's individuales y específicas de cada instrumento, tales como DLL's diseñadas para el control del módulo multijeringa, del muestreador automático o de un espectrofotómetro. La Figura 16 muestra el panel de control de conexiones del Autoanalysis.



**Figura 16.** Pantalla del panel de control de conexiones del software Autoanalysis.

La edición de un método analítico con el programa AutoAnalysis consiste en crear una secuencia de instrucciones, donde cada instrucción es ejecutada por uno de los instrumentos conectados o bien es un comando definido por el sistema para controlar el tiempo, agregar

marcas, condicionales o repetir procedimientos. Un procedimiento es un conjunto de instrucciones agrupadas bajo el mismo nombre, que bien puede repetirse dentro del mismo método o puede ser utilizado por métodos diferentes, con la ventaja de definirlo sólo una vez. La Figura 17 muestra el panel de edición de procedimientos analíticos del Autoanalysis. La ejecución de las instrucciones de los instrumentos puede llevarse a cabo de dos maneras, en forma exclusiva durante la cual no se realizará ninguna otra instrucción hasta finalizar la que está en curso, y en forma no exclusiva según la cual el método continúa con la ejecución de los pasos sucesivos sin finalizar la que está en curso.

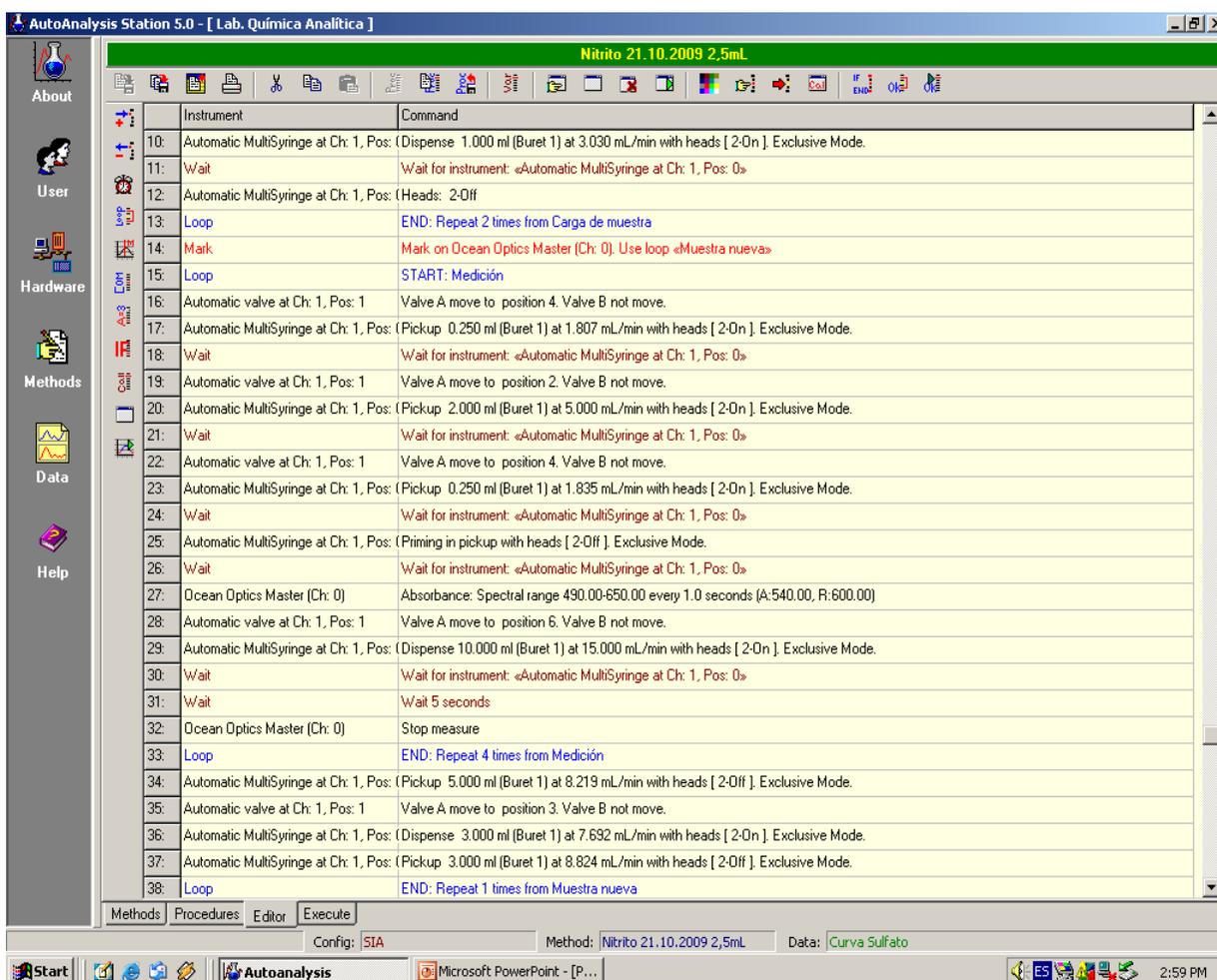


Figura 17. Pantalla del panel de edición de métodos analíticos del software Autoanalysis.

Una vez definido un método o cargado uno existente, se procede a la ejecución del mismo. Mediante una barra de herramientas se puede controlar dicha ejecución y los parámetros del

área de dibujo. El programa AutoAnalysis registra la señal analítica y a su vez da un valor numérico del parámetro de interés basado en dicha señal (altura de pico ó área de pico) que es seleccionado por el usuario (Figura 18). Además, permite el procesamiento de los datos que acaba de adquirir o aquellos registrados en experimentos anteriores. También se pueden almacenar los espectros obtenidos durante la adquisición y recuperarlos más tarde. Dentro del procesamiento de datos, AutoAnalysis permite el suavizado de los picos, así como obtener su primera y segunda derivada, visualizar la línea de base utilizada en el cálculo de áreas y alturas de pico, así como corregir su integración si se aprecia que no son correctas, eliminar picos no deseados producto de pequeñas burbujas en el sistema, realizar y trabajar con curvas de calibración integradas, hasta realizar el procesamiento en-línea de los datos mediante el uso de condicionales.

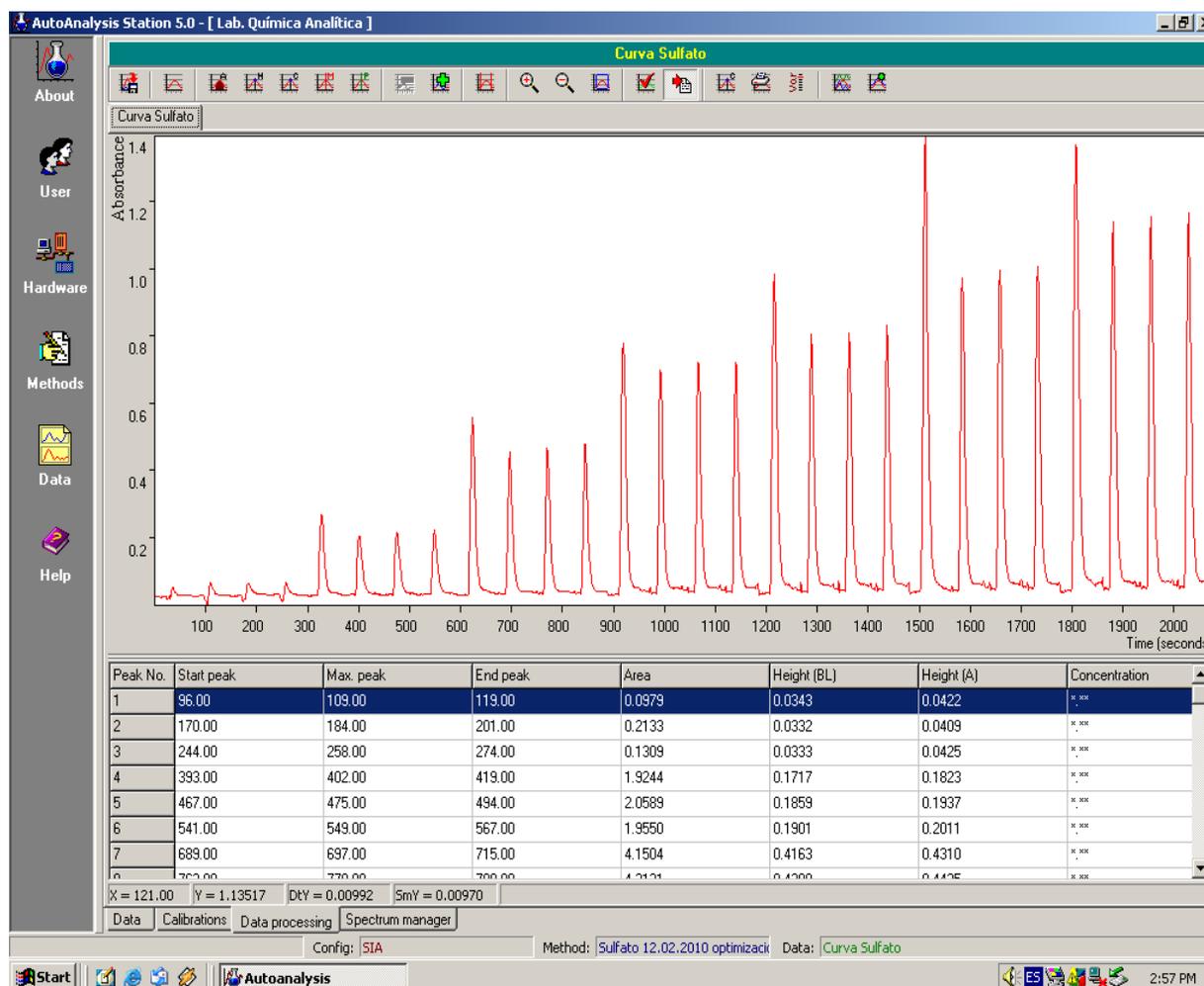
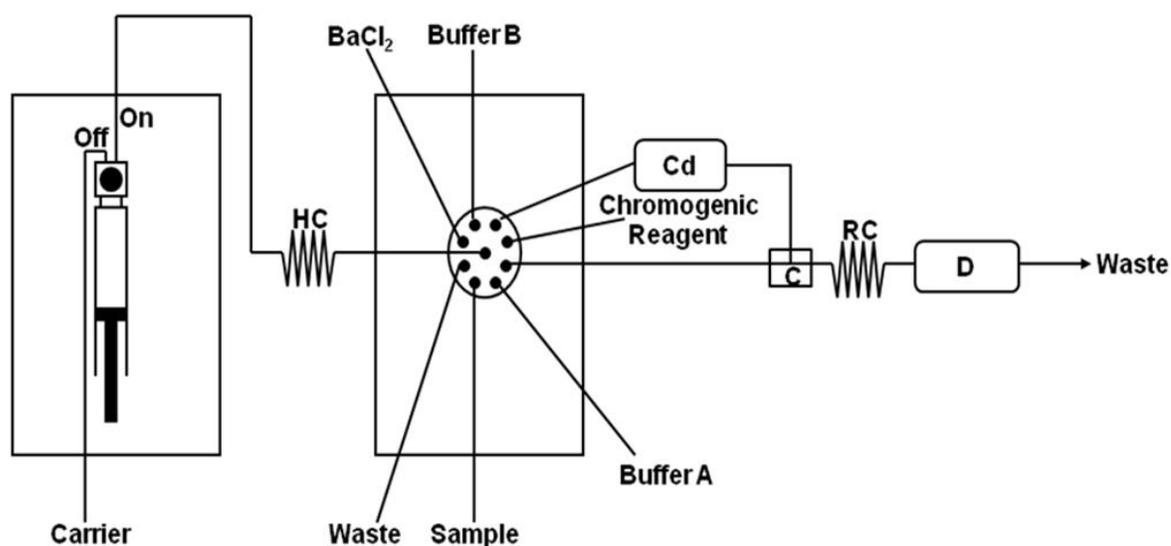


Figura 18. Pantalla del registro de la señal analítica del software Autoanalysis.

### 3. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

En esta sección se describe la secuencia de instrucciones de la adaptación de los métodos estándar (Eaton, 1998) al sistema de análisis por inyección secuencial (SIA) propuesto. En la Figura 19 se muestra la representación esquemática del sistema de monitoreo SIA propuesta para la determinación de nitrato, nitrito y sulfato.

La característica principal de la configuración propuesta es la viabilidad de determinar los tres parámetros de interés sin realizar modificaciones al sistema y utilizando un mismo detector.



**Sistema de monitoreo SIA propuesto para  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ .** HC: Bucle de carga; RC: Bucle de reacción; C: Conector de tres vías; Cd: Columna de cadmio; D: Detector UV-VIS; Buffer A: Solución de Cloruro de Amonio-EDTA; Buffer B: Solución de Cloruro de Magnesio-Ácido Acético-Goma Arábica.

**Figura 19.** Representación del sistema SIA propuesto.

El protocolo automatizado para la determinación espectrofotométrica SIA de nitrato, nitrito y sulfato puede resumirse como sigue:

1- Inicialmente, se llena la tubería con la muestra desde su respectivo depósito por medio de la conmutación de la válvula solenoide en posición "on" y de la válvula de selección en el puerto 2 aspirando 0.7 ml de muestra y dispensando el exceso a través del puerto 1 para residuos (*waste*).

- Para determinación de nitrito:

2- Se empleó la técnica *sándwich* (Cerdà et al., 1998), que consiste en colocar segmentos de los reactivos entre volúmenes de la muestra. Éstos se aspiran hacia el bucle de carga (válvula solenoide en posición “on”) como sigue: 0.25 ml de reactivo cromogénico a través del puerto 4, 2 ml de muestra mediante el puerto 2 y nuevamente 0.25 ml de reactivo cromogénico por su respectivo puerto de carga a un caudal de  $1.8 \text{ ml min}^{-1}$ .

3- El espectrofotómetro comienza la adquisición de datos con las siguientes condiciones de trabajo configuradas con AutoAnalysis 5.0:  $\lambda = 540 \text{ nm}$ , 8 milisegundos de tiempo de integración, 3 lecturas para promediar, ventana de suavizado de 4 puntos y una frecuencia de lectura de 1 segundo.

4- Se mueve la válvula de selección hacia el puerto 3 y con la válvula solenoide en posición “on” se dispensan 10 ml de *carrier* a un caudal de  $15 \text{ ml min}^{-1}$ , enviando así los volúmenes cargados previamente de muestra y reactivo cromogénico hacia el bucle de reacción y posteriormente pasan al espectrofotómetro.

5- Por último, se cargan 3.5 ml de *carrier* (caudal de  $7.5 \text{ ml min}^{-1}$ ) a la jeringa (válvula solenoide en posición “off”), los cuales se dispensan a un caudal de  $5 \text{ ml min}^{-1}$  por el puerto 3 (válvula solenoide en posición “on”) para enjuagar el bucle de reacción, dejando el sistema listo para un nuevo ciclo analítico.

- Para determinación de nitrato:

6- Se aspiran hacia el bucle de carga (válvula solenoide en posición “on”) 0.1 ml de reactivo cromogénico a través del puerto 4, 0.016 ml de buffer A por el puerto 5 y 0.5 ml de muestra mediante el puerto 2 a un caudal de  $1.8 \text{ ml min}^{-1}$ . Se realizan en cuatro ocasiones los pasos de aspiración de muestra y reactivos descritos previamente y finalmente se cargan 0.016 ml de buffer A y 0.1 ml de reactivo cromogénico por sus respectivos puertos de carga a un caudal de  $1.8 \text{ ml min}^{-1}$ .

7- El espectrofotómetro comienza la adquisición de datos con las siguientes condiciones de trabajo configuradas con AutoAnalysis 5.0:  $\lambda = 540 \text{ nm}$ , 8 milisegundos de tiempo de

integración, 3 lecturas para promediar, ventana de suavizado de 4 puntos y una frecuencia de lectura de 1 segundo.

8- Se mueve la válvula de selección hacia el puerto 6 y con la válvula solenoide en posición "on" se dispensan 10 ml de *carrier* a un caudal de  $15 \text{ ml min}^{-1}$ , enviando así los volúmenes cargados previamente de muestra y reactivos hacia la columna de reducción, después al bucle de reacción y posteriormente al espectrofotómetro.

9- Por último, se cargan 3.5 ml de *carrier* (caudal de  $7.5 \text{ ml min}^{-1}$ ) a la jeringa (válvula solenoide en posición "off"), los cuales se dispensan a un caudal de  $5 \text{ ml min}^{-1}$  por el puerto 6 (válvula solenoide en posición "on") para limpiar la columna de reducción y el bucle de reacción, dejando el sistema listo para un nuevo ciclo analítico.

- Para determinación de sulfato:

10- Se aspiran hacia el bucle de carga (válvula solenoide en posición "on") 0.17 ml de reactivo precipitante a través del puerto 8, 0.067 ml de buffer B por el puerto 7 y 0.5 ml de muestra mediante el puerto 2 a un caudal de  $1.8 \text{ ml min}^{-1}$ . Se realizan en dos ocasiones los pasos de aspiración de muestra y reactivos descritos previamente y finalmente se cargan 0.066 ml de buffer B y 0.16 ml de reactivo precipitante por sus respectivos puertos de carga a un caudal de  $1.8 \text{ ml min}^{-1}$ .

11- El espectrofotómetro comienza la adquisición de datos con las siguientes condiciones de trabajo configuradas con AutoAnalysis 5.0:  $\lambda = 540 \text{ nm}$ , 8 milisegundos de tiempo de integración, 3 lecturas para promediar, ventana de suavizado de 4 puntos y una frecuencia de lectura de 1 segundo.

12- Se mueve la válvula de selección hacia el puerto 3 y con la válvula solenoide en posición "on" se dispensan 10 ml de *carrier* a un caudal de  $10 \text{ ml min}^{-1}$ , enviando así los volúmenes cargados previamente de muestra y reactivos hacia el bucle de reacción y posteriormente pasan al espectrofotómetro.

13- Después de cada determinación de sulfato, se requiere un proceso de lavado para remover el precipitado adherido a la tubería. Esto se realiza cargando 2 ml (caudal de  $5 \text{ ml min}^{-1}$ )

min<sup>-1</sup>) de la solución limpiadora a través del puerto 1 y enviándola por el puerto 3 al bucle de reacción a un caudal de 4 ml min<sup>-1</sup>.

14- Por último, se cargan 3.5 ml de carrier (caudal de 7.5 ml min<sup>-1</sup>) a la jeringa (válvula solenoide en posición "off"), los cuales se dispensan a un caudal de 5 ml min<sup>-1</sup> por el puerto 3 (válvula solenoide en posición "on") para limpiar el bucle de reacción, dejando el sistema listo para un nuevo ciclo analítico.

En la Tabla 2 se pueden apreciar de forma resumida los pasos principales del método analítico para el sistema propuesto.

**Tabla 2.** Programa SIA usado para la determinación automática de nitrito, nitrato y sulfato.

Paso	Vol. (ml)	Caudal (ml min <sup>-1</sup> )	Operación	Válvula solenoides	Válvula selección
<b>Para NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>					
Carga de reactivo y muestra usando técnica sandwich	2.5	1.8	Carga	On	2, 4
Inyección de muestra y reactivo al detector	10	15	Inyección	On	3
<b>Para NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>					
Carga de reactivo y muestra usando técnica sandwich	2.58	1.8	Carga	On	2, 4, 5
Inyección de muestra y reactivo a través de la columna al detector	10	15	Inyección	On	6
<b>Para SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>					
Carga de reactivo y muestra usando técnica sandwich	1.7	1.8	Carga	On	2, 7, 8
Inyección de muestra y reactivo al detector	10	10	Inyección	On	3
Carga de solución limpiadora	2	5	Carga	On	1
Remoción del precipitado en el sistema	3	4	Inyección	On	3

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA

Al inicio del desarrollo experimental, se eligió la técnica *sandwich* (Cerdà et al., 1998). De esta manera con la muestra localizada entre dos zonas de reactivos hasta alcanzar el volumen total, se obtiene la lectura más alta por muestra inyectada. Se realizaron ensayos preliminares para probar el llenado de dos columnas de reducción con diferentes dimensiones, la primera de 100 mm de largo y 3 mm de diámetro interno y una segunda columna de 55 mm de largo y 4 mm de diámetro interno. Esto permitió determinar las mejores dimensiones para el llenado de la columna y reducir la posibilidad de formación de burbujas durante este proceso y evitar la disminución del área de conversión de nitrato a nitrito. Se obtuvieron mejores resultados con la segunda columna probada. Además, se realizaron pruebas preliminares para seleccionar la configuración del bucle de reacción a emplear. Para esto se tomaron dos arreglos diferentes de bucles de reacción para estos ensayos: uno bobinado y otro anudado, ambos elaborados con tubería PTFE (politetrafluoroetileno) de 400 cm de largo y 0.8 mm de diámetro interno. Las pruebas se realizaron con el método de nitrito con las siguientes condiciones de trabajo: patrón de nitrito de  $0.2 \text{ mg N L}^{-1}$  y reactivo cromogénico  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$ . No se encontraron diferencias importantes en cuanto a repetibilidad y reproducibilidad de la señal analítica comparando ambas configuraciones de bucle de reacción. Se eligió el bucle bobinado para llevar a cabo todas las investigaciones debido a su simplicidad.

### 2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para la optimización del sistema se realizó un diseño experimental que se dividió en dos etapas. Se utilizó el programa computacional Minitab 15 (Minitab Inc.) como herramienta auxiliar.

La primera etapa consistió en la aplicación de la metodología de diseño experimental factorial  $2^k$ , la cual se utilizó para estudiar los efectos de las variables individuales o sus interacciones sobre la respuesta obtenida con el detector. La segunda etapa fue la aplicación de la metodología de superficie de respuesta para determinar los valores óptimos de las variables consideradas significativas en la primera etapa. Se utilizó el diseño experimental

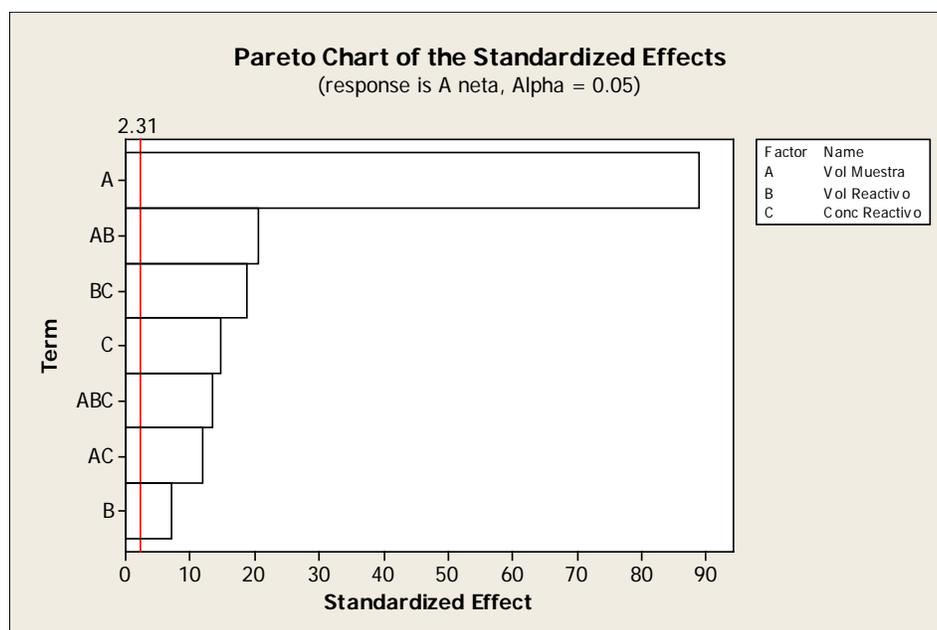
*Box-Behnken (Face Centered Design)*, obteniendo un total de 53 corridas experimentales con las cuales se determinaron los valores óptimos de las variables involucradas.

Con el diseño experimental se logró encontrar la región de dominio experimental correspondiente al valor óptimo; dentro de esta región se eligieron los valores de las variables con los cuales se obtuvieron una alta señal analítica y alta frecuencia de análisis.

#### *Estudio de variables*

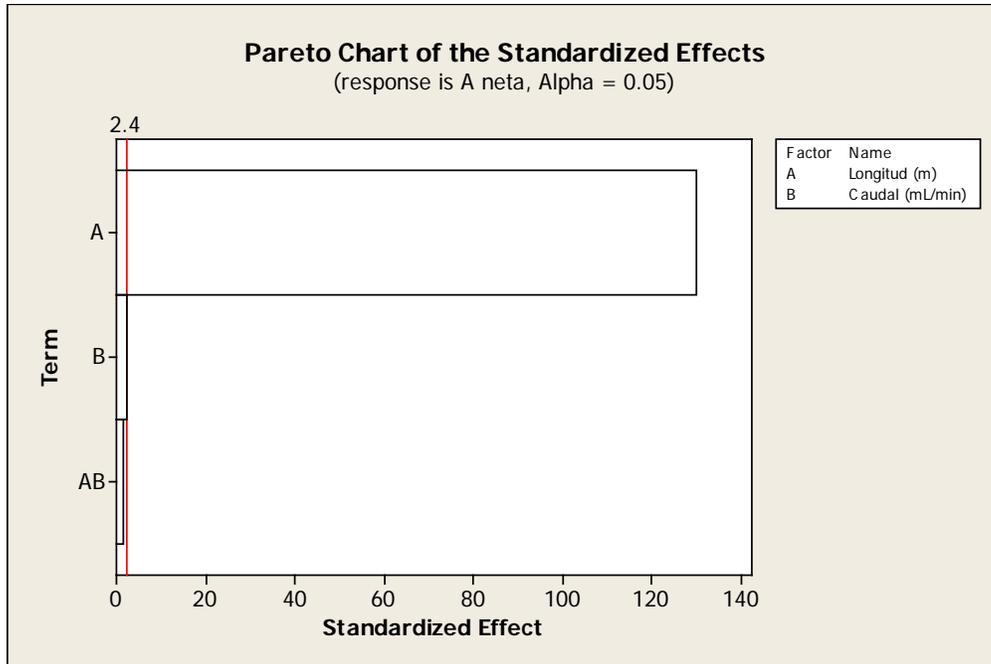
Las variables químicas y dinámicas fueron estudiadas para observar su efecto conjunto sobre la señal obtenida, para esto se realizó el diseño experimental factorial  $2^k$ .

Las variables químicas estudiadas fueron el volumen de muestra, los volúmenes de reactivos y las concentraciones de estos últimos. Se observó que las variables seleccionadas tienen una clara interacción entre ellas, motivo por el cual se consideraron todas como influyentes sobre la señal analítica. El volumen de la muestra tuvo el mayor efecto. En el gráfico de Pareto de la Figura 20, se pueden apreciar los efectos de las variables químicas y sus respectivas interacciones. Todas las variables químicas fueron tomadas en cuenta para la etapa de determinación de los valores óptimos, la cual se verá más adelante, debido a que tienen un efecto significativo sobre la señal analítica.



**Figura 20.** Gráfico de Pareto para las variables químicas.

Las variables dinámicas contempladas dentro del estudio de variables fueron el caudal y la longitud del bucle de reacción. Se observó que la longitud del bucle de reacción fue la variable que mayor efecto tuvo sobre la señal analítica, mientras que para el caudal se observó apenas un ligero efecto, y la interacción entre estas dos variables no fue significativa. En la Figura 21 se puede apreciar el gráfico de Pareto de los efectos de las variables dinámicas y su interacción.



**Figura 21.** Gráfico de Pareto para las variables dinámicas.

Como el objetivo es la determinación analítica de los tres aniones de interés con el mismo sistema de tuberías y válvulas, la elección de la longitud del bucle de reacción estuvo limitada por la más larga de las tres que se optimizaron. Se eligió así una longitud de 400 cm del bucle de reacción (rango de longitudes de 100 cm a 400 cm) y un caudal de  $15 \text{ ml min}^{-1}$  (rango de caudales estudiados de  $8 \text{ ml min}^{-1}$  a  $15 \text{ ml min}^{-1}$ ) para la determinación de los aniones antes mencionados.

Para la determinación de sulfato se incluyó el caudal dentro de la etapa de determinación de valores óptimos, debido a que se requería un ciclo de lavado dentro del método provocado por la adhesión de precipitado en el bucle de reacción, y con ello se dificultaba el estudio del efecto de la longitud del mismo. Por lo anterior, se decidió adicionar goma arábica, que actúa

como coloide protector, manteniendo en suspensión el precipitado y así evitar que éste se acumulara en las tuberías, obteniendo una mejor señal analítica.

#### *Determinación de valores óptimos*

Con las variables que más influyen sobre la señal analítica ya establecidas en la etapa anterior, se buscaron los valores óptimos de las mismas para obtener la señal máxima de absorbancia en el detector tratando de obtener una alta frecuencia de inyección. La metodología de superficie de respuesta fue implementada para el fin antes mencionado, y se utilizó el diseño experimental *Box-Behnken (Face Centered Design)*. Se realizaron 53 corridas experimentales totales obtenidas con el programa computacional Minitab 15.

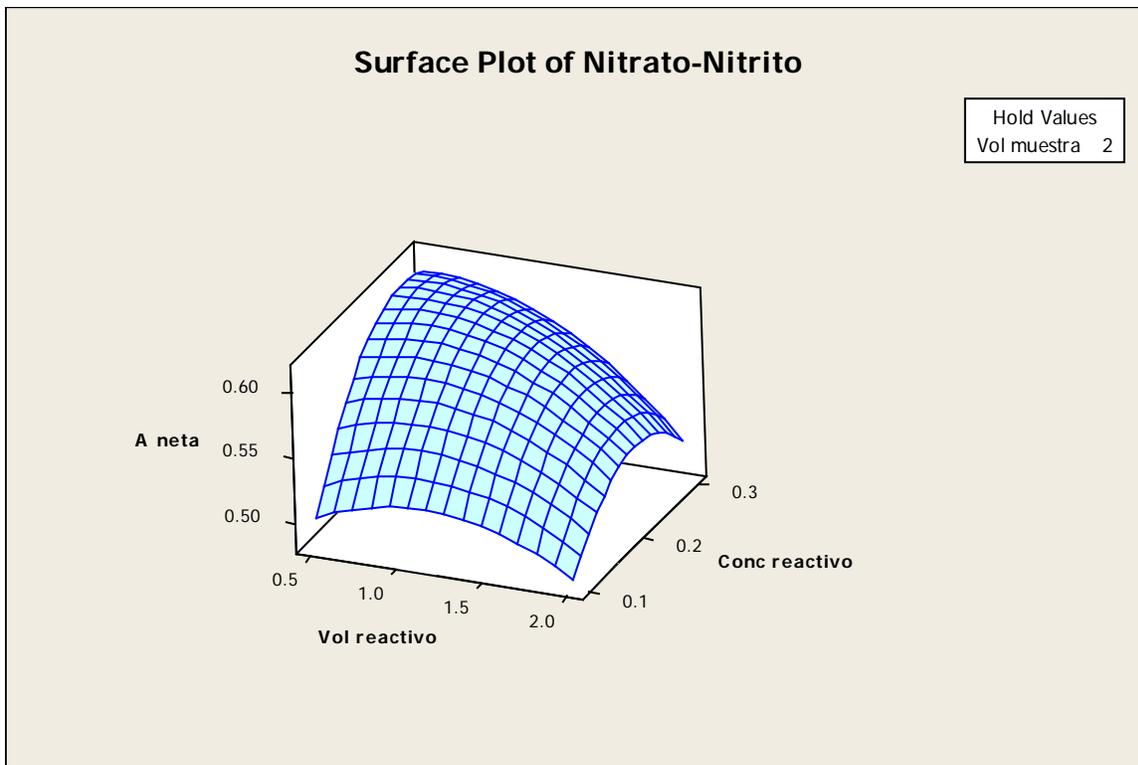
**Tabla 3.** Valores usados en el diseño experimental para la optimización del sistema.

<b>Variable</b>	<b>Nitrito-Nitrato</b>	<b>Sulfato</b>
Volumen de muestra (ml)	0.5 - 2	0.16 – 1
Volumen de reactivo (ml)	0.5 - 2	0.08 - 0.5
Concentración de reactivo	0.1 - 0.3 <sup>a</sup>	2 – 6 <sup>b</sup>
Volumen de buffer (ml)	0.08	0.032 - 0.2
Longitud bucle de reacción (cm)	100 - 400	400
Caudal (ml min <sup>-1</sup> )	8 - 15	2 - 15

<sup>a</sup> mol L<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> %

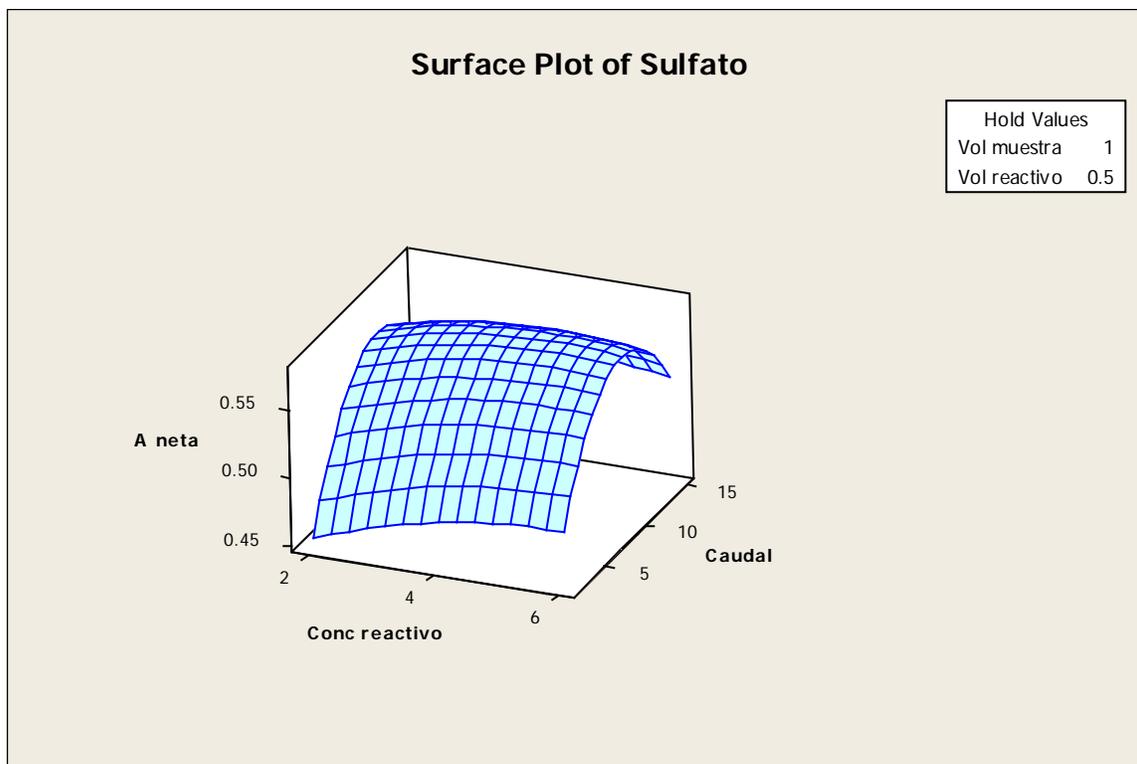
La Tabla 3 muestra las variables químicas y dinámicas estudiadas así como los rangos de valores. Se probaron los diferentes valores máximos, mínimos y puntos centrales correspondientes a cada análisis experimental.

En la Figura 22 se puede apreciar el efecto de las variables sobre la señal analítica, resultado de las corridas experimentales realizadas para determinar los valores óptimos de las variables para la metodología de nitrato y nitrito. Se observó que la máxima señal analítica se podría obtener con el volumen de reactivo mínimo y su concentración cercana al valor máximo, manteniendo el volumen de muestra constante en 2 ml.



**Figura 22.** Gráfico de superficie de respuesta para nitrato y nitrito.

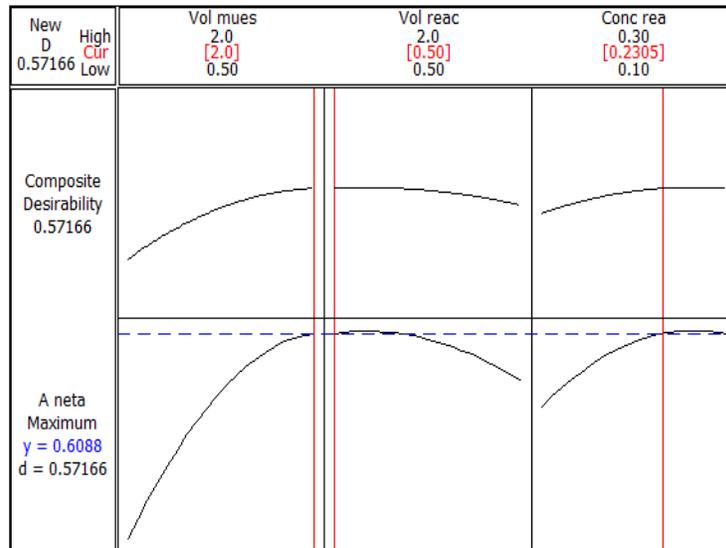
También para la metodología de sulfato se realizaron las corridas experimentales para determinar los valores óptimos. Se mantuvieron constantes los volúmenes de muestra y reactivo en 1 y 0.5 ml, respectivamente, y se estudió el efecto de las variables sobre la señal analítica (Figura 23). Los resultados obtenidos mostraron que la máxima señal analítica se obtuvo a un caudal cercano al valor medio del rango ensayado, al igual que la concentración de reactivo.



**Figura 23.** Gráfico de superficie de respuesta para sulfato.

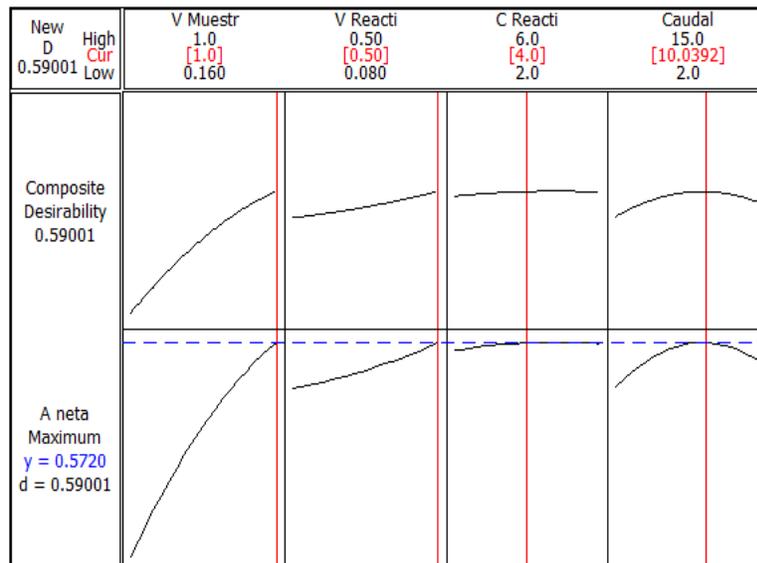
La obtención de los valores óptimos de las variables químicas y dinámicas para la determinación de los tres parámetros, se realizó con la ayuda de la herramienta Optimizador de respuesta (*Response Optimizer*) del programa computacional Minitab 15. Esta herramienta permite la visualización de los valores óptimos de las variables introducidas en el diseño experimental mediante representaciones gráficas. En ellas se pueden realizar simulaciones para observar la máxima señal analítica con diferentes valores de las variables involucradas en la optimización del sistema.

En la Figura 24 se puede apreciar el gráfico obtenido con esta herramienta para la optimización de las variables químicas del método de determinación de nitrato y nitrito. Los valores entre paréntesis (2 ml de volumen de muestra, 0.5 ml de volumen de reactivo y 0.23 mol L<sup>-1</sup>) son los correspondientes a los valores óptimos necesarios para alcanzar una absorbancia máxima neta obtenida en los ensayos realizados.



**Figura 24.** Gráfico de la optimización de nitrato y nitrito.

En la Figura 25 se muestra la optimización de las variables químicas y dinámicas para la determinación de sulfato. Los valores entre paréntesis (1 ml de volumen de muestra, 0.5 ml de volumen de reactivo y 10 ml min<sup>-1</sup> de caudal) son los correspondientes a los valores óptimos necesarios para alcanzar una absorbancia máxima neta obtenida en los ensayos realizados.



**Figura 25.** Gráfico de la optimización de sulfato.

En la Figura 26 se muestra una imagen del sistema SIA propuesto ya optimizado para la determinación secuencial de nitrato, nitrito y sulfato.



**Figura 26.** Sistema SIA implementado para la determinación secuencial de nitrato, nitrito y sulfato.

A modo de resumen, la Tabla 4 muestra las variables estudiadas, así como los valores óptimos para cada una de ellas. A partir de aquí, estos valores óptimos fueron utilizados en los subsiguientes ensayos.

**Tabla 4.** Valores óptimos obtenidos con el diseño experimental.

<b>Variable</b>	<b>Valor óptimo</b>
Bucle de carga	200 cm (d.i. 1.5 mm)
Bucle de reacción	400 cm (d.i. 0.8 mm)
Portador	H <sub>2</sub> O
<b>Para NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	
Volumen de muestra	2 ml
Volumen de Buffer A	0.08 ml
Volumen de reactivo cromogénico	0.5 ml
Concentración del reactivo cromogénico	0.23 mol L <sup>-1</sup>
Caudal de muestra y reactivos	15 ml min <sup>-1</sup>
<b>Para SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	
Volumen de muestra	1 ml
Volumen de BaCl <sub>2</sub>	0.5 ml
Volumen de Buffer B	0.2 ml
Concentración de BaCl <sub>2</sub>	4 % (w/v)
Caudal de muestra y reactivos	10 ml min <sup>-1</sup>

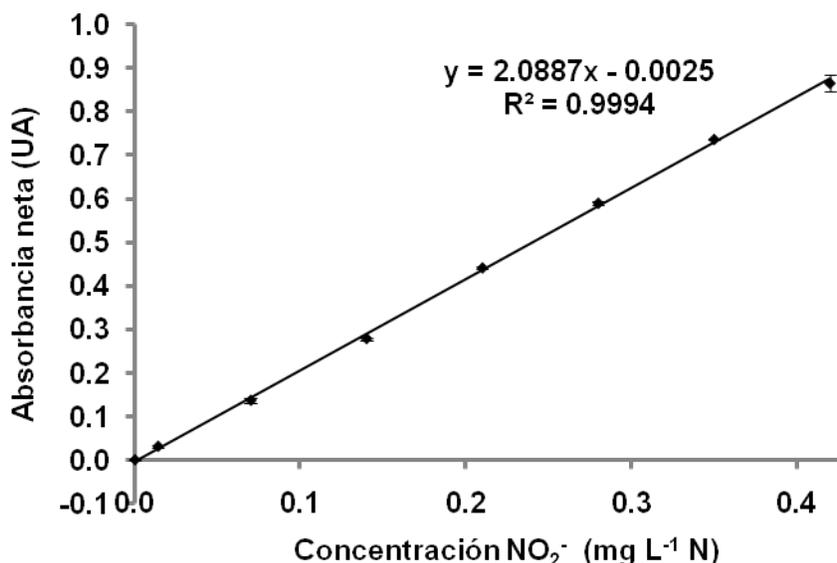
### 3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO OPTIMIZADO

Para el estudio de los parámetros analíticos del método se utilizaron los valores óptimos de las variables estudiadas en la etapa anterior. Se llevaron a cabo curvas de calibración para cada una de las especies de interés. La Figura 27 muestra la curva de calibrado para el nitrito, con un rango lineal de trabajo de 0.014 a 0.42 mg N L<sup>-1</sup>. La curva de calibrado del nitrato se presenta en la Figura 28, donde el rango lineal de trabajo es de 0.14 a 1.82 mg N

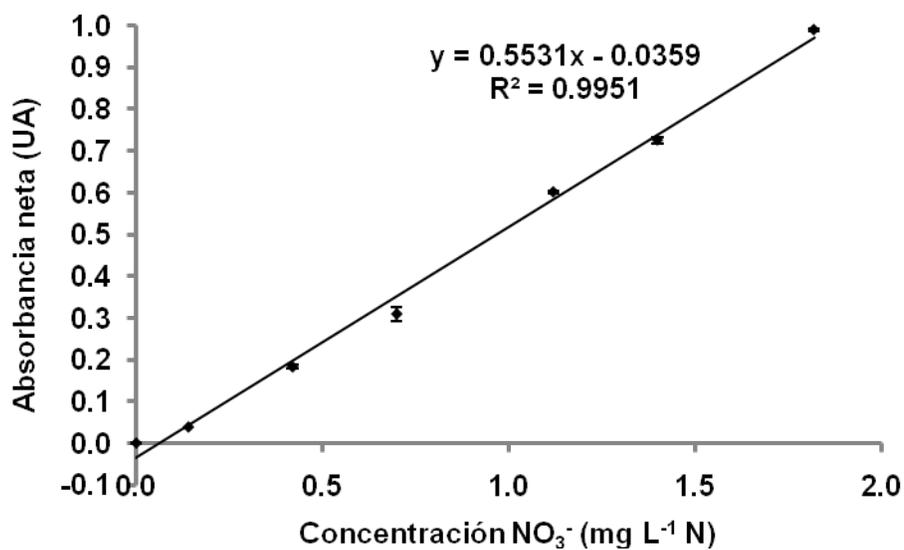
L<sup>-1</sup>. La Figura 29 muestra la curva de calibrado del sulfato, cuyo rango de trabajo lineal es de 75 a 300 mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>.

Los intervalos de trabajo lineal se hallan en órdenes de magnitud que concuerdan con los establecidos como referencia en los métodos estándar (Eaton, 1998), así como por debajo de los límites máximos permisibles establecidos en las regulaciones mexicanas e internacionales existentes. Los límites de detección fueron calculados como 3 veces la desviación estándar de sus respectivos blancos (n=10) sobre la pendiente de las curvas de calibrado. La repetibilidad se obtuvo de 10 medidas consecutivas e independientes (de tres inyecciones cada una) de las concentraciones de 0.28 mg L<sup>-1</sup> N para nitrito, 1.4 mg L<sup>-1</sup> N para nitrato y 200 mg L<sup>-1</sup> SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> para sulfato, obteniéndose desvíos estándar relativos o RSD de 0.46% para nitrito, 1.96% para nitrato y 1.34% para sulfato. La reproducibilidad del método automatizado fue verificada a partir de curvas de calibrado construidas en cinco días diferentes de trabajo con disoluciones frescas preparadas de las disoluciones patrón de nitrito, nitrato y sulfato, respectivamente (n=5). Así, los coeficientes de variación fueron del 3.39% para nitrito, 4.76% para nitrato y 2.13% para sulfato.

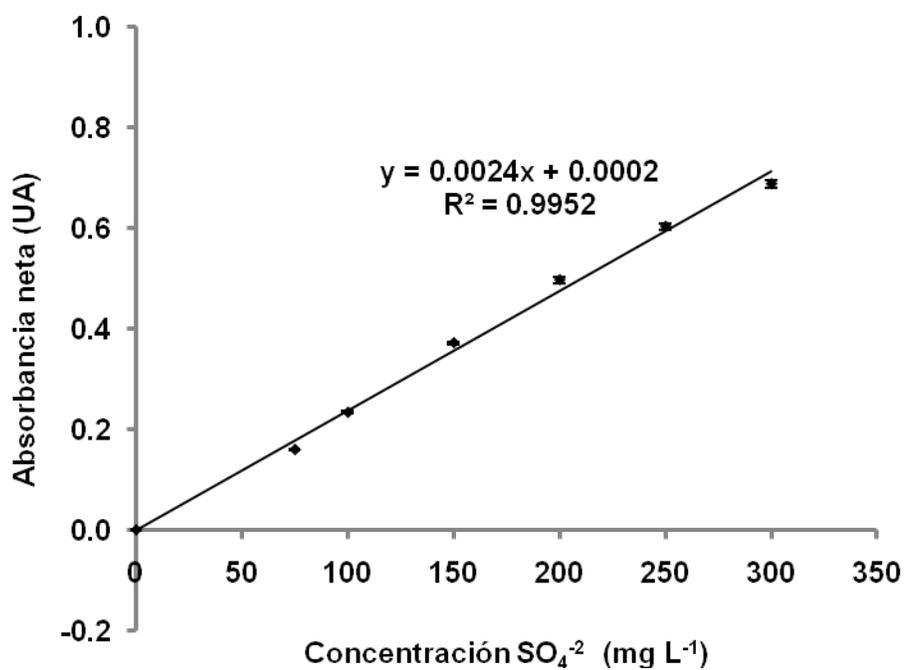
Estos resultados, junto con la alta frecuencia de análisis y la estabilidad de la línea de base, revelan la adecuación del sistema diseñado para ser implementado en estaciones de monitoreo.



**Figura 27.** Curva de calibración para nitrito.



**Figura 28.** Curva de calibración para nitrato.



**Figura 29.** Curva de calibración para sulfato.

La Tabla 5 resume los parámetros analíticos del método propuesto.

**Tabla 5.** Características analíticas del método SIA para determinación de nitrato, nitrito y sulfato.

Parámetro	Nitrato	Nitrito	Sulfato
Límite de detección	0.0207 <sup>b</sup>	0.0022 <sup>b</sup>	3 <sup>a</sup>
Límite de cuantificación	0.0692 <sup>b</sup>	0.0073 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup>
Sensibilidad	0.5531 <sup>d</sup>	2.0887 <sup>d</sup>	0.0024 <sup>c</sup>
R <sup>2</sup>	0.9951 (n=7)	0.9994 (n=8)	0.9952 (n=7)
Rango lineal	0.14-1.82 <sup>b</sup>	0.014-0.42 <sup>b</sup>	75-300 <sup>a</sup>
Repetibilidad <sup>e</sup>	1.96 (n=10)	0.46 (n=10)	1.34 (n=10)
Reproducibilidad <sup>e</sup>	4.76 (n=5)	3.39 (n=5)	2.13 (n=5)
Frecuencia de inyección <sup>f</sup>	12	15	12

<sup>a</sup> mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> mg N L<sup>-1</sup>, <sup>c</sup> UA / mg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> L<sup>-1</sup>, <sup>d</sup> UA / mg N L<sup>-1</sup>, <sup>e</sup> %, <sup>f</sup> h<sup>-1</sup>

#### 4. EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS

Las especies evaluadas como posibles interferentes en la determinación de nitrito, nitrato y sulfato bajo condiciones dinámicas son aquellas que se encuentran comúnmente en aguas potables y en aguas residuales.

Una especie fue considerada interferente cuando su concentración afectó más del 10% las lecturas de absorbancia. Para el método de nitrito-nitrato, se evaluó el efecto interferente del ion fosfato que provoca la desactivación de la columna de cadmio cuperizado obligando a un proceso de regeneración de la misma con una solución de CuSO<sub>4</sub> (Cerdà *et al.*, 1998). Se encontró que debido al alto caudal de inyección, el tiempo de contacto entre la columna y el fosfato es corto y la acción interferente del fosfato no es significativa. Se realizaron ensayos con una disolución de 1.4 mg L<sup>-1</sup> N proveniente de nitrato, y hasta una concentración de 300 mg L<sup>-1</sup> PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. No se encontró un efecto mayor al 10% en las lecturas de absorbancia. Una metodología similar propuesta con una disolución de 3.1 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, mostró que la máxima concentración tolerada fue de 1 mg L<sup>-1</sup> de fosfato (Cerdà *et al.*, 1998).

Para la determinación de sulfato, se estudiaron los iones metálicos Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> y K<sup>+</sup>, que son capaces de formar sales insolubles, y que pueden causar posibles interferencias en las muestras analizadas (van Staden *et al.*, 1996). Se realizaron ensayos con un estándar de 200 mg L<sup>-1</sup> SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Se encontró que a partir de 500 mg L<sup>-1</sup> de Ca<sup>+2</sup> y 40 mg L<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup> se

presentaron efectos mayores al 10% en las lecturas de absorbancia, mientras que hasta una concentración de 800 mg L<sup>-1</sup> de Mg<sup>+2</sup> no presentó efecto interferente en la señal analítica.

## 5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación del método automático multiparamétrico se llevó a cabo mediante la determinación de las especies en estudio en un material de referencia certificado (CRM) de agua de río (*ION-96.3 River water – Major ions and nutrients, LGC Standards, Canadá*).

Se analizaron tres réplicas de la muestra mediante el método SIA propuesto. Los ensayos de recuperación de la muestra analizada mostraron resultados dentro del rango de aceptación de la prueba de  $\pm 10\%$  de concentración de las especies de interés con respecto a la concentración presente en el material de referencia analítico, indicando que no ocurren pérdidas significativas de los mismos durante el análisis. Los resultados del ensayo de recuperación del material de referencia analítico analizado se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Resultados del análisis del material de referencia certificado ION-96.3 a través del método SIA propuesto.

Anión	CRM <i>River water</i> <i>ION-96.3</i>	SIA	Recuperación (%)
Nitrito+Nitrato (mg N L <sup>-1</sup> )	4.30 ± 0.35	4.45 ± 0.04	103
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )	110.00± 8.50	112.60 ± 1.31	102

Los resultados obtenidos a través del sistema SIA desarrollado y aquellos suministrados por el laboratorio de origen del material de referencia analítico, también fueron evaluados mediante una prueba de t al 95% y no se encontraron diferencias significativas en la comparación de los resultados obtenidos.

## 6. APLICACIÓN A MUESTRAS

Con la finalidad de evaluar la utilidad del método implementado, se realizó la determinación de las especies bajo estudio en distintos tipos de agua: embotellada, de pozo y residual.

Se analizaron tres réplicas de las muestras mediante el método SIA propuesto y por los métodos estándar (*Standard Methods*; Eaton, 1998). Los ensayos de recuperación de la concentración conocida de un estándar adicionado a las muestras analizadas mostraron resultados dentro del rango de aceptación de la prueba de  $\pm 10\%$  de concentración de las especies de interés con respecto a la concentración adicionada del estándar en cada una de las pruebas.

Los resultados obtenidos muestran que para nitrito las recuperaciones están dentro del rango del 94 al 109%, para nitrato de 93 a 103% y para sulfato de 92 a 109%, indicando que no existen diferencias significativas de las especies de interés durante el análisis.

En los ensayos de recuperación de sulfato se presentaron interferencias de matriz en las muestras de agua residual. Se llevó a cabo la adición de una solución de EDTA. Se encontró que con una concentración de  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , se lograron enmascarar las interferencias de matriz.

Los resultados obtenidos a través del sistema SIA desarrollado y aquellos obtenidos con el método manual estandarizado (*Standard Methods*; Eaton, 1998), fueron evaluados mediante una prueba de t al 95% y no se encontraron diferencias significativas en la comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos. Las muestras de agua residual, colectadas en la planta de tratamiento norte de la ciudad de Chihuahua, tienen una conductividad eléctrica (expresada en  $\mu\text{s cm}^{-1}$ ) de 1285 y 1453 en la entrada y salida de la planta respectivamente. En cuanto al pH, 7.9 en la muestra de entrada y 7.5 en la de salida. Los resultados del ensayo de recuperación del conjunto de muestras analizadas, se presentan en las Tablas 7, 8 y 9.

**Tabla 7.** Resultados analíticos y de la prueba de recuperación obtenidos para **nitrito** con las metodologías SIA y estándar (*Standard Methods*; Eaton, 1998).

Muestra	Adición (mg N L <sup>-1</sup> )	SIA		Método Estándar	
		Nitrito (mg N L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Nitrito (mg N L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Agua de pozo	0	N.D.		N.D.	
	0.2	0.196 ± 0.004	94	0.205 ± 0.004	104
Agua embotellada	0	0.015 ± 0.003		N.D.	
	0.2	0.205 ± 0.003	95	0.208 ± 0.002	105
Agua residual entrada*	0	N.D.		N.D.	
	0.2	0.198 ± 0.004	97	0.203 ± 0.002	102
Agua residual salida*	0	0.031 ± 0.005		N.D.	
	0.2	0.227 ± 0.005	98	0.215 ± 0.006	109

Los resultados están expresados como el promedio de tres replicas ± la desviación estándar.

N.D.: No detectable.

La muestra fue diluida con agua 1:1 (\*) antes del análisis.

**Tabla 8.** Resultados analíticos y de la prueba de recuperación obtenidos para **nitrito** con las metodologías SIA y estándar (*Standard Methods*; Eaton, 1998).

Muestra	Adición (mg N L <sup>-1</sup> )	SIA		Método Estándar	
		Nitrato (mg N L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Nitrato (mg N L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Agua de pozo*	0	0.996 ± 0.042		0.953 ± 0.012	
	1	1.921 ± 0.042	93	1.911 ± 0.012	96
Agua embotellada	0	0.563 ± 0.017		0.574 ± 0.012	
	1	1.526 ± 0.017	96	1.519 ± 0.012	95
Agua residual entrada <sup>+</sup>	0	0.730 ± 0.033		0.635 ± 0.013	
	1	1.676 ± 0.033	95	1.661 ± 0.013	103
Agua residual salida <sup>+</sup>	0	0.857 ± 0.063		0.803 ± 0.013	
	1	1.829 ± 0.063	97	1.820 ± 0.013	102

Los resultados están expresados como el promedio de tres réplicas ± la desviación estándar.

Las muestras fueron diluidas 1:10(\*) y 1:25 (†) antes del análisis.

**Tabla 9.** Resultados analíticos y de la prueba de recuperación obtenidos para **sulfato** con las metodologías SIA y estándar (*Standard Methods*; Eaton, 1998).

Muestra	Adición (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L <sup>-1</sup> )	SIA		Método Estándar	
		Sulfato (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Sulfato (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Agua de pozo	0	80.30 ± 2.92		63.58 ± 1.07	
	80	153.52 ± 2.92	92	150.46 ± 1.07	109
Agua embotellada	0	32.59 ± 3.18		25.08 ± 0.84	
	80	113.05 ± 3.18	101	110.30 ± 0.84	107
Agua residual entrada*	0	28.85 ± 0.54		30.48 ± 0.45	
	80	106.37 ± 0.54	97	106.62 ± 0.45	95
Agua residual salida*	0	47.39 ± 4.87		43.58 ± 0.28	
	80	132.93 ± 4.87	107	130.34 ± 0.28	108

Los resultados están expresados como el promedio de tres réplicas ± la desviación estándar. La muestra fue diluida con agua 1:3 (\*) antes del análisis.

## 7. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO CON LAS DE LOS MÉTODOS ESTÁNDAR

En esta sección, el sistema SIA propuesto es comparado con las técnicas estándar descritas en la literatura (*Standard Methods*; Eaton, 1998), como lo son: el método colorimétrico para la determinación directa de nitrito, el método de reducción de cadmio para determinación de nitrato, y el método turbidimétrico para la determinación de sulfato. Las características analíticas relevantes de cada método están resumidas en la Tabla 10.

Como puede verse, los límites de detección del método SIA para la determinación de nitrito y nitrato se encuentran por debajo de los establecidos como referencia en los métodos estándar, mientras que para la determinación de sulfato se sitúa ligeramente por encima de la referencia, pero la diferencia de magnitudes es tan pequeña, si se compara con respecto a los límites máximos permisibles de la legislación (establecida en la NOM-127-SSA1-1994), que se puede aceptar el método propuesto como equiparable al método estándar para realizar las determinaciones de las tres especies de interés.

La frecuencia de análisis es sustancialmente mejorada debido al carácter automatizado y multiparamétrico del método propuesto que permite la realización del procedimiento sin la necesidad de cambiar el sistema de válvulas y tuberías, por lo cual operaciones de los métodos estándar como el acondicionamiento constante de la columna de cadmio o el lapso de tiempo de espera para la lectura de la absorbancia no son necesarios.

Los volúmenes de muestra y reactivos son drásticamente reducidos con relación al método estándar. Es importante destacar que, a diferencia de los métodos FIA, en el método propuesto la cantidad de muestra y reactivos es inyectada sólo al momento de llevar a cabo la determinación analítica. La inyección de zonas bien definidas de muestra y reactivos mediante la activación de la válvula solenoide y válvula de selección, garantizan un mínimo consumo de los mismos, hasta 100 veces menor que con los métodos estándar, y por consiguiente una menor generación de residuos.

La configuración sencilla y el detector espectrofotométrico utilizado son también características que merecen ser destacadas, por su potencial aplicación en mediciones en campo ó *in situ*.

**Tabla 10.** Comparación de las características analíticas entre ambas metodologías.

Variable		SIA	Método Estándar*
Límites de detección	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg N L <sup>-1</sup> )	0.0022	0.18
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg N L <sup>-1</sup> )	0.0207	0.1
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	3	1
Frecuencia de análisis (h <sup>-1</sup> )		12 – 15	5 – 7
Volumen de muestra (ml)		1 - 2	25 – 100
Volumen de reactivos (ml)		0.5 - 0.7	2 – 75

\* *Standard Methods*; Eaton, 1998

## VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se han demostrado las cualidades de la técnica de análisis por inyección en flujo secuencial para el monitoreo automatizado y multiparamétrico de nitrito, nitrato y sulfato en aguas. El método SIA ofrece la ventaja de un bajo consumo de muestra y reactivos debido a que se utilizan volúmenes pequeños y sólo al momento de llevar a cabo la determinación analítica. Esto hace que el sistema propuesto presente por consiguiente una generación menor de residuos que los métodos estándar. Se ha desarrollado un sistema robusto y fiable para la determinación de las tres especies de interés a través de un solo procedimiento analítico. Las características del sistema han sido evaluadas mediante la validación con material analítico de referencia, la aplicación de la prueba de recuperación de adición de concentración de estándar y las mediciones de la repetibilidad y reproducibilidad, mostrando que el método tiene una buena precisión.

La técnica ofrece una alta frecuencia de análisis comparada con los métodos estándar, permitiendo obtener resultados fiables más rápidamente que con los métodos de determinación tradicionales. Cabe mencionar también que la condición de ser un sistema cerrado evita la contaminación externa de las muestras.

El método propuesto ofrece el potencial de implementar pre-tratamientos en línea, como foto-oxidaciones, digestiones y pre-concentraciones, entre otras, extendiendo su aplicación a diferentes matrices de agua o a otro tipo de muestras ambientales.

La flexibilidad del sistema SIA permite además aumentar el número de parámetros a analizar usando la misma configuración, ya que sólo se requeriría una válvula de selección con más puertos laterales.

La configuración sencilla del sistema y su portabilidad, hacen que pueda ser usado *in situ* como monitor para determinaciones de nitrito, nitrato y sulfato en ciertos campos donde sea requerido el análisis continuo, como en plantas de tratamiento de agua residual, plantas potabilizadoras o procesos industriales, entre muchos otros.

Otra característica que presenta el sistema propuesto es la seguridad que brinda al analista, ya que no requiere la manipulación directa de muestras y reactivos evitando el contacto con sustancias que potencialmente representen una amenaza a la integridad y a la salud.

Por otra parte, la metodología SIA implementada es una técnica amigable con el medio ambiente, ya que al utilizar pequeñas cantidades de muestra y reactivos, los residuos generados son mínimos.

## REFERENCIAS

1. Akyüz, M., and Ata, S. (2009). Determination of low level nitrite and nitrate in biological, food and environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*, 79: 900-904.
2. Aslan, S., (2005). Combined removal of pesticides and nitrates in drinking water using biodenitrification and sand filter system. *Process Biochemistry*, 40: 417-424.
3. Baeda, M., Amine, A., Palleschi, G., Moscone, D., Volpe, G., and Curulli, A. (2001). New electrochemical sensors for detection of nitrites and nitrates. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 509: 66-72.
4. Baeza, M., Bartroli, J., and Alonso, J. (2005). Autoadaptive sequential injection system for nitrite determination in wastewaters. *Talanta*, 68: 245-252.
5. Burakham, R., Higuchi, K., Oshima, M., Grudpan, K., and Motomizu, S. (2004). Flow injection spectrophotometry coupled with a crushed barium sulfate reactor column for the determination of sulfate ion in water samples. *Talanta*, 64: 1147–1150.
6. Burakham, R., Oshima, M., Grudpan, K., and Motomizu, S. (2004). Simple flow-injection system for the simultaneous determination of nitrite and nitrate in water samples. *Talanta*, 64: 1259–1265.
7. Cabrera, E., Hernández, L., Gómez, H., and Cañizares M. (2003). Determinación de nitratos y nitritos en agua. Comparación de costos entre un método de flujo continuo y un método estándar. *Journal of the mexican chemical society*, Vol. 47: 88-92.
8. Cerdà, V. (2006). Introducción a los métodos de análisis en flujo. Primera edición. *Sciware*, S.L. Palma de Mallorca, España.
9. Cerdà, A., Oms, M.T., Forteza, R., and Cerdà, V. (1998). Sequential injection sandwich technique for the simultaneous determination of nitrate and nitrite. *Analytica Chimica Acta*, 371: 63-71.

10. Cerdà, V., and Pons, C. (2006). Multicommutated flow techniques for developing analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, No. 3: 236-242.
11. Connolly, D., and Paull, B. (2001). Rapid determination of nitrate and nitrite in drinking water samples using ion-interaction liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 441: 53–62.
12. De Zuane, John (1997). Handbook of drinking water quality. Second Edition. *Van Nostrand Reinhold*. USA
13. Dedkov, Y. M., Korsakova, N. V., and Sychkova, V. A. (2006). New metallochromic indicator for barium: determination of sulfate in water and soil extracts. *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 61, No. 12: 1154–1162.
14. Eaton, A.D., Clescheri, L.S., and Greenberg, A.E. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Ed.: 20<sup>th</sup>. American Public Health Association, Washington.
15. Ensafi, A. A., and Kazemzadeh A. (1999). Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. *Analytica Quimica Acta*, 382; 15-21.
16. Ensafi, A. A., Rezaei, B., and Nouroozi, S. (2004). Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow injection analysis. *Analytical Sciences*, Vol. 20.
17. European Union (EU 2009), *Council Directive 98/83/EC* (OJ L 330, 5.12.1998, p. 32). Amended by: Regulation (EC) No 596/2009 (OJ L 188, 18.7.2009, p. 14).
18. Ferrer, L. (2007). Tesis doctoral: “*Desarrollo de métodos automáticos de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para la determinación del ion sulfuro en aguas*”. Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares. Palma de Mallorca, España.

19. Fortes, P. R., Feres, M. A., and Zagatto, E.A.G. (2008). An expert flow system involving in-line prior assay for turbidimetric determination of chloride and sulphate in natural waters. *Talanta*, 77: 571–575.
20. Fung, Y.S., Wong, C.C.W., Choy, J.T.S., and Sze, K.L. (2008). Determination of sulphate in water by flow-injection analysis with electrode-separated piezoelectric quartz crystal sensor. *Sensors and Actuators B*, 130: 551–560.
21. Gabriel, D., Baeza, J., Valero, F., and Lafuente, J. (1998). A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on N/D criteria. *Analytica Chimica Acta*, 359: 173-183.
22. Haghghi, B., and Tavassoli A. (2002). Flow injection analysis of nitrite by gas phase molecular absorption UV spectrophotometry. *Talanta*, 56: 137–144.
23. Haghghi, B., and Kurd, S. F. (2004). Sequential flow injection analysis of ammonium and nitrate using gas phase molecular absorption spectrometry. *Talanta*, 64: 688–694.
24. Hassan, S. S. M., Sayour, H. E. M., and Al-Mehrezi, S. S. (2007). A novel planar miniaturized potentiometric sensor for flow injection analysis of nitrates in wastewaters, fertilizers and pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*, 581: 13–18.
25. Hsu, J., Arcot, J., and Lee, N. A. (2009). Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chemistry*, 115: 334–339.
26. Kanda, Y., and Taira, M. (2003). Flow-injection analysis method for the determination of nitrite and nitrate in natural water samples using a chemiluminescence NO<sub>x</sub> monitor. *Analytical Sciences*, Vol. 19.
27. Kazemzadeh, A., and Ensafi, A. A. (2001). Sequential flow injection spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in various samples. *Analytica Chimica Acta*, 581: 319–326.

28. Kazemzadeh, A., and Ensafi, A. A. (2001). Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow-injection spectrophotometric detection. *Microchemical Journal*, 69: 159-166.
29. Legnerova, Z., Solich, P., Sklenarova, H., Satinsky, D., and Karlicek, R. (2002). Automated simultaneous monitoring of nitrate and nitrite in surface water by sequential injection analysis. *Water Research*, 36: 2777–2783.
30. Li, M., Feng, C., Zhang, Z., Lei, X., Chen, R., Yang, Y., and Sugiura, N. (2009). Simultaneous reduction of nitrate and oxidation of by-products using electrochemical method. *Journal of Hazardous Materials*, 171: 724–730.
31. Liawruangrath, S., and Phakthong, W. (2006). Determination of sulphate in beverages by spectrophotometric flow injection analysis. *J. Flow Injection Anal., Vol. 23, No. 2 (206)*: 107–111.
32. Manahan, S. E. (1994). Environmental chemistry. 6<sup>th</sup> Edition. *Lewis Publishers*. USA.
33. Melchert, W. R., and Rocha, F. R. P. (2008). An improved procedure for flow-based turbidimetric sulphate determination based on a liquid core waveguide and pulsed flows. *Analytica Chimica Acta*, 616: 56–62.
34. Meneses, S. R. P., Maniasso, N., and Zagatto, E. A. G. (2005). Spectrophotometric flow-injection determination of sulphate in soil solutions. *Talanta*, 65: 1313–1317.
35. Mesquita, R. B. R., Ferreira, M. T. S. O. B., Segundo, R. L. A., Teixeira, C. F. C. P., Bordalo, A. A., Rangel, A. O. S. S. (2009). Development of a sequential injection system for the determination of nitrite and nitrate in waters with different salinity: Application to estuaries in NW Portugal. *Analytical Methods*, 1: 195–202.
36. Mikuska, P., and Vecera, Z. (2003). Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water by chemiluminescent flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 495: 225–232.

37. Miranda Prada, S., Guekezian, M., and Suárez-Iha, M. E. V. (1996). Alternative indirect method for sulfate determination in natural samples. *Analytica Chimica Acta*, 329: 197–202.
38. Miró, M., Frenzel, W., Cerdà, V., and Estela, J. M. (2001). Determination of ultratracés of nitrite by solid-phase preconcentration using a novel flow-through spectrophotometric optrode. *Analytica Chimica Acta*, 437: 55–65.
39. Monser, L., Sadok, S., Greenway, G.M., Shah, I., and Uglow, R.F. (2002). A simple simultaneous flow injection method based on phosphomolybdenum chemistry for nitrate and nitrite determinations in water and fish samples. *Talanta*, 57: 511–518.
40. Noroozifar, M., Motlagh, M. K., Taheri, A., and Homayoonfard, M. (2007). Application of manganese(IV) dioxide microcolumn for determination and speciation of nitrite and nitrate using a flow injection analysis–flame atomic absorption spectrometry system. *Talanta*, 71: 359–364.
41. Pons, C., Santos, J. L. M., Lima, J. L. F. C., Forteza, R., and Cerda, V. (2008). Multi-pumping flow system for the determination of nitrite and nitrate in water samples. *Microchimica Acta*, 161: 73–79.
42. Reis Lima, M. J., Fernandes, S. M. V., and Rangel, A. O. S. S. (2006). Determination of nitrite and nitrate in dairy samples by sequential injection using an in-line cadmium-reducing column. *International Dairy Journal*, 16: 1442–1447.
43. Santelli, R. E., Lopes, P. R. S., Santelli, R. C. L., and Wagener, A. D. L. R. (1995). Turbidimetric determination of sulphate in waters employing flow injection and lead sulphate formation. *Analytica Chimica Acta*, 300: 149-153.
44. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT 2009). *Informe de la situación del medio ambiente en México. Edición 2008. Compendio de estadísticas ambientales*. México.

45. Secretaria de Salud (SSA 2000). *Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a los que debe someterse el agua para su potabilización.*
46. Silva, L. A., Korn, M., and de Andrade, J. B. (2007). Influence of ultrasonic waves in the reduction of nitrate to nitrite by hydrazine-Cu(II). *Ultrasonics Sonochemistry*, 14: 275-280.
47. Somnam, S., Jakmunee, J., Grudpan, K., Lenghor, N., and Motomizu, S. (2008). Determination of nitrite and nitrate in water samples by automated hydrodynamic sequential injection method. *Analytical Sciences*, Vol. 24.
48. Tsoulfanidis, I. A., Tsogas, G. Z., Giokas, D. L., and Vlessidis, A. G. (2008). Design of a field flow system for the on-line spectrophotometric determination of phosphate, nitrite and nitrate in natural water and wastewater. *Microchimica Acta*, 160: 461–469.
49. Tyson, J.F., and Palmer, C.D. (2009). Simultaneous detection of selenium by atomic fluorescence and sulfur by molecular emission by flow-injection hydride generation with on-line reduction for the determination of selenate, sulfate and sulfite. *Analytical Chimica Acta*, 652: 251–258.
50. United States Environmental Protection Agency (US EPA 2009), *40 CFR Ch. I (7–1–09 Edition)*.
51. van Staden, J.F., and Taljaard, R.E. (1996). Determination of sulphate in natural waters and industrial effluents by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 331: 271-280.
52. Vieira, J. A., Reis, B. F., Kronka, E. A. M., Paim, A. P. S., Giné, M. F. (1998). Multicommutation in flow analysis. Part 6. Binary sampling for wide concentration range turbidimetric determination of sulphate in plant digests. *Analytica Chimica Acta*, 366: 251–255.

53. Vieira, J. A., Raimundo Jr., I. M., and Reis, B. F. (2001). Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems. *Analytica Chimica Acta*, 438: 75–81.
54. World Health Organization (WHO 2004), *Sulfate in drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality*.
55. World Health Organization (WHO 2007), *Nitrate and nitrite in drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality*.
56. World Health Organization (WHO 2008), *Guidelines for drinking-water quality, incorporating 1st and 2nd addenda. Vol.1. Recommendations*, 3rd Edition.
57. Yue, X. F., Zhang, Z. Q., and Yan, H. T. (2004). Flow injection catalytic spectrophotometric simultaneous determination of nitrite and nitrate. *Talanta*, 62: 97–101.
58. Zarate, N., Ruiz, M. P., Pérez-Olmos, R., Araújo, A. N., and Montenegro M. C. B. S. M. (2009). Development of a sequential injection analysis system for the potentiometric determination of nitrite in meat products by using Gran's plot method. *Microchim Acta*, 165: 117–122.
59. Zhao, Y., He, Y., Gan, W., and Yang, L. (2002). Determination of nitrite by sequential injection analysis of electrokinetic flow analysis system. *Talanta*, 56: 619–625.