



Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales

Escuela de Química

Cátedra de Química Analítica

MANUAL DE LABORATORIO DE
MÉTODOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL
QUC 407L

Versión 2024



MANUAL DE LABORATORIO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL QUC 407L

Coordinador de Cátedra
Dr. Germain Esquivel Hernández

Profesores
M.Sc. Adriana Esquivel Hernández
M.Sc. Rosa Alfaro Solís
M.Sc. Rolando Sánchez Gutiérrez

Personal técnico de apoyo

Dipl. Silvia Solano Castro
Lic. Fabio Quirós Vásquez



© 2021 by the authors. Licensee Universidad Nacional, Costa Rica. This document is an open access document distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INDICE GENERAL

I. Introducción.....	1
II. Normas generales de trabajo en el laboratorio.....	3
III. Gestión de los residuos químicos en el Laboratorio de Métodos Instrumentales de Análisis.....	5
SECCIÓN I. TRATAMIENTO DE DATOS	6
SECCIÓN II. ESPECTROSCOPIA MOLECULAR	36
SECCIÓN III. ESPECTROSCOPIA ATÓMICA.....	68
SECCIÓN IV. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	86
SECCIÓN V. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS	109
SECCIÓN VI. ANEXOS	114

La química es necesariamente una ciencia experimental: sus conclusiones se extraen de los datos y sus principios están respaldados por la evidencia de los hechos” (Michael Faraday)

I. Introducción

El Manual de Laboratorio de Métodos Instrumentales de Análisis (QUC 407L) recoge la experiencia de la Cátedra de Química Analítica a lo largo de más 30 años en la docencia del análisis instrumental. Este manual está dirigido a personas estudiantes de la carrera de Licenciatura en Química Industrial con salida lateral de Bachillerato, sin embargo, puede servir como documento de referencia para otras personas estudiantes de carreras afines (ej., Ingeniería en Bioprocesos Industriales, Ciencias Ambientales, entre otras). Este curso se ofrece una vez al año en el primer ciclo (febrero a junio) como curso presencial semanal. Las experiencias de laboratorio deben completarse con éxito a lo largo de las 16 semanas del curso. El curso se desarrolla en el segundo piso del Edificio de Nuevos Procesos Industrial, en el Laboratorio de Docencia de Química Analítica de la Escuela de Química.

Los requisitos de ingreso son la aprobación de los cursos de Química Analítica Cuantitativa (QUC 403) y Laboratorio de Química Analítica Cuantitativa (QUC 403L). En este curso, sin embargo, la persona estudiante es retada a tener un rol más protagónico en el desarrollo de las experiencias de laboratorio, tomando como base la experiencia acumulada en otros cursos experimentales, no solo de la Cátedra de Química Analítica, sino en otras áreas de la química. La persona estudiante deberá trabajar siguiendo el orden establecido en el programa del curso y los procedimientos descritos en cada una de las prácticas de laboratorio. Es obligación de cada persona estudiante conocer la teoría correspondiente, la cual se expondrá en la Instrucción de Laboratorio. Cada persona estudiante debe llevar un cuaderno o libreta de laboratorio (ej., libro de actas o cuaderno cosido de tapa dura) en el que deberá anotar las observaciones y datos de los experimentos individuales y donde deberá registrar los cálculos y resultados obtenidos para cada experiencia de laboratorio.

Para profundizar en la teoría y controlar el aprendizaje, la persona estudiante deberá realizar evaluaciones escritas sobre los aspectos teóricos vistos en la Instrucción de Laboratorio, pero deberá además sistematizar sus resultados mediante la preparación de informes de laboratorio. Todas las personas estudiantes deben traer su propia gabacha de laboratorio (de manga larga y con cierre delantero) y usar ropa y calzado adecuados. Más información al respecto se puede encontrar en el programa del curso. Un máximo de 12 personas estudiantes es supervisado por el profesor(a) de grupo de laboratorio. Todos los experimentos se llevan de forma individual. Cada persona estudiante deberá completar una pequeña evaluación inicial antes de cada experiencia de laboratorio, el cual deberá completarse antes del inicio de la sesión correspondiente. Esta evaluación se basará en preguntas

seleccionadas relacionadas con puntos clave de cada experiencia de laboratorio. La asistencia a cada una de las experiencias de laboratorio es obligatoria. El profesor del curso registrará la asistencia a cada una de las experiencias de laboratorio y evaluará el trabajo diario mediante una rúbrica. Si una persona estudiante se retrasa en más 30 minutos con respecto a la hora de inicio, esa sesión de laboratorio se registrará como una ausencia.

II. Normas generales de trabajo en el laboratorio

El desarrollo de análisis químicos implica riesgos si la persona no posee conocimiento de la naturaleza de los materiales y reactivos a utilizar y si no guarda cuidado en la manipulación de estos. La mejor precaución para minimizar cualquier accidente es cumplir ciertas normas de conducta en el laboratorio, así como tener presente las medidas de seguridad en todo momento. Entre las normas de conducta están:

- Estudie previamente el experimento a realizar para comprender los principios básicos del método y las técnicas.
- Identifique los principales peligros y las medidas de precaución a tener con cada sustancia química con la que trabajará en cada experiencia.
- Asista puntualmente a cada sesión de laboratorio.
- Los objetos personales que no son requeridos durante la práctica de laboratorio deben mantenerse en un lugar específico alejados de la mesa de trabajo.
- Utilice gabacha de manga larga, abotonada, guantes y anteojos de seguridad en todo momento dentro del laboratorio.
- Mantenga limpio y en orden la mesa de trabajo, la de las balanzas y el equipo de trabajo. La limpieza y el orden son indispensables para realizar análisis químicos satisfactorios.
- No entable conversaciones con sus compañeros de clase a menos que sea estrictamente necesario, mantenga un comportamiento serio y de estudio en todo momento durante la práctica.
- Manipule responsablemente el material de laboratorio provisto. Si eventualmente llega a dañar algún material repórtelo inmediatamente al responsable del laboratorio.
- Evite trasladar los reactivos a las mesas de trabajo. Asegúrese de mantenerlos ordenados en los espacios asignados para estos.
- No destape más de un frasco de reactivos al mismo tiempo, ya que se pueden confundir las tapas y contaminar los reactivos, además nunca coloque las tapas boca abajo para evitar derrame de líquidos contenido en esta y la contaminación de este.
- Una vez que termine de utilizar el frasco del reactivo tápelo inmediatamente.
- No introduzca ningún objeto dentro de los frascos de los reactivos, trasvase la cantidad a utilizar a recipientes de menor volumen.
- Al finalizar cada sesión limpie, ordene y acomode todo lo utilizado tal como lo encontró al inicio del laboratorio.

Medidas de seguridad

- No ingiera bebidas o alimentos dentro del laboratorio.
- Conozca la ubicación y el funcionamiento de los equipos de protección que se encuentran en el laboratorio, así como las salidas de emergencia.
- Lea cuidadosamente las etiquetas de los reactivos antes de ser utilizados y revise muy bien la concentración en la que se encuentran.
- Comunique cualquier incidente que ocurra por más leve que sea.
- No saboree, ni huela directamente cualquier reactivo químico. Si ingiere accidentalmente alguna sustancia, enjuáguese la boca inmediatamente y comuníquelo.
- Si le cae accidentalmente un reactivo en los ojos, lávese inmediatamente con abundante agua y notifíquelo al profesor o al responsable del laboratorio.
- Si algún líquido se derrama sobre su piel, lave con abundante agua el área afectada y si fuera necesario utilice una disolución saturada de bicarbonato de sodio, para ácidos y una disolución diluida de ácido acético para bases.
- Al manipular sustancias que generen gases tóxicos, que sean irritantes, venenosos o corrosivos, hágalo en una capilla de extracción.
- Utilice los reactivos racionalmente, emplee solo la cantidad necesaria. Nunca regrese el exceso al frasco original para evitar contaminación.
- Utilice siempre la pera si requiere pipetear. Nunca succione con la boca.
- Al diluir un ácido concentrado, realice la acción en una capilla de extracción de gases y añada el ácido al agua de forma lenta y con agitación continua.
- Si calienta alguna sustancia o manipula algún equipo caliente, utilice pinzas, guantes para calor o cualquier equipo apropiado para evitar quemaduras. Nunca coloque directamente sobre la mesa de trabajo los objetos calientes.
- Si calienta alguna sustancia o lleva a cabo alguna reacción en un tubo de ensayo, no dirija la boca hacia usted o hacia algún compañero, para evitar cualquier salpicadura.
- Si requiere realizar algún tipo de calentamiento, asegúrese que el material del objeto a calentar resista las temperaturas a las que será sometido.
- Si debe introducir algún objeto de vidrio dentro de un tapón de hule o de corcho, lubrique el objeto con agua enjabonada para facilitar el desplazamiento. Envuelva una parte del objeto en un paño o una toalla, de tal forma que las manos queden protegidas. Gire el objeto cuidadosamente hacia un lado y hacia otro, para introducirlo dentro del tapón o corcho, realice los movimientos de forma lenta, sin esforzar mucho el objeto, para evitar que se quiebre.

Disposición de residuos

- Al desechar residuos sólidos o líquidos colóquelos en los recipientes asignados según la clasificación de residuos. Nunca deseche reactivos en pilas o en otros lugares que no son para este fin. Si tiene dudas consulte con su profesor o el responsable del laboratorio.
- Para residuos de vidrio, coloque los mismos en los recipientes adecuados para este fin. Nunca coloque vidrios en el basurero común, ni en ningún otro lugar donde se pueda ocasionar alguna cortadura a usted mismo u otra persona.
- Disponga de cualquier residuo ordinario y/o reciclable generado durante la experiencia en los contenedores correspondientes, procurando mantener limpio y ordenado el espacio de trabajo.

III. Gestión de los residuos químicos en el Laboratorio de Métodos Instrumentales de Análisis

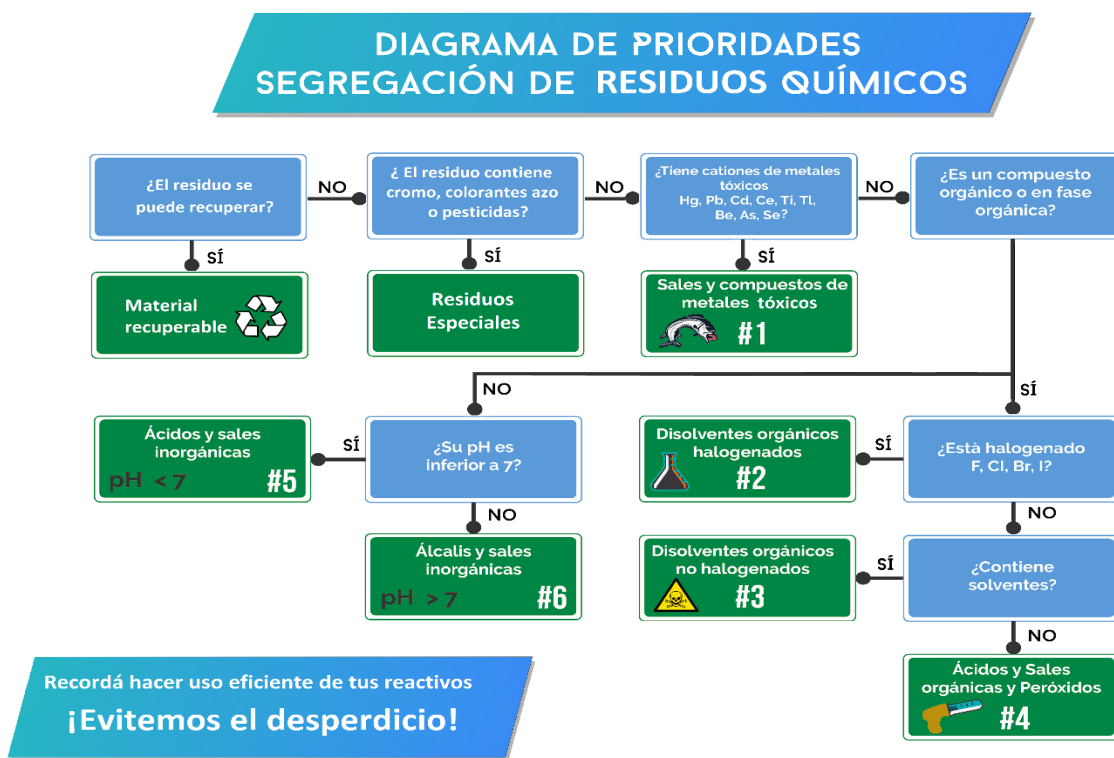


Figura 1. Diagrama de prioridades de segregación de residuos químicos.

Por favor refiérase a cada experimento para acceder a información específica sobre la gestión de los residuos generados. Se incluyen además etiquetas para los recipientes que cada persona estudiante debe utilizar para almacenar sus residuos durante cada experiencia de laboratorio-

SECCIÓN I. TRATAMIENTO DE DATOS

EXPERIMENTO 1

CALIBRACION DE EQUIPO VOLUMETRICO

1. Contenidos

- 1.1. Introducción al proceso de calibración de material volumétrico de laboratorio.
- 1.2. Estudio de los factores que afectan el proceso de calibración de material volumétrico.
- 1.3. Demostración de la influencia del grado de limpieza de los instrumentos de laboratorio en el volumen entregado por éstos.
- 1.4. Estudio de la influencia del tiempo de escurrimiento en el volumen entregado por el instrumental volumétrico.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante deberá tener un manejo adecuado de la técnica de pipeteo, y en general, del uso de material volumétrico en el laboratorio.

3. Introducción

Además de la balanza analítica, existen tres instrumentos de precisión en el material volumétrico que son imprescindibles, básicos y de uso común en las determinaciones analíticas: la pipeta, la bureta y el balón aforado. En la actualidad se produce material volumétrico en masa, por lo que el fabricante no lo puede examinar con detenimiento a excepción del material calibrado, que es vendido a un alto costo y que tiene una certificación para cada instrumento de medida. Cuando se desea hacer mediciones de alta precisión en trabajos de investigación o en procesos de acreditación por la norma ISO/IEC 17025-2005, por ejemplo, se requiere que se calibren los instrumentos. En la mayor parte del trabajo analítico de rutina no suele ser tan imperativa la necesidad de la calibración.

Además, como parte de los requisitos generales de los laboratorios de ensayo, según la norma ISO/IEC 17025-2005, se encuentran los reglamentos técnicos entre los cuales está la trazabilidad de las mediciones, las que están asociadas con la exactitud y fiabilidad de los análisis. Por lo tanto, los instrumentos de medición ligados con el quehacer analítico del ensayo a realizar, tales como pipetas, balones, buretas, espectrofotómetros, pH metros y otros más, deben ser calibrados en un laboratorio debidamente acreditado para esta labor.

La calibración de materiales volumétricos se realiza al comparar la medida de un patrón de referencia trazable con la medida del mensurando. Al calibrar los materiales volumétricos estamos aportando niveles de fiabilidad y seguridad en los procesos donde la medición resultante del uso del instrumento tenga lugar. Igualmente, al calibrar los materiales volumétricos podremos generar los registros pertinentes para poder documentar un Sistema de Gestión de la Calidad y tomar las medidas oportunas para poder asegurar la calidad de los productos y servicios.

En la calibración del material volumétrico, se utiliza equipos y patrones del área mecánica debidamente certificados y trazables al NIST. Como resultado de la calibración del material volumétrico, se emite un certificado incluyendo la información necesaria para poder reproducir la calibración y una etiqueta para adherir al material volumétrico y dejar visible su estado de calibración en todo momento.

Es importante que antes de hacer el proceso de calibración de un instrumento volumétrico, se realice un proceso apropiado de limpieza con las sustancias que en ese momento convengan. Después de haberlo realizado y para verificarlo, se debe enjuagar el material con agua desionizada. Cuando la superficie de vidrio está limpia y libre de grasa, el agua se extiende y deja una película invisible. Si el agua no la humedece uniformemente, se debe repetir el proceso de limpieza.

3.1. Tolerancias de materiales volumétricos

El NIST, National Institute of Standard and Technology, es una agencia federal que forma parte del Departamento de Comercio de los EE.UU. La misión de este Instituto consiste en elaborar y promover patrones de medición, estándares y la tecnología con el fin de mejorar la productividad, facilitar el comercio entre los países y mejorar la calidad de vida de las personas.

Algunas características presentes en un reporte de calibración de un balón aforado de 100 mL, una bureta de 50 mL calibrada a diferentes volúmenes y una pipeta aforada, se muestran en el cuadro 1:

Cuadro 1. Reporte de calibración de un balón aforado de 100 mL, una bureta de 50 mL calibrada a diferentes volúmenes y una pipeta aforada

Material volumétrico	Volumen nominal indicado, mL	Volumen obtenido de la calibración	Corrección en mL	Incertidumbre expandida
Balón aforado	100	100.046	+0.046	0.019
Bureta 50 mL	10	9.989	-0.011	.0.021
	20	19.973	-0.027	0.020
	30	29.971	-0.029	0.020
	40	39.973	-0.027	0.020
	50	49.978	-0.022	0.021
Pipeta aforada	10	9.959	-0.041	0.007

Tomado de la calibración realizada en el LACOMET, Laboratorio Costarricense de Metrología, SCM Metrología Laboratorios S.A., y del Laboratorio de Metrología PROCAME, respectivamente.

Factor de cobertura $k=2$ para un nivel de confianza de un 95%. La incertidumbre estándar se determinó conforme a la "Guide to Expression of Uncertainty in Measurement, BIPM-IEC-IFCC-ISO-IUPAC-IUPAP-OIML.

En el anexo 2 encontrará documentos con calibraciones para pipeta, balón aforado, bureta y balanza analítica, y algunos valores de densidades del agua a diferentes temperaturas y tolerancias permitidas para cierto tipo de material volumétrico.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Agua destilada

4.2. Materiales

- Termómetro 0-100 $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$

- Erlenmeyer de 125 mL. Tapón de corcho y recubrimiento de papel de aluminio

- Pipeta aforada de 5 mL

- Bureta de 50 mL con llave de teflón

4.3. Instrumentación requerida

- Balanza analítica

- Cronómetro

4.4. Muestras para análisis

No aplica

4.5. Procedimiento

4.5.1. Efecto del grado de limpieza de la pipeta aforada de 5 mL

1. Utilice la pipeta sucia, tal y como la encontró en su gaveta o como se le suministró.
2. Mida la masa de un erlenmeyer de 125 mL limpio y seco con su correspondiente tapón. No lo manipule directamente con las manos. Solicite instrucciones a su profesor de laboratorio.
3. Llene la pipeta por arriba del nivel de aforo con agua desionizada a la temperatura escogida. Seque con papel absorbente o un paño, la superficie externa que estuvo en contacto con el agua y realice el aforo correcto de la misma.
4. Vierta el contenido de la pipeta en el erlenmeyer, apoyando su extremo inferior en la pared de éste. Deje escurrir durante 5 segundos posteriores al vertido del contenido.
5. Tape el erlenmeyer con el tapón y mida la masa inmediatamente en la balanza analítica. Anote el resultado en el cuadro correspondiente. Calcule la masa del agua vertida por la pipeta y posteriormente el volumen respectivo, tomando en cuenta el valor de la densidad a la temperatura del agua.
6. Repita la operación de calibrado 3 veces más, utilizando como masa inicial del erlenmeyer, la última masa determinada.

4.5.2. Calibración de una pipeta aforada de 5 mL

1. Lave cuidadosamente la pipeta aforada de 5 mL que utilizó en la parte A.
2. Llénela por arriba del nivel de aforo con agua desionizada a la temperatura escogida. Séquela con papel absorbente o un paño y realice el aforo de la misma.
3. Vierta el contenido de la pipeta en el erlenmeyer, apoyando el extremo final en la pared de éste. Deje escurrir durante 5 segundos posteriores al vertido del contenido.
4. Tape el erlenmeyer y mida su masa en la balanza analítica. Anote el resultado en el cuadro correspondiente. Calcule la masa del agua vertida por la pipeta y posteriormente el volumen respectivo, tomando en cuenta el valor de la densidad y la temperatura del agua.
5. Repita la operación de calibrado 7 veces más, utilizando como masa inicial del erlenmeyer, la última masa determinada.

4.5.3. Efecto del soplado en la calibración de la pipeta

1. Repita todo el procedimiento realizado en el punto II.B, asegurándose que una vez que ha dejado de escurrir el agua por la pipeta durante 5 segundos, ésta se

sople manteniendo apoyado la punta de la pipeta en la pared del erlenmeyer. Realice la anterior operación 3 veces más.

4.5.2. Calibración de la bureta a 30 mL

1. Use una bureta limpia y seca cuya llave sea de teflón. Lávela apropiadamente si es necesario.
2. Llénela con agua desionizada a la temperatura convenida hasta la marca de cero y al cabo de unos 30 segundos vuelva a leer el nivel del menisco. Asegúrese que no queden burbujas en la punta.
3. Durante ese tiempo de espera, mida la masa al 0.1 mg de un erlenmeyer de 125 mL con su tapón.
4. Vierta 30.0 mL de agua desde la bureta al erlenmeyer y tápelo. Mida la masa de éste con el agua y anote el valor en su cuaderno. Repita la operación dos veces más. Procure que la velocidad de vertido sea igual en las dos repeticiones.
5. Calcule la masa y volumen de agua vertido en cada oportunidad, tomando en cuenta el valor de la densidad y la temperatura del agua.

4.5.3. Precisión de la bureta a diferentes volúmenes. (1 y 10 mL)

1. (1 mL). Repita el procedimiento utilizado en la calibración de la bureta, (punto II.D), solo que en esta oportunidad depositará 1.0 mililitro en el erlenmeyer comenzando siempre en la marca de cero mL. Efectúe esta operación dos veces más.
2. (10 mL). Realice los mismos pasos del inciso anterior, pero en esta ocasión en su defecto mida 10 mililitros empezando siempre de cero mL. Efectúe esta operación dos veces más.
3. Calcule la masa y el volumen vertido de agua en cada caso y anótelos en su cuaderno, tomando en cuenta el valor de la densidad y la temperatura del agua.

5. Tratamiento de datos

Los datos deben presentarse tal como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Calibración de una bureta de 50 mL a $20,0 \pm 0,2$ °C, entregando volúmenes de 50,00 mL

M	Masa inicial Erlenmeyer (± 0.0001)	Masa final Erlenmeyer (± 0.0001)	Masa del agua (± 0.0002)	Volumen del vertido (± 0.0001)
1	60.5740	110.3970	49.8230	49.9135
2	60.5820	110.4080	49.8260	49.9164
3	60.5430	110.3700	49.8270	49.9170

Densidad del agua a 20,0°C: 0.9982

Con el volumen calculado para los puntos II.A II.B, II.C y II.D del procedimiento, determine para cada caso:

- el valor promedio del resultado con la incertidumbre expandida.
- la mediana y el ámbito.
- la desviación estándar para la pipeta limpia.
- la repetibilidad solo para la pipeta limpia expresada como % RSD.
- El error relativo del volumen medido (en %). Asuma como correcto el valor dado por el fabricante.

Para la parte II.B, pipeta limpia, aplique el criterio Q de rechazo, en el caso que lo amerite, para determinar si el valor más alejado de la medida de tendencia central debe ser aceptado o rechazado. Una vez evaluado el criterio Q, entonces calcule los valores definitivos con la incertidumbre expandida.

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 4 horas.

7. Bibliografía especializada

- Johnson, C.R. 1940. Calibration of Volumetric Apparatus. Journal of Chemical Education, 7(12), 582-583. DOI: 10.1021/ed017p582.
- Harris, G.L. 2012. NISTIR 7383: Selected Procedures for Volumetric Calibrations (12 ed.). SOP 24-1U: "Gravimetric Calibration of Volumetric Ware Using an Electronic Balance". National Institute of Standards and Technology, EE.UU.
- Solís-Montiel, E., Fernández-Araya, J.F. 2016. Manual de Laboratorio de Análisis Instrumental. Escuela de Química, Universidad Nacional.

8. Gestión de residuos.

Cuadro 3. Gestión de residuos de la práctica de calibración de material volumétrico

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Lavado de cristalería	KOH en etanol	3	3	líquido	
Observaciones	Debe reutilizarse cuando se utilice cristalería previamente lavada. Los remanentes del lavado deben retornar al envase original (siempre y cuando esté limpio), Los residuos de esta sustancia no utilizados o contaminados deben disponerse en el recipiente de desechos #3				

EXPERIMENTO 2

INTRODUCCIÓN AL LENGUAJE DE PROGRAMACIÓN R: ESTADÍSTICA BÁSICA Y ANÁLISIS DE REGRESIÓN

1. Contenidos

- 1.1. Introducción al uso de R y R Studio
- 1.2. Estadística básica usando R
- 1.3. Regresión lineal simple
- 1.4. Parámetros y análisis estadístico
- 1.5. Manejo de datos
- 1.6. Estimación de incertidumbre de la regresión usando R

2. Conocimientos previos requeridos

Para realizar este laboratorio se requiere que el estudiante este familiarizado con la aplicación de pruebas estadísticas básicas (ejemplo., prueba de rechazo Q) y el análisis de regresión lineal (ejemplo, calibración instrumental realizada en el curso de Química Analítica Cuantitativa).

3. Introducción

3.1. ¿Qué es R?

El uso del lenguaje R es cada vez más generalizado en las ciencias exactas y naturales. R puede ser descrito como un ambiente de computación estadística y gráfica que forma parte de la Fundación de Software Libre (o Free Software Foundation). Se puede considerar como un conjunto de herramientas de alta calidad para trabajar con datos, estadística y gráficos. Es además, un lenguaje de programación simple y efectivo con los recursos necesarios para desarrollar cualquier tipo de análisis. Por ejemplo, para los pasados Juegos Olímpicos en Río de Janeiro, el periódico el Washington Post publicó un análisis de la influencia que tuvo el carril asignado a un nadador sobre sus tiempos de ida y vuelta en competencias de natación de 800 o 1500 metros (www.washingtonpost.com/news/wonk/wp/2016/09/01/these-charts-clearly-show-how-some-olympic-swimmers-may-have-gotten-an-unfair-advantage/?noredirect=on&utm_term=.1459698e214e)

El uso de R requiere el desarrollo de habilidades básicas de programación, lo cual lo diferencia del uso de paquetes estadísticos disponibles mediante la compra de licencias comerciales. A diferencia de estos paquetes de software comerciales, R es un lenguaje de programación que requiere una previa interpretación de la información por parte del usuario. Esto significa para obtener un resultado en R, es necesario escribir una orden en un lenguaje de programación. La utilidad de este resultado depende además de la información proporcionada por el usuario. R es

además un lenguaje vectorial, lo que significa que las operaciones se realizan a la vez para todo un vector o una matriz de datos. Es por ello que la información que se incluyen en R debe tener un formato adecuado. Aunque su uso inicialmente puede parecer intimidador, el usuario de R utiliza las funciones ya desarrolladas por otros usuarios más avanzados (programadores en R), lo cual simplifica mucho el análisis de datos. Estas funciones se denominan “paquetes”, y han sido desarrolladas para un número relativamente grande de temáticas.

En general, un usuario de R debe desarrollar destrezas que incluyen el conocer los diferentes métodos disponibles para realizar una tarea (ejemplo, conocimientos estadísticos), seleccionar entre las diferentes opciones el método más adecuado y manejar los formatos de programación en R necesarios para obtener la información requerida. El objetivo de este experimento es el desarrollo de habilidades básicas para el uso de R. El estudiante aprenderá a realizar análisis estadístico básico usando R, incluyendo el análisis de regresión, ampliamente usado en la calibración de instrumentación analítica.

3.2. Regresión lineal

Un análisis de regresión lineal tiene como objetivo estimar un modelo matemático que pueda utilizarse para predecir el valor que una variable de respuesta (o dependiente) puede tomar en función del valor de una variable explicativa (o independiente). La ecuación general para un modelo de regresión es:

$$Y = f(X) + \epsilon \quad (1)$$

, donde Y es la variable de respuesta, f es una función que sustenta el modelo, para el cual hay infinitas posibles soluciones, X es la variable explicativa (es decir, los datos) y ϵ es un término de error o ruido. Si el modelo anterior es un modelo de regresión lineal, entonces Y es una variable cuantitativa, f es sencillamente una línea, X es una única variable cuantitativa y ϵ es aproximadamente a un valor N $(0, \sigma_e)$, en donde σ_e es un valor fijo, asociado a la estimación de la variable de respuesta en ausencia de la variable explicativa o de una señal analítica.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

No aplica

4.2. Materiales

- Computadora personal (laptop)

4.3. Instrumentación requerida

No aplica

4.4. Muestras para análisis

En este laboratorio no se utilizan “muestras para análisis”, pero se trabajará con datos reales proporcionados por el profesor.

4.5. Procedimiento

4.5.1. Instalación de R Studio.

1. Ingresar a la página web de R Studio (www.rstudio.com).
2. Descargar R y RStudio.
3. Ejecutar el archivo desde la carpeta en la cual fue descargado y seguir las instrucciones de instalación. Una vez hecho esto, se instala la versión gratuita de R Studio. **Cuando se requiera utilizar R, solamente es necesario abrir R Studio.**

4.5.2. Manejo básico de R

A continuación, se presenta un ejemplo del uso básico de R como calculadora. Este primer contacto servirá para familiarizarse con el uso de R. En R, los comentarios o notas al margen aparecen marcados usualmente con el símbolo #, mientras que los comandos (instrucciones) aparecen sin este símbolo. Las salidas o resultados se muestran a continuación en letra negra, mientras que los errores de salida se muestran en letra roja.

4.5.3. Usando R como calculadora

Para utilizar el lenguaje de programación R como calculadora, los símbolos que utilizaremos son: suma (+), resta (-), división (/), multiplicación (*) y exponente (^)

6.2.1.1 Operaciones básicas

```
8+7 #sumar
## [1] 15

8-7 #restar
## [1] 1

8/7 #dividir
## [1] 1.142857

8*7 #multiplicar (notar que no se utiliza la x)
```

```
## [1] 56
8*7.1 #Notar que se utiliza el punto como separador decimal (no se acepta la coma)
## [1] 56.8
2^4# elevar a la potencia
## [1] 16
sqrt(4) #raíz cuadrada. En R se debe tener cuidado con el uso de minúsculas y mayúsculas
## [1] 2
#(hay distinción de las mismas) ya que SQRT(4) brindaría un error porque la función "sqrt"
#esta mal escrita
4^(1/2) # otra forma de indicar raíz cuadrada de 4
## [1] 2
8^(1/3) #raíz cúbica de 8
## [1] 2
log10(8)# logaritmo en base 10
## [1] 0.90309
log(8)# logaritmo en base e (logaritmo natural)
## [1] 2.079442
exp(8.7) # antilogaritmo natural
## [1] 6002.912
```

En caso de obtener un error, R siempre provee una explicación que describe y permite identificar la fuente del mismo. Usualmente se recomienda usar la web para conocer mejor como manejar el error. Dentro de los sitios más utilizados para ubicar soluciones a estos errores se encuentran [Stack Overflow](#), [GitHub](#) y [R documentation and manuals](#)

La escritura de expresiones combinadas debe respetar un orden, las primeras operaciones son las potencias, después la multiplicación y división, y por último, la suma y resta

```
8*(8+7) # R toma en cuenta los paréntesis
## [1] 120
8*8+7 # esta expresión no es la misma que la anterior
## [1] 71
(9*3)^(1/3) #raíz cúbica de 27
## [1] 3
```

6.2.1.2. Secuencia de números

```
1:50 # crea una secuencia de números del 1 al 50
```

```
## [1] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
## [26] 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

seq(2.5,10.5,2) # crea una secuencia del 2 al 10 donde el 3er argumento determina

## [1] 2.5 4.5 6.5 8.5 10.5

#el intervalo entre los valores. "seq" es una función de R que indica realizar
#una tarea específica. Los elementos dentro del paréntesis que siguen se llaman ARGUMENTOS
1: 10 # secuencia del 1 al 5

## [1] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

4: 16 # secuencia del 2 al 4

## [1] 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

4:3 # Es importante que el primer número siempre sea menor al segundo, de lo contrario no tiene sentido.

## [1] 4 3
```

4.5.4. Conocer y elegir el directorio de trabajo

Para poder importar bases de datos, scripts o inclusive para saber donde se está guardando nuestro trabajo, es muy importante que conozcamos nuestro directorio de trabajo, para lo anterior, podemos utilizar un comando denominado `getwd()`.

`getwd()`

```
## [1] "G:/Mi unidad/DOCENCIA UNA/MIA/MIA 2020/Nuevo Manual/Práctica R"
```

El resultado que aquí se despliega, corresponde a la carpeta donde se estarán almacenando los archivos que se generen (por ejemplo, figuras, documentos) o bien, donde el lenguaje irá a buscar los archivos que posteriormente desee importar para el análisis respectivo. Cabe destacar que esta dirección será diferente en cada computadora puesto que dependerá de la ubicación previamente seleccionada por el usuario.

De manera similar, puede utilizarse el comando `setwd()`, sin embargo con este no obtendríamos el directorio, si no que cómo argumento de la función, debemos indicar el directorio donde queremos trabajar.

```
wd <- getwd() # Otra forma de manejar el wd es asignarlo como una variable
setwd <- (wd) # El wd queda establecido como una variable
list.files() # muestra lista de archivos en el directorio de trabajo

## [1] "Clase_1a_Intro.R"
## [2] "Clase_1b_lectura_datos.R"
## [3] "Clase_1d_tipos_datos.R"
## [4] "desktop.ini"
## [5] "Experimento_2_R_regresion_lineal.pdf"
## [6] "Fluxtower.csv"
## [7] "graficoaguas.JPG"
## [8] "Intro_R_MTDs_Lab_2_20.pdf"
## [9] "Introducción-al-Lenguaje-R.docx"
## [10] "Introducción-al-Lenguaje-R.html"
## [11] "Introducción-al-Lenguaje-R.pdf"
## [12] "Introducción-al-Lenguaje-R.Rmd"
## [13] "Introducción al Lenguaje R.Rmd"
```

```
## [14] "ion_waters.csv"
## [15] "jugadores.txt"
## [16] "Práctica R.Rproj"
## [17] "R Script-P.R"
## [18] "Regresión lineal GW.JPG"
## [19] "Regresión lineal S.JPG"
## [20] "script reporte ejemplo.R"
```

Lo importante en el lenguaje R, es trabajar de manera ordenada y saber localizar nuestros documentos, para lo anterior se recomienda:

1. Tener un solo directorio de trabajo, no obstante, puede convertirse poco práctico dependiendo del volumen de información que manejemos.
2. Si trabajamos en R Studio, la opción más ordenada y fácil es hacerlo mediante proyectos, a continuación, se comparte un [video tutorial para la creación de proyectos en R studio](#).

4.5.5. Tipos de datos en R

En R se puede trabajar con i) vectores, ii) matrices, iii) arrays (arreglos), iv) factores, v) listas, vi) dataframes, vii) funciones. Una función muy útil para identificar qué tipo de datos estamos trabajando es `str()`, ya que al indicar como argumento el objeto con que estamos trabajando, nos indicará el tipo de dato y toda la información relacionada con su composición. Más adelante aplicaremos esta función.

4.5.5.1. Vectores numéricos

```
a<-1.7
a=1.7
assign("a",1.7)
```

Mediante el procedimiento anterior, se realizó una asignación del valor 1.7, a la letra "a". Mediante cualesquiera de las 3 formas presentadas, es posible crear un objeto en R. Para poder visualizarlo, basta con correr o llamar el objeto.

```
a
## [1] 1.7
b<-c(10,11,15,19)
```

Otra manera para obtener los valores que fueron almacenados en un objeto (en este caso un vector numérico), es utilizar el comando `print()`, no obstante, por un tema de facilidad, se prefiere indicar únicamente el nombre del objeto

```
print(b)
## [1] 10 11 15 19
b
## [1] 10 11 15 19
```

Entre los vectores, es posible realizar cualquier tipo de función matemática

```
b*b
```

```
## [1] 100 121 225 361
1/b
## [1] 0.10000000 0.09090909 0.06666667 0.05263158
```

Pero también, es posible crear nuevos vectores, a partir de otros ya existentes

```
c<-1-b
c
## [1] -9 -10 -14 -18
```

Anteriormente, se analizó que es posible crear secuencias de números, de manera similar, se puede crear un vector utilizando una secuencia determinada

```
a<-1:3
a
## [1] 1 2 3
b<-rep(a,times=3)
b
## [1] 1 2 3 1 2 3 1 2 3
c<-rep(a,each=3)
c
## [1] 1 1 1 2 2 2 3 3 3
```

Pueden combinarse vectores de diferente tamaño siempre que el tamaño de uno sea múltiplo del otro

4.5.5.2. Vectores lógicos

Un vector lógico responde a valores de falso y verdadero, son muy útiles en ciertas funciones para análisis estadísticos.

```
a<-seq(1:10)
a
## [1] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
b<-(a>5) # asigna valores TRUE o FALSE a partir de una desigualdad
b
## [1] FALSE FALSE FALSE FALSE FALSE TRUE TRUE TRUE TRUE TRUE
```

Si queremos visualizar los valores de “a” que poseen cumplimiento del vector “b”, podemos hacer lo siguiente

```
a[b] #muestra los valores que cumplen una condición
## [1] 6 7 8 9 10
a[a>5] # lo mismo, pero quitando variables intermedias
## [1] 6 7 8 9 10
```

4.5.5.3. Vectores con caracteres

Un vector con caracteres, permite suministrar información textual. Por ejemplo, en una base de datos que contienen los resultados de análisis realizados por diversos analistas, la columna donde se especifica el nombre del analista puede ser utilizada como un vector característico. Estas funciones son muy útiles ya que también permiten especificar los colores que queremos trabajar para la elaboración de un gráfico, por ejemplo. Vamos a crear algunos vectores de este tipo.

```
a<- "Esto es un ejemplo"
a
## [1] "Esto es un ejemplo"
```

Es posible también, concatenar vectores numéricos y característicos.

```
x<-1.5
y<-3.5
paste("El punto es (",x,",",y,")", sep="") #concatenando x más un texto usando "paste"
## [1] "El punto es (1.5,-3.5)"
```

La función `substr()`, me permite eliminar algunas partes de la cadena

```
substr(a,6,11) # extrayendo una parte de la cadena
## [1] "es un "
```

4.5.5.4. Matrices

Las matrices son arreglos de 2 dimensiones donde cada elemento tiene el mismo modo (numérico, carácter, o lógico). Es un tipo especial de marco de datos, estas pueden ser creadas con la función `matrix()`.

```
matrix <- matrix(3:32, nrow=6, ncol=5) # se indica n° de filas y columnas
matrix # hemos creado una matriz de 5 columnas y 6 fila

##      [,1] [,2] [,3] [,4] [,5]
## [1,]  3  9 15 21 27
## [2,]  4 10 16 22 28
## [3,]  5 11 17 23 29
## [4,]  6 12 18 24 30
## [5,]  7 13 19 25 31
## [6,]  8 14 20 26 32

str(matrix)
## int [1:6, 1:5] 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 ...
```

Otra forma para crear una matriz es la siguiente:

```
cells = c(1,2,26,24,68)
namesf = c("F1", "F2") # nombre de las filas
namesc = c("C1", "C2") # nombre de las columnas
matrix2 <- matrix(cells, nrow=2, ncol=2, byrow=TRUE,dimnames=list(namesf, namesc))
matrix2
```



```
## C1 C2
## F1 1.2 26
## F2 24.0 68
```

4.5.5.5. Data Frames

Un marco de datos es un objeto con columnas que representan variables con diferentes tipos de datos (numéricos, caracteres, etc.). Es el tipo de estructura de datos más común en R.

```
size <- c(173,176,180,165,185,175,186,160,160,172,177,175,176)
age <- c(23,24,20,22,23,24,25,28,21,21,31,24,26)
sex <- c(1,1,0,1,1,1,1,0,1,1,0,1,1)
str(sex)

## num [1:13] 1 1 0 1 1 1 1 0 1 1 ...
```

En el caso anterior, se indica que “sex”, es un vector numérico (pero el vector “sex” debería ser de tipo carácter ya que 1 y 0 son macho y hembra). Para determinar la naturaleza de un vector de datos o una variable, es posible utilizar la función *is.numeric()*, *is.logical()*, etc; según corresponda.

```
is.numeric(sex) # para averiguar si sex es una variable numérica
## [1] TRUE

is.factor(sex) # para averiguar si sex es un factor
## [1] FALSE
```

R considera que al incluir números, la variable es numérica, sin embargo para indicarle que es un factor (es una variable codificada 1=Macho y 0=Hembra), hay que convertir la variable en factor utilizando la función *as.factor()*, esta puede ser utilizada para convertir otro tipo de variables según corresponda

```
sex <- as.factor(sex) # transforma el vector numérico en un factor
sex = factor(sex) # otra forma de transformar variable numérica en un factor
str(sex)

## Factor w/ 2 levels "0","1": 2 2 1 2 2 2 2 1 2 2 ...
```

Los factores en R pueden ser variables categóricas nominales u ordinales. Se puede generar niveles de un factor

```
gl(4,2) # genera 4 niveles de un factor con 2 repeticiones por nivel
## [1] 1 1 2 2 3 3 4 4
## Levels: 1 2 3 4
```

Para proceder a crear un marco de datos con los vectores anteriores se utiliza la función *data.frame ()*

```
data<-data.frame(size,sex,age)
data

## size sex age
## 1 173 1 23
## 2 176 1 24
```

```
## 3 180 0 20
## 4 165 1 22
## 5 185 1 23
## 6 175 1 24
## 7 186 1 25
## 8 160 0 28
## 9 160 1 21
## 10 172 1 21
## 11 177 0 31
## 12 175 1 24
## 13 176 1 26
```

Después de crear el data frame, existen varias funciones para poder realizar la visualización del mismo

View(data) *# en algunos casos cuando se utilizan R Markdown, la impresión del data frame no es visualizada por lo cual se puede utilizar de manera alternativa este comando*
head(data) *#permite visualizar las primeras 6 filas*

```
## size sex age
## 1 173 1 23
## 2 176 1 24
## 3 180 0 20
## 4 165 1 22
## 5 185 1 23
## 6 175 1 24
```

tail(data) *#permite visualizar las últimas 6 filas*

```
## size sex age
## 8 160 0 28
## 9 160 1 21
## 10 172 1 21
## 11 177 0 31
## 12 175 1 24
## 13 176 1 26
```

Además, como se mencionó al inicio, la función `str()`, permite examinar la estructura del objeto.

str(data)

```
## 'data.frame': 13 obs. of 3 variables:
## $ size: num 173 176 180 165 185 175 186 160 160 172 ...
## $ sex : Factor w/ 2 levels "0","1": 2 2 1 2 2 2 2 1 2 2 ...
## $ age : num 23 24 20 22 23 24 25 28 21 21 ...
```

En este caso indica que las variables “size” y “age” son numéricas y la variable “sex” es un factor con 2 niveles. La exploración de datos va a depender de los intereses particulares para los cuales se está trabajando los datos, sin embargo, de manera general, hacer una exploración de los datos, es una práctica muy recomendable para poder ser consciente del tipo de datos que estamos manejando.

class(data) *# informa el tipo de objeto*

```
## [1] "data.frame"
```

is.vector(data) *# otra forma de averiguar el tipo de objeto*

```
## [1] FALSE
```

```
is.data.frame(data)

## [1] TRUE

dim(data) # muestra las dimensiones del data frame (filas/columnas)

## [1] 13 3

colnames(data) # muestra el nombre de las columnas

## [1] "size" "sex" "age"

summary(data) # resumen de los estadísticos más comunes

##   size   sex   age
## Min.  :160.0 0: 3  Min.  :20
## 1st Qu.:172.0 1:10 1st Qu.:22
## Median :175.0      Median :24
## Mean   :173.8      Mean   :24
## 3rd Qu.:177.0      3rd Qu.:25
## Max.   :186.0      Max.   :31
```

Además, es posible elegir una serie de datos en particular, para ello se utilizan diversas funciones, dentro de las más utilizadas se encuentra el signo de dólar, el cual permite elegir una columna específica del conjunto de datos.

```
data$size [11] # selecciona el dato 11 de la variable "size"

## [1] 177
```

Por su parte, si se requiere elegir un rango de datos de una variable, puede utilizarse la selección por secuencia de valores.

```
data$age[4:7] # selecciona los datos 4 al 7 de la variable "age"

## [1] 22 23 24 25
```

Finalmente, si deseamos elegir una sola fila, una sola columna, o bien, un punto específico (fila y columna), es posible utilizar el `[]` para realizar el proceso denominado indexación.

```
macho_alto<-data[3,] #elegimos la fila que contiene los datos del macho que mide 180 y de edad 20
macho_alto

##  size sex age
## 3 180 0 20

menos_edad<-data[3,3] #elegimos el valor específico de menor edad
menos_edad

## [1] 20
```

Si utilizamos `[]` para indexar datos, debemos saber que el primer valor que indiquemos, será el correspondiente a la fila, seguido de la coma, deberemos indicar el número de columna.

4.6. Ingresar datos en R y leer su contenido

Los archivos utilizados en esta sección se encuentran en el aula virtual del curso.

```
read.table("jugadores.txt") # despliega los datos pero no están disponibles.
```

```
##      V1 V2  V3
## 1 lateral edad estatura
## 2      1 27 178,56
## 3      1 22  181,5
## 4      2 23   183
## 5      1 24   162
## 6      2 26   172
## 7      1 26  171,5
## 8      1 33   160
## 9      1 26   163
## 10     1 29   167
## 11     1 24  161,2
## 12     2 25   170
## 13     2 26   187
## 14     1 23   166
## 15     1 27   162
## 16     2 25   194
## 17     1 24   160
## 18     2 22   185
## 19     1 21   155
## 20     1 21   175
## 21     2 22   183
## 22     1 22   167
## 23     1 30   172
## 24     1 25   163
## 25     1 24   172
## 26     1 23   161
## 27     2 33   182
```

#Hay que crear un objeto con los datos usando <-

```
data<-read.table("jugadores.txt")
```

```
head(data) # despliega los primeros datos del conjunto. La primera fila con los nombres
```

```
##      V1 V2  V3
## 1 lateral edad estatura
## 2      1 27 178,56
## 3      1 22  181,5
## 4      2 23   183
## 5      1 24   162
## 6      2 26   172
```

#de columnas es considerada como datos

Para que la primera fila sea considerada como los nombres de las columnas, debe de usar como argumento de la función `head=T` al importar los datos y asignárselo a un objeto.

```
data<-read.table("jugadores.txt",head=T) # T=TRUE y F=FALSE
```

```
head(data)
```

```
## lateral edad estatura
## 1      1 27 178,56
## 2      1 22  181,5
## 3      2 23   183
## 4      1 24   162
## 5      2 26   172
## 6      1 26  171,5
```

4.6.1. Modificando las variables del conjunto de datos

Si por algún motivo deseamos modificar las variables de un conjunto de datos, es importante conocer el tipo de datos que tenemos, lo cual podemos hacerlo utilizando la función de `str()`

```
str(data)

## 'data.frame': 26 obs. of 3 variables:
## $ lateral : int 1 1 2 1 2 1 1 1 1 1 ...
## $ edad : int 27 22 23 24 26 26 33 26 29 24 ...
## $ estatura: chr "178,56" "181,5" "183" "162" ...
```

Si quisiéramos adicionar 10 unidades a la variable estatura (porque es necesario algún tipo de corrección), la variable “estatura” debería ser numérica, no obstante, al realizar este procedimiento exploratorio, nos percatamos que es considerada como un factor. Lo anterior sucede debido a que los decimales están siendo separados por comas y por ende no está reconociéndolo como numérico. Para solventar esto utilizamos el argumento `dec=“,”`

```
data<-read.table("jugadores.txt",head=T,dec=",")
head(data) # al importar los datos especificar qué “,” es usado para separar los decimales

## lateral edad estatura
## 1 1 27 178.56
## 2 1 22 181.50
## 3 2 23 183.00
## 4 1 24 162.00
## 5 2 26 172.00
## 6 1 26 171.50
```

#porque de lo contrario toma la variable como un factor

Retomando nuestra misión original, ahora será posible añadir esas 10 unidades puesto que la variable es numérica.

```
str(data$estatura)

## num [1:26] 179 182 183 162 172 ...

data$estatura + 10 # ahora es posible

## [1] 188.56 191.50 193.00 172.00 182.00 181.50 170.00 173.00 177.00 171.20
## [11] 180.00 197.00 176.00 172.00 204.00 170.00 195.00 165.00 185.00 193.00
## [21] 177.00 182.00 173.00 182.00 171.00 192.00
```

4.6.2. Utilizando datos en formato .csv () (valores separados por coma)

```
tower <- read.csv("Fluxtower.csv",head=T,dec=".") # Se importan usando "read.csv"
head(tower)

## TIMESTAMP FCO2 FH2O ustar Tair RH Tsoil Rain
## 1 23-2-09 22:00 -0.7426 -0.0167 0.0296 4.131667 74.29667 9.253333 0
## 2 23-2-09 22:30 0.6143 0.0113 0.0402 3.544000 77.22000 8.660000 0
## 3 23-2-09 23:00 -1.8577 -0.0412 0.0982 3.276333 78.71667 8.186667 0
## 4 23-2-09 23:30 0.3544 -0.0004 0.0979 2.747667 81.83333 7.790667 0
## 5 24-2-09 0:00 0.3350 0.0003 0.0398 2.687000 82.06667 7.299667 0
## 6 24-2-09 0:30 -0.3797 0.0036 0.0627 2.055667 85.76667 7.180667 0
```

View(tower) # datos de flujos de agua y dióxido carbono en bosques.

También se puede usar `read.table()` con archivos .csv pero debe utilizar el argumento `sep=","`

```
tower <- read.table("Fluxtower.csv",head=T,dec=".", sep=",")
head(tower)

##   TIMESTAMP  FCO2  FH2O  ustar  Tair  RH  Tsoil Rain
## 1 23-2-09 22:00 -0.7426 -0.0167 0.0296 4.131667 74.29667 9.253333 0
## 2 23-2-09 22:30 0.6143 0.0113 0.0402 3.544000 77.22000 8.660000 0
## 3 23-2-09 23:00 -1.8577 -0.0412 0.0982 3.276333 78.71667 8.186667 0
## 4 23-2-09 23:30 0.3544 -0.0004 0.0979 2.747667 81.83333 7.790667 0
## 5 24-2-09 0:00 0.3350 0.0003 0.0398 2.687000 82.06667 7.299667 0
## 6 24-2-09 0:30 -0.3797 0.0036 0.0627 2.055667 85.76667 7.180667 0
```

View(tower)

4.6.3. Crear un subset de datos

Crear un subset de datos con la lateralidad y la edad solamente

```
player <- read.table("jugadores.txt",head=T,dec=".")
head(player)
```

```
## lateral edad estatura
## 1 1 27 178,56
## 2 1 22 181,5
## 3 2 23 183
## 4 1 24 162
## 5 2 26 172
## 6 1 26 171,5
```

View(player)

Como ya analizamos líneas más arriba, es posible utilizar `[]` para indexar.

```
player2 <- player[,1:2] # la coma se usa para seleccionar todas las filas. 1:3 para
#seleccionar columna 1, 2 y 3
```

```
View(player2)
head(player2)
```

```
## lateral edad
## 1 1 27
## 2 1 22
## 3 2 23
## 4 1 24
## 5 2 26
## 6 1 26
```

Sin embargo, también se pueden filtrar los datos con la función `subset()`

```
playerder <- subset(player, lateral == "2")
playerder
```

```
## lateral edad estatura
## 3 2 23 183
## 5 2 26 172
## 11 2 25 170
## 12 2 26 187
## 15 2 25 194
## 17 2 22 185
```

```
## 20 2 22 183
## 26 2 33 182
```

4.7. Estadística básica con R

4.7.1 Estadística descriptiva

Vamos a generar un objeto que contiene la masa de una moneda que fue medida varias veces.

```
penny1=c(3.080, 3.094, 3.107, 3.056, 3.112, 3.174, 3.198) #Masa de una moneda medida varias veces
```

Para calcular los parámetros descriptivos básicos, podemos utilizar las funciones base que incorpora el lenguaje R.

```
mean(penny1) #Promedio
## [1] 3.117286

median(penny1) #Mediana
## [1] 3.107

sd(penny1) #desviación estándar
## [1] 0.05091403

var(penny1)#Varianza
## [1] 0.002592238

range(penny1) #tango
## [1] 3.056 3.198
```

También es posible utilizar funciones de otros paquetes que han sido diseñadas para sistematizar todos los datos en una única salida. Tal es el caso de la función `numSummary` del paquete `Rcmdr` y/o `RcmdrMisc`.

Para hacer uso de estas funciones primero deben los paquetes ser instalados con la función `install.packages("nombre del paquete")` y cargados con la función `library(nombre del paquete)`. Recordar que el proceso de instalación se hace una única vez, mientras que el cargado de librerías es requerido cada vez que abrimos R después de cerrar una sesión.

```
library(Rcmdr)
library(RcmdrMisc)
```

Una vez que han sido cargadas ambas librerías, podemos utilizar la función mencionada anteriormente. Es importante destacar que para esta función existen múltiples argumentos que pueden ser indicados a la función, los cuales permiten obtener, percentiles, descriptiva por grupos, entre otros factores. Para obtener más detalle se recomienda visitar la sección de "help" para indagar más sobre la función.

```
descriptiva<-numSummary(penny1, statistics = c("mean", "sd", "cv", "IQR", "quantiles", "se(mean)"), quantiles =
c(0, 0.25, 0.5, 0.75, 1))
### la función numSummary corresponde al paquete RcmdrMisc
```

```

descriptiva
##      mean      sd  se(mean)  IQR      cv      0%      25%      50%      75%      100%
##  3.117286  0.05091403  0.01924369  0.056  0.01633281  3.056  3.087  3.107  3.143  3.198
##
## 7

```

Otra opción que es posible utilizar mediante el lenguaje R, es la creación de funciones, si queremos obtener una función que nos calcule el %RSD podemos crearla de la siguiente forma

```

RSD<-function(x){(sd(x)/mean(x))*100} ####función para calcular el %RSD de cualquier conjunto de datos
RSD(penny1)
## [1] 1.633281
RSD(data$estatura)
## [1] 5.972095

```

4.7.2. Estadística inferencial

Pruebas de significancia: Comparación de dos medias

Comparemos los volúmenes de titulante gastados por dos estudiantes que analizan la misma muestra. Sin embargo, un estudiante realiza 5 réplicas y otro hace 6 réplicas.

```

est1<-c(35.50,36.90,35.45,34.85,35.55)
est2<-c(36.35,37.00,35.10,36.95,37.05,35.65)

mean(est1)
## [1] 35.65
mean(est2)
## [1] 36.35

```

Los datos no están emparejados (número diferente de réplicas), por lo que se usará una prueba t no emparejada para determinar si ambos estudiantes arrojan volúmenes diferentes para la misma muestra.

Utilizaremos R para completar una prueba t no pareada. Antes de que podamos completar una prueba t debemos usar una prueba F para determinar si las variaciones para los dos conjuntos de datos son iguales o desiguales.

Nuestra hipótesis nula es que las varianzas son iguales, $varest1 = varest2$, y nuestra hipótesis alternativa es que las varianzas no son iguales. Esta prueba la completamos a través de la función `var.test()`

```

var.test(est1,est2)
##
## F test to compare two variances

```



```
##
## data: est1 and est2
## F = 0.85526, num df = 4, denom df = 5, p-value = 0.9049
## alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
## 95 percent confidence interval:
##  0.1157656 8.0090869
## sample estimates:
## ratio of variances
##      0.8552632
```

Si lo que se quiere es comprobar que una u otra varianza es mayor o menor que la otra se puede usar la prueba de “una cola”.

R proporciona el intervalo de confianza del 95% para F exp (las relaciones entre ambas variables). Debido a que este intervalo de confianza es de 0.115 a 8.009; incluye el valor esperado para F de 1.00 (si las varianzas son iguales, la relación de ellas $varest1/varest2$ debe ser 1), mantenemos la hipótesis nula y no tenemos evidencia de una diferencia entre las varianzas.

No habiendo encontrado evidencia que sugiera varianzas desiguales, ahora completamos una prueba t no pareada asumiendo varianzas iguales. Nuestra hipótesis nula es que no hay diferencia entre las medias, $Xest1 = Xest2$, y nuestra hipótesis alternativa es que hay una diferencia entre las medias. Esta prueba la completamos a través de la función `t.test()`. No omitimos manifestar que la redacción de las hipótesis nulas y alternas han sido simplificadas de los formalismos estadísticos en aras de focalizar la atención sobre el entendimiento de la ejecución de la prueba en el lenguaje R.

```
t.test(est1, est2, mu = 0, paired = FALSE, var.equal = TRUE) #Si los valores están emparejados,
```

```
##
## Two Sample t-test
##
## data: est1 and est2
## t = -1.4655, df = 9, p-value = 0.1768
## alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -1.7805161 0.3805161
## sample estimates:
## mean of x mean of y
##  35.65  36.35
```

```
#entonces en paired=TRUE
```

4.7.3. Rechazo de valores anómalos

Para realizar este proceso, es necesario utilizar el paquete `outliers`. Para instalarlo y cargarlo se utilizan los pasos arriba descritos.

Usaremos este paquete para encontrar si hay valores atípicos en los datos del estudiante 2 (`est2`) que recién analizamos utilizando tanto la prueba Q de Dixon como la prueba de Grubb. Las funciones para estas pruebas son: `dixon.test()` y `grubbs.test`

```
library(outliers)
dixon.test(est2, type = 10, two.sided = TRUE)
```

```
##
## Dixon test for outliers
##
## data: est2
## Q = 0.28205, p-value = 0.723
## alternative hypothesis: lowest value 35.1 is an outlier

grubbs.test(est2, type = 10, two.sided = TRUE)

##
## Grubbs test for one outlier
##
## data: est2
## G = 1.53285, U = 0.43609, p-value = 0.5119
## alternative hypothesis: lowest value 35.1 is an outlier
```

4.7.4. Modelos de regresión lineal

Hay dos opciones para realizar un análisis de regresión: 1) se pueden formular vectores para las concentraciones y señales, o 2) se prepara un archivo .txt o .csv con los datos correspondientes

```
conc = c(0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5)
mV = c(0.01, 12.36, 24.83, 35.91, 48.79, 60.42, 0.011, 12.33, 24.80, 35.88, 48.76, 60.39, 0.009, 12.39, 24.86, 35.94, 48.82, 60.45)
```

En R, para crear modelos lineales se utiliza la función es `lm()`.

```
model=lm(mV ~ conc)
```

Para poder visualizar la función, podemos utilizar una función muy sencilla

```
plot(conc,mV,pch=19,col="blue",cex=1,abline(col="red"))
```

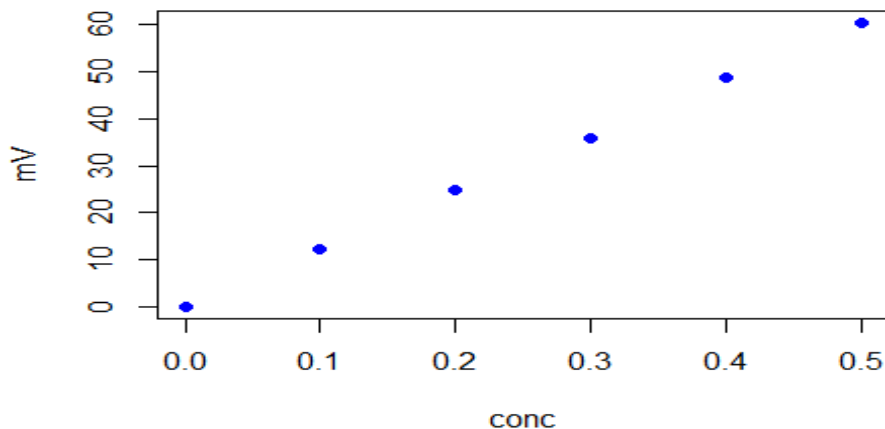


Figura 2. Función del modelo de regresión lineal.

O una más elaborada que permite visualizar los datos con mayor calidad, para esta, requeriremos del paquete `ggplot2`.

```
ggplotRegression <- function (regresion) { ### función para plotear la regresión con
#los valores estadísticos

require(ggplot2)

ggplot(regresion$model, aes_string(x = names(regresion$model)[2], y = names(regresion$model)[1])) +
  geom_point() +
  stat_smooth(method = "lm", col = "blue") +
  scale_y_continuous(labels = scales::number_format(accuracy = 0.01, decimal.mark = '.')) +
  scale_x_continuous(labels = scales::number_format(accuracy = 0.1, decimal.mark = '.')) +
  labs(title = "Título",
       x = "Título", y = "Título",
       subtitle = paste("Pendiente =", signif(regresion$coef[[2]], 4),
                        "Intercepto =", signif(regresion$coef[[1]], 4),
                        "r2 =", signif(summary(regresion)$adj.r.squared, 4),
                        "p valor =", signif(summary(regresion)$coef[2,4], 3)))
}

plotlinealidad <- ggplotRegression(lm(mV ~ conc)) ### ploteo con la función
plotlinealidad
```

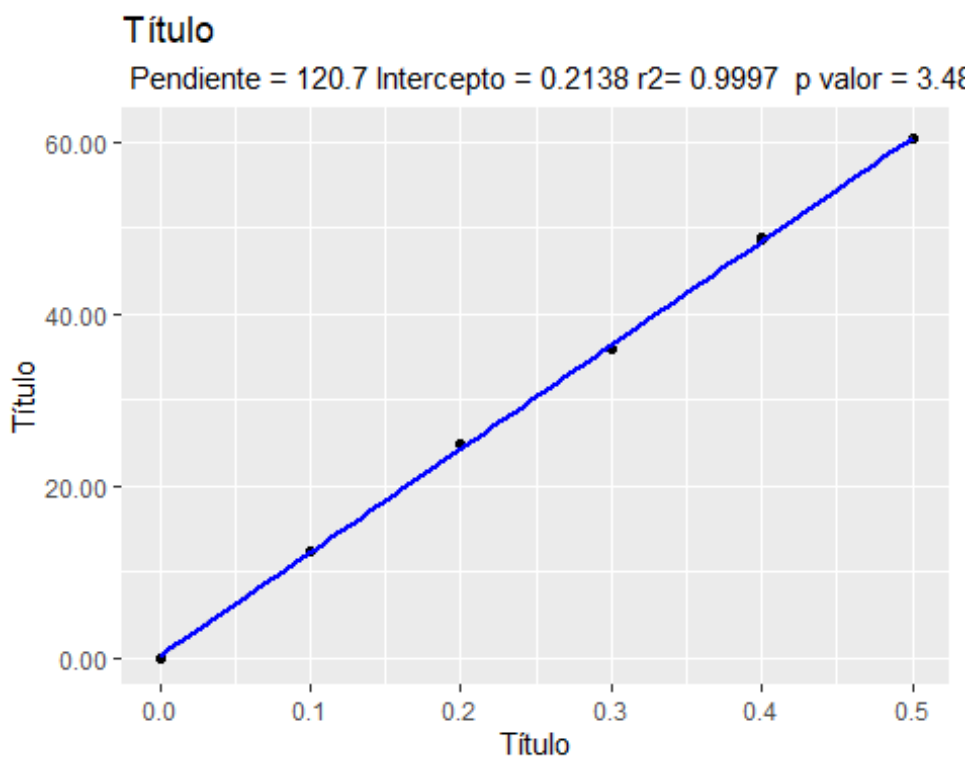


Figura 3. Modelo de regresión lineal con línea de tendencia.

Si queremos revisar todos los estadísticos de la regresión, utilizaremos la función `summary`.

```
summary(model)
```

```
##
## Call:
## lm(formula = mV ~ conc)
##
## Residuals:
##   Min     1Q   Median     3Q    Max
## -0.54124 -0.20356 -0.03124  0.29212  0.50790
##
## Coefficients:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  0.2138   0.1458   1.466   0.162
## conc       120.6914   0.4816 250.597 <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 0.349 on 16 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.9997, Adjusted R-squared:  0.9997
## F-statistic: 6.28e+04 on 1 and 16 DF, p-value: < 2.2e-16
```

La primera sección del resumen de R del modelo de regresión enumera los errores residuales. Para examinar un gráfico de los errores residuales, usamos la función `plot`

```
plot(model,which=1)
```

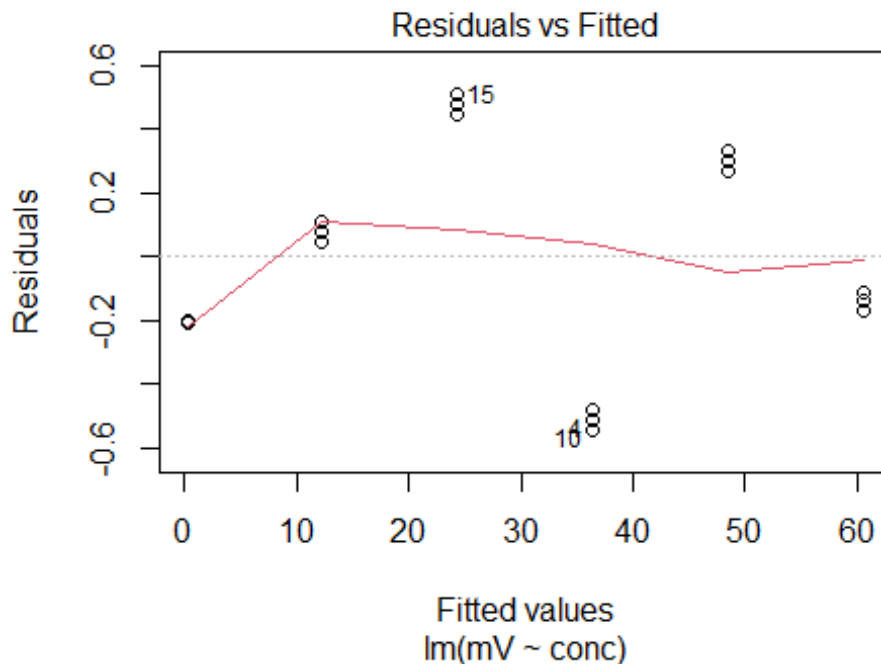


Figura 4. Gráfico de errores residuales.

Una alternativa visualmente más atractiva para poder corroborar los principales supuestos que debe cumplir un buen modelo de regresión lineal, podemos encontrarla con la función `check_model` del paquete `performance`. (Recuerde instalarlo primero, luego cargarlo)

```
library(performance)

## Warning: package 'performance' was built under R version 4.0.3

check_model(model)

## Not enough model terms in the conditional part of the model to check for multicollinearity.

## `geom_smooth()` using formula 'y ~ x'
## `geom_smooth()` using formula 'y ~ x'
## `geom_smooth()` using formula 'y ~ x'

## `stat_bin()` using `bins = 30`. Pick better value with `binwidth`.

## Warning: Removed 18 rows containing missing values (geom_text_repel).
```

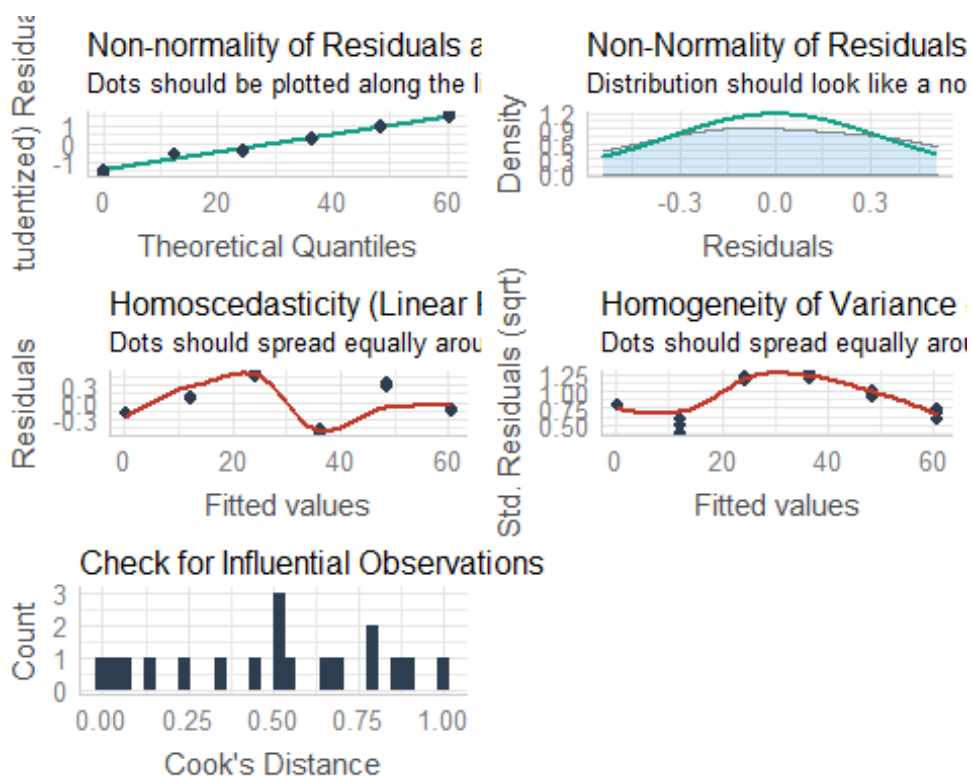


Figura 5. Supuestos que debe cumplir un buen modelo de regresión lineal.

4.7.5. Predecir la incertidumbre de una concentración estimada a partir de la regresión

Para poder estimar la incertidumbre y concentración a partir de una regresión lineal, utilizaremos el paquete *chemCal*.

Usando este paquete se pueden estimar la incertidumbre de la concentración obtenida a partir de una señal o señales obtenidas para una muestra. La concentración del analito, CA, viene dada por el valor \$Predicción, y su desviación estándar se muestra como "Error estándar".

El valor de “Confidence” es el intervalo de confianza, $\pm ts_{CA}$, para la concentración del analito, y “Límites de confianza” proporciona el límite inferior y el límite superior para el intervalo de confianza para CA. Si resta el valor mayor y menor de este intervalo de confianza se obtiene la incertidumbre expandida ($K=2$) para el valor de la concentración

```
library(chemCal)
muestra = c(29.32, 29.16, 29.51)
Resultado<-inverse.predict(model,muestra,alpha= 0.05) #alpha a 0.05 es equivalente a un
#95% de confianza

Resultado

##                               $Prediction
##                               0.2412449
##                               [1]
##                               $`Standard Error`
##                               [1] 0.001803426
##                               ##
##                               $Confidence
##                               [1] 0.003823093
##                               ##
##                               $`Confidence Limits`
## [1] 0.2374218 0.2450680
```

Podríamos utilizar lo ya aprendido para reportar el resultado:

```
paste("El valor obtenido mediante la calibración es de",
round(Resultado$Prediction,4), "+/-",round(Resultado$Confidence,4),"mg/L")
## [1] "El valor obtenido mediante la calibración es de 0.2412 +/- 0.0038 mg/L"
```

5. Asignación para la casa

Para este ejercicio, utilizaremos los datos ion_waters.csv. Este conjunto de datos está disponible el aula virtual del curso. Los datos corresponden al análisis de nitrato y sulfato (mg/L) en dos tipos de aguas: S (agua superficial) y GW (agua subterránea).

1. Importe la tabla de datos y visualice su estructura
2. Realice una exploración de datos
3. Cree dos subconjuntos de datos, uno conteniendo solamente las muestras de agua superficial y otro las de agua subterránea
4. ¿Hay diferencias significativas entre la concentración promedio de nitrato y sulfato encontradas en estos tipos de agua?
5. Grafique las variables nitrato y sulfato para evidenciar si hay correlación entre ambas variables en los dos tipos de muestras de agua
6. Estime un modelo de regresión lineal y grafique los resultados del análisis de la regresión.

Se destinará una carpeta en el aula virtual del curso para el envío de la asignación. Los formatos permitidos son .txt o como un script R (puede ser creado con R Studio).

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El laboratorio se realizará durante una sesión de laboratorio de 4 horas presenciales.

7. Bibliografía especializada

- Tang, H., Pengsheng, J. (2014). Using the Statistical Program R Instead of SPSS To Analyze Data, en: "Tools of Chemistry Education Research"; Bunce, D., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC.
- 4.8: Using Excel and R to Analyze Data (Disponible en : [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/04_Evaluating_Analytical_Data/4.8%3A_Using_Excel_and_R_to_Analyze_Data](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/04_Evaluating_Analytical_Data/4.8%3A_Using_Excel_and_R_to_Analyze_Data)) Accesado el 06 de febrero de 2019.
- 5.6: Using Excel and R for a Regression Analysis (Disponible en: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/05_Standardizing_Analytical_Methods/5.6%3A_Using_Excel_and_R_for_a_Regression_Analysis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/05_Standardizing_Analytical_Methods/5.6%3A_Using_Excel_and_R_for_a_Regression_Analysis)) Accesado el 06 de febrero de 2019.

SECCIÓN II. ESPECTROSCOPIA MOLECULAR

EXPERIMENTO 3

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE IÓN NITRITO EN AGUAS

1. Contenidos

- 1.1. Aplicación de la espectrofotometría para el análisis cuantitativo de ion nitrito en matriz acuosa
- 1.2. Estudio de los parámetros de desempeño básicos de un método analítico
- 1.3. Validación de un método analítico mediante la realización de pruebas de laboratorio y posterior aplicación de pruebas estadísticas a los datos obtenidos
- 1.4. Demostración del uso de lenguaje de programación R para el análisis gráfico y estadístico de los resultados de laboratorio

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante deberá poseer conocimientos previos de la técnica espectrofotométrica de análisis; además deberá reconocer conceptos de estadística descriptiva, inferencial y quimiometría. Es recomendable que el estudiante conozca aspectos básicos del lenguaje de programación R.

3. Introducción

3.1. Validación de métodos de ensayo

En la actualidad el análisis químico cuantitativo es ampliamente utilizado para la solución de diversas necesidades en el ámbito industrial, ambiental, clínico, de investigación, entre otros. Por ello, es imperativo que los datos obtenidos mediante estos procedimientos sean confiables y respaldados por procedimientos que aseguren la calidad de los mismos.

Para alcanzar este objetivo, los laboratorio de ensayo deben apegarse a una serie de lineamientos que se establecen en normas internacionales para la estandarización y calidad; una de ellas es la norma "ISO/IEC 17025:2017: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración" que especifica los requisitos que deben cumplir los laboratorios para su operación coherente, imparcial y con competencia técnica demostrable; siendo la validación de los métodos de ensayo uno de estos requisitos.

La validación es el procedimiento mediante el cual se establece los parámetros de desempeño y las limitaciones que posee un método de ensayo; esto se realiza mediante un plan de trabajo elaborado en función de obtener datos que permitan evaluar si el método de ensayo que se desarrolla o implementa para las necesidades analíticas, es capaz de adecuarse al propósito que el laboratorio requiere.

Un ensayo analítico debe cumplir con diversos criterios de aceptación que demuestren que sus parámetros de desempeño son aptos para generar resultados de calidad y confiables. La rigurosidad con la que se diseñan las validaciones depende del tipo de análisis, de las limitaciones particulares por el tipo de matriz y el método de ensayo que se pretende realizar, ya sean métodos normalizados, normalizados modificados, no normalizados o desarrollados por el laboratorio.

De manera general, los parámetros de desempeño son características del método de ensayo las cuales deben ser evaluadas contra criterios de aceptación cuyo nivel de cumplimiento se define por guías internacionales, criterio de experto, certificados de referencia o bien por el nivel de concentración de analito en la matriz analizada, típicamente los parámetros de desempeño sujetos a validación son: especificidad, selectividad, efecto matriz, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, veracidad, límite de detección, límite de cuantificación, incertidumbre y robustez.

En este experimento se realizará la validación de un método analítico para la determinación de ión nitrito en matriz acuosa mediante el método espectrofotométrico, la validación se realizará de la siguiente manera:

- Estableciendo el intervalo de trabajo, de acuerdo al propósito del método.
- Realizando un estudio de linealidad a partir del coeficiente de determinación, la distribución y sumatoria de residuales.
- Verificando el comportamiento de exactitud del método en los diferentes niveles de calibración seleccionados.
- Estableciendo los límites de detección y cuantificación, así como la incertidumbre del método siguiendo las recomendaciones de diversas referencias especializadas.
- Verificando la veracidad, la repetibilidad y la precisión intermedia mediante el análisis de materiales de referencia certificados.
- Comprobando la especificidad mediante pruebas de recuperación en muestras reales fortificadas.
- Evaluando la robustez del método mediante la aplicación del diseño experimental Youden-Steiner.

3.2 El ión nitrito en matriz acuosa

Por diversas razones puede ser de interés medir la concentración del ión nitrito, en aguas naturales, de proceso o residuales. Esta especie nitrogenada presenta la particularidad de poseer un estado de oxidación intermedio (3+), entre el ion amonio (1+) y el ion nitrato (5+). En aguas naturales esta especie puede ser medida con el interés de caracterizar y/o relacionar el potencial de oxidación-reducción del ambiente acuático debido a la particularidad derivada de su estado de oxidación; caso similar sucede en las aguas residuales ya que altas concentraciones de esta especie se relacionan con altos niveles de degradación activa de materia orgánica. Finalmente, en procesos industriales, las aplicaciones pueden ser muy variadas, ya que las sales de nitrito se utilizan como conservantes en alimentos y algunos productos para el hogar.

El ion nitrito en matriz acuosa puede determinarse espectrofotométricamente mediante la generación de un compuesto coloreado producto de la reacción de este ion en medio ácido con la sulfanilamida, esta reacción forma una sal de diazonio que al unirse con la N(1-naftil) etilendiamina, genera un producto diazotado de color púrpura que absorbe radiación en el espectro visible con un máximo en 543 nm, el cual se muestra en la figura 6.

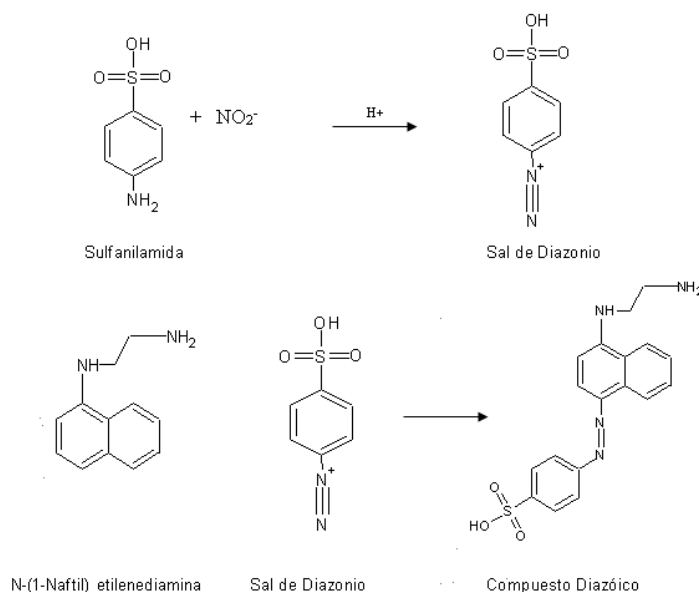


Figura 6. Reacción química entre el ion nitrito y sulfanilamida y la formación del complejo diazónico coloreado.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Agua desionizada
- Reactivo de color para el análisis espectrofotométrico de nitrito (Sulfanilamida, 1 % m/v, ácido fosfórico 10 %v/v y 0,1%*m/v* N-(1-naftil) etilendiamina xx %*m/v*, la disolución es estable durante un mes almacenada en refrigeración en botella oscura)
- Disolución patrón 5 mg/L de ion nitrito
- Material de referencia certificado con concentración de ion nitrito en el ámbito de trabajo del método (0,1-0,5 mg/L)

4.2. Materiales

- Computadora personal
- Material volumétrico y cristalería de laboratorio general

4.3. Instrumentación requerida

- Espectrofotómetro de absorción UV-Vis

4.4. Muestras para análisis

- Muestras de agua natural, de proceso o residuales

4.5. Procedimiento

4.5.1. Preparación de la muestra

Las muestras analizadas deben estar libres de sólidos en suspensión para evitar interferencias ópticas, esto se puede asegurar haciendo pasar la muestra por un filtro de 0,4 μm . El pH debe poseer un rango de 5,0-9,0; caso contrario debe realizarse un ajuste con disolución de ácido clorhídrico o amoníaco 1M.

Se toman alícuotas de 50,00 mL de la muestra en un Erlenmeyer de 125 mL o similar, posteriormente se adiciona 2 mL del reactivo de color. Las lecturas de absorbancia deben realizarse a 543 nm en un periodo de tiempo entre 10-120 minutos.

4.5.2. Intervalo de trabajo, linealidad, cedasticidad, incertidumbre, límite de detección y límite de cuantificación

Según el Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater, (Rice et al, 2012) el método espectrofotométrico para la determinación de nitrito en aguas, posee un intervalo de trabajo lineal de 0,05-1,00 mg/L; esto implica que cualquier intervalo de trabajo dentro de este rango, debe ser lineal. Para establecer el intervalo de trabajo del método a implementar, se toma en cuenta la concentración típica de esta especie en las muestras que el laboratorio analizaría ya que los ensayos analíticos deben ser adecuados para el propósito del laboratorio. Para este caso, se considera como adecuado al propósito del laboratorio, cualquier rango que no supere los 0,50 mg/L.

Para validar la linealidad del rango de trabajo seleccionado, se realizan 4 curvas de calibración con al menos 5 niveles de calibración. Una vez obtenidas las absorbancias de cada disolución se procede a realizar la gráfica correspondiente y el estudio de linealidad, obteniendo la regresión lineal a través del método de mínimos cuadrados. Con los datos obtenidos se analiza el comportamiento de los residuales, la sumatoria de los mismos y el coeficiente de determinación.

Los límites de detección y cuantificación pueden ser calculados por diferentes enfoques, dos de los más usuales se representan a continuación:

$$LD = \frac{3\sigma}{m} \quad LC = \frac{10\sigma}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

Un primer enfoque consiste en sustituir el valor de sigma por el error estándar del intercepto, mientras que el segundo enfoque, sustituye el valor de sigma por el error estándar de la regresión lineal; para ambos casos, "m" representa la pendiente de la ecuación

Por su parte, la heterocedasticidad se evalúa mediante la prueba de igualdad de varianzas en los valores de absorbancia para los diferentes niveles de concentración (excepto para el blanco), lo ideal para un método de ensayo es que la regresión lineal utilizada sea homocedástica, es decir, que las varianzas en sus distintos niveles de concentración sean iguales ya que esto simplifica los cálculos de incertidumbre e inclusive para los límites de detección y cuantificación.

Finalmente, el cálculo de incertidumbre para las concentraciones obtenidas por regresión lineal se estima a partir del intervalo de confianza determinado por la misma. Este intervalo se estima considerando el error estándar del intercepto y de la pendiente.

4.5.3. Repetibilidad, precisión intermedia y veracidad

Para la verificación de la veracidad, se analiza una muestra de concentración conocida, idealmente esta muestra debe ser un material de referencia certificado (MRC) por un ente competente para dicho fin; en este experimento se analizará una muestra que con fines prácticos se considerará un MRC, el análisis se realizará al menos por septuplicado.

Con los datos de concentración obtenidos para el MRC, se calculará la desviación estándar y el coeficiente de variación, ambos estadísticos se utilizarán como estimadores de la repetibilidad.

Para comprobar la precisión intermedia, se realizará una prueba de igualdad de varianzas en la concentración obtenida para la muestra por dos estudiantes diferentes, para ello se recomienda aplicar una prueba F o prueba de Levene.

4.5.4. Aplicación de un diseño experimental para la evaluación de robustez

Para evaluar la robustez de un método de ensayo, se aplica un diseño experimental donde se ejecuta el procedimiento con todas sus condiciones normales (A), pero en diferentes experimentos y de manera aleatoria, se introducen pequeñas y deliberadas modificaciones (a). El diseño propuesto por Youden & Steiner (1975) es ampliamente utilizado para la evaluación de este parámetro de desempeño, en el cuadro 4, se muestra la aplicación del diseño:

Cuadro 4. Diseño experimental de Youden-Steiner para la evaluación de la robustez en un método de ensayo

Variable modificada	Experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Condición A	A	A	A	A	a	a	a	a
Condición B	B	B	B	b	B	b	b	b
Condición C	C	c	C	c	C	c	C	e
Condición D	D	D	d	d	d	d	D	D
Condición E	E	e	E	e	e	E	e	E
Condición F	F	f	f	F	F	f	f	F
Condición G	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

A partir de los resultados obtenidos puede calcularse el efecto de cada variable modificada, para ello se calcula la media de los cuatro análisis en sus condiciones normales y la media de los cuatro análisis en sus condiciones modificadas. Entre mayor sea la diferencia obtenida entre ambas medias, se infiere que existe mayor influencia de esta variable en el método, para determinar si es sensible, se compara el valor de la media contra un criterio de seguridad, normalmente el criterio está definido por el producto de la desviación estándar del método y la raíz cuadrada de dos.

4.5.5. Aplicación del método en muestras reales y ejecución de pruebas de recuperación para la evaluación de la especificidad.

La especificidad se valida a través de la comprobación que el método de ensayo es capaz de evaluar inequívocamente al analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén en la matriz. Para ello se analiza por triplicado una muestra real; paralelamente, se toma otra replica de muestra a la cual se le adiciona una cantidad exactamente conocida de analito. La diferencia entre el promedio de la muestra triplicada y la concentración de la muestra fortificada debe ser lo más cercana a la concentración conocida que fue añadida a la muestra.

5. Tratamiento de datos

El análisis de los datos se realizará en el lenguaje de programación R, a continuación, se muestra un ejemplo de la data que puede ser sistematizada a través de los resultados obtenidos en el experimento, así como el script utilizado para el tratamiento de datos:

	A	B	C	D	E	F
1	Patrón	Concentración	Absorbancia			
2	Blanco		0	0		
3	1	0,1875	0,147			
4	2	0,3743	0,271			
5	3	0,5614	0,414			
6	4	0,7489	0,549			
7	Blanco	0	0			
8	1	0,1875	0,137			
9	2	0,3743	0,28			
10	3	0,5614	0,407			
11	4	0,7489	0,557			
12	Blanco	0	0			
13	1	0,1875	0,144			
14	2	0,3743	0,293			
15	3	0,5614	0,424			
16	4	0,7489	0,553			
17	Blanco	0	0			
18	1	0,1875	0,123			
19	2	0,3743	0,264			
20	3	0,5614	0,395			
21	4	0,7489	0,528			
22						

4.5.a y 4.5.b

	A	B	C	D	E	F
1	Estudiante	Replica	Grupo	Concentración		
2	D	A	M	0,363		
3	D	B	M	0,361		
4	D	C	M	0,367		
5	D	D	M	0,374		
6	D	E	M	0,374		
7	D	F	M	0,388		
8	D	G	M	0,360		
9	R	A	V	0,390		
10	R	B	V	0,360		
11	R	C	V	0,388		
12	R	D	V	0,369		
13	R	E	V	0,398		
14	R	F	V	0,373		
15	R	G	V	0,374		
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						

4.5.c

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Variable_A	Variable_a	Variable_B	Variable_b	Variable_C	Variable_c	Variable_D	Variable_d	Variable_E	Variable_e
2	0,15630359	0,1844249	0,1563036	0,181366	0,1563036	0,1821347	0,15630359	0,1509434	0,1563036	0,1821347
3	0,18213472	0,154894	0,1821347	0,154894	0,1509434	0,181366	0,18213472	0,181366	0,1509434	0,181366
4	0,1509434	0,1894485	0,1509434	0,1894485	0,1844249	0,154894	0,18944849	0,1844249	0,154894	0,1844249
5	0,18136604	0,1562341	0,1844249	0,1562341	0,1894485	0,1562341	0,15623413	0,154894	0,1562341	0,1894485
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										

4.5.d

	A	B	C	D	E	F
1	Muestra	Muestra_f	Fortificación			
2		0,251	0,351	0,101		
3		0,247				
4		0,258				
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						

4.5.e

Figura 7. Archivo de Excel como deben ser ordenados los datos experimentales.

```

#Cargando librerías a utilizar
#Previamente deben ser instaladas con el comando install.packages("nombre")
#Los comandos echo=false, warning=false, message=false, previenen que el código, mensajes y
#advertencias se impriman en el html, word o pdf, permitiendo visualizar solo los
#resultados o gráficos derivados.
library(readxl)
library(PerformanceAnalytics)
library(ggplot2)
library(grid)
library(dplyr)
library(RColorBrewer)
library(scales)
library(gridExtra)
library(ggthemes)
library(ggpubr)
library(Rcmdr)
library(RcmdrMisc)
library(NADA)
library(factoextra)
library(scales)
library(ggpubr)
library(tidyr)
library(cluster)
library(chemCal)
library(asbio)
library(ggribes)
library(tinytex)
library(knitr)
library(performance)

```

Determinación de parámetros de desempeño relacionados con el modelo de regresión: linealidad, cedasticidad, Ld, Lc e incertidumbre

ESCRIBA AQUÍ UNA BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÓMO SE GENERÓ LA REGRESIÓN

5.1. Determinación de linealidad

#Preparación de los datos

```

nitlinealidad<- read_excel("datavalidacion.xlsx",sheet = "linealidad")
View(nitlinealidad)
####Llamando la data
#convirtiendo las variables características a numéricas
nitlinealidad$Concentracion<-as.numeric(nitlinealidad$Concentracion)
nitlinealidad$Absorbancia<-as.numeric(nitlinealidad$Absorbancia)

regresion<-lm(Absorbancia~Concentracion,nitlinealidad) #### generar el modelo de regresión

summary(regresion) #ver resultados del modelo de regresión

##
## Call:
## lm(formula = Absorbancia ~ Concentracion, data = nitlinealidad)
##
## Residuals:
##   Min     1Q   Median     3Q    Max
## -0.0195519 -0.0033434 -0.0009997  0.0058638  0.0187876
##
## Coefficients:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)

```

```
## (Intercept) 0.001092 0.003874 0.282 0.781
## Concentracion 0.729684 0.008448 86.373 <2e-16 ***
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 0.01 on 18 degrees of freedom
## Multiple R-squared: 0.9976, Adjusted R-squared: 0.9975
## F-statistic: 7460 on 1 and 18 DF, p-value: < 2.2e-16

ggplotRegression <- function (regresion) { ### función para plotear la regresión con los valores estadísticos

  require(ggplot2)

  ggplot(regresion$model, aes_string(x = names(regresion$model)[2], y = names(regresion$model)[1])) +
    geom_point() +
    stat_smooth(method = "lm", col = "blue") +
    scale_y_continuous(labels = scales::number_format(accuracy = 0.001, decimal.mark = '.')) +
    scale_x_continuous(labels = scales::number_format(accuracy = 0.0001, decimal.mark = '.')) +
    labs(title = "Regresión lineal: validación del método espectrofotométrico",
         x = "Concentración (mg/L)", y = "Absorbancia (UA)",
         subtitle = paste("Pendiente =", signif(regresion$coef[[2]], 4),
                          "Intercepto =", signif(regresion$coef[[1]], 4),
                          "r2 =", signif(summary(regresion)$adj.r.squared, 4),
                          "p valor =", signif(summary(regresion)$coef[2,4], 3)))
  }

plotlinealidad <- ggplotRegression(lm(Absorbancia~Concentracion, data = nitlinealidad)) ### ploteo con la función
plotlinealidad
```

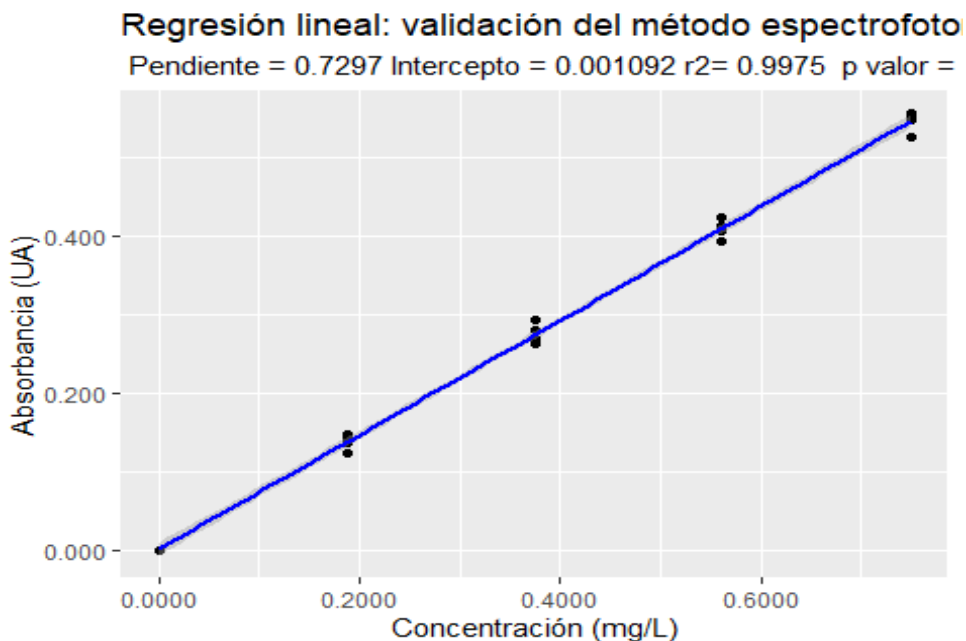


Figura 8. Regresión lineal de la validación del método espectrofotométrico de nitritos

5.2. Análisis de residuales para comprobación de supuestos estadísticos

Aleatoriedad de residuales

```
plot(regresion$residuals) #gráfico de los residuales
```

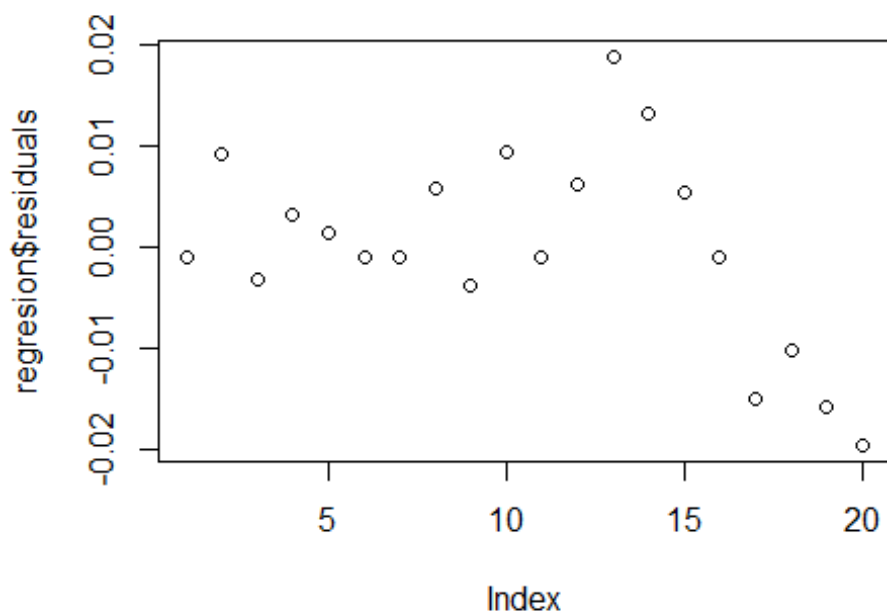


Figura 9. Gráfico de errores residuales del método de validación de nitritos.

Sumatoria cercana a cero

```
sum(regresion$residuals) # valor de la sumatoria de residuales
```

```
## [1] -3.686287e-18
```

Comprobación de la normalidad de los residuales mediante prueba Shapiro-Wilk.

```
shapiro.test(regresion$residuals) ### comprobaci?n de la normalidad de residuales
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: regresion$residuals
## W = 0.96462, p-value = 0.6396
```

5.3. Determinación de la cedasticidad

ESCRIBA AQUÍ UNA BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÓMO SE GENERÓ LA PRUEBA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CEDASTICIDAD

```
### convierte al patrón como un factor
nitlinealidad$Patron<-as.factor(nitlinealidad$Patron)
### elimina los blancos para el análisis de cedasticidad
```

```

cedasticidad<-nitlinealidad %>% filter(Absorbancia > 0.01)
bartlett.test(Absorbancia~Patron,cedasticidad) ### prueba Bartlett,

##
## Bartlett test of homogeneity of variances
##
## data: Absorbancia by Patron
## Bartlett's K-squared = 0.10485, df = 3, p-value = 0.9912

plotcedasticidad<- ggplot(data = cedasticidad, aes(x = Patron, y = Absorbancia, colour = Patron)) + ### gr?fi
  co de cajas para observar la distribuci?n de los valores de absorbancia
  geom_boxplot(width=0.50) +geom_jitter(width=0.20, size=1)+theme(legend.position = "none")+
  scale_y_continuous(labels = scales::number_format(accuracy = 0.001,decimal.mark = '.'))+
  labs(title = "Dispersión de los datos de absorbancia en los niveles calibración",
        x= "Nivel de concentración para la calibración", y="Absorbancia (UA)")
plotcedasticidad

```

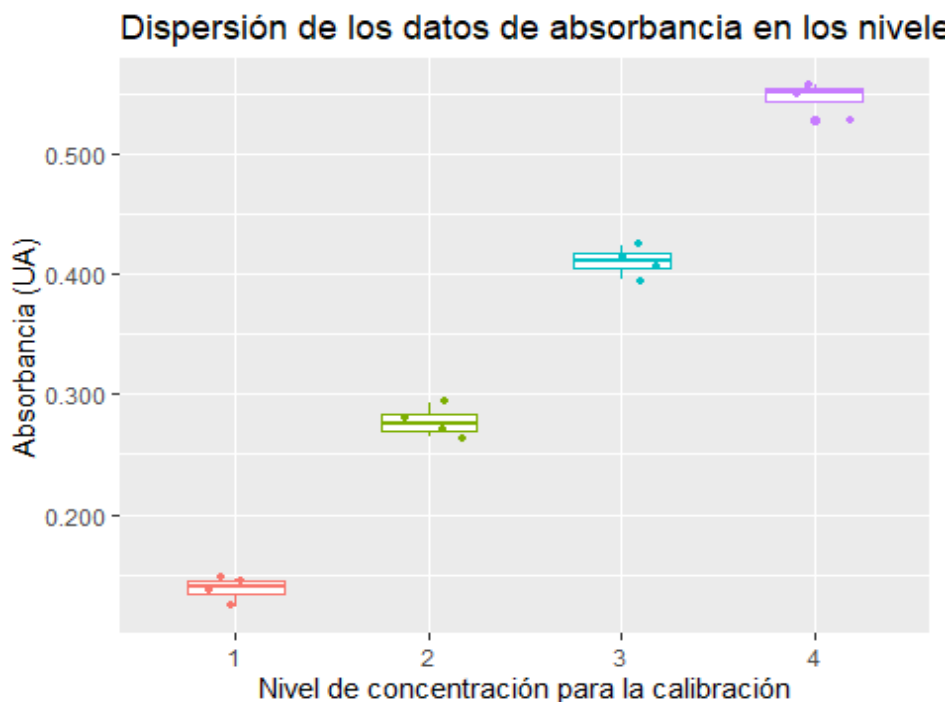


Figura 10. Dispersión de los datos de absorbancia en los diferentes niveles.

5.4. Determinación de la incertidumbre por regresión lineal

ESCRIBA AQUÍ UNA BREVE INTRODUCCIÓN DE CÓMO SE GENERÓ LA DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

```

muestra<-c(0.300,0.310,0.315, 0.308, 0.299, 0.303, 0.304) ##asigna las absorbancias de una muestra
U<-inverse.predict(regresion,muestra,alpha = 0.05) ### determina la concentración, error
#estándar, IC y los límites de la predicción

Ucal<-round(U$`Confidence`,digits=3)
Ucal #incertidumbre al 95% de confianza

## [1] 0.013

```

5.5. Determinación de los límites de detección y cuantificación

ESCRIBA AQUÍ UNA BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÓMO SE DETERMINARON LOS LÍMITES

```
LoD<- round(((summary(regresion)$coef[[3])*3.3)/(signif(regresion$coef[[2]], 4)), digits=3)
LoQ <- round(((summary(regresion)$coef[[3])*10)/(signif(regresion$coef[[2]], 4)), digits=3)
```

LoD

```
## [1] 0.018
```

LoQ

```
## [1] 0.053
```

Determinación de repetibilidad y precisión intermedia

ESCRIBA AQUÍ UNA BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÓMO SE GENERÓ LA DETERMINACIÓN DE LA REPETIBILIDAD

Estadística descriptiva de los resultados

#Preparación de los datos

```
nitpres<- read_excel("datavalidacion.xlsx",sheet = "presicion")
```

#Convirtiendo las variables en factores

```
nitpres$Estudiante<-as.factor(nitpres$Estudiante)
```

```
descriptiva<-numSummary(nitpres[, c("Concentracion"), drop = FALSE],
  groups = nitpres$Estudiante, statistics = c("mean", "sd", "IQR", "quantiles"),
  quantiles = c(0, 0.25, 0.5, 0.75, 1)) ### la funci?n numSummary corresponde al paquete RcmdrMisc
```

descriptiva

```
##   mean      sd    IQR   0%   25%   50%   75%
## D 0.3695071 0.009865409 0.01182050 0.3595977 0.3621920 0.3668878 0.3740125
## R 0.3788733 0.013366759 0.01795393 0.3602549 0.3711583 0.3735909 0.3891122
##   100% Concentracion:n
## D 0.3876554      7
## R 0.3977262      7
```

5.6. Repetibilidad para cada estudiante

5.6.1. Determinación del coeficiente de variación

```
CV_E1<-(descriptiva$table[1,2]/descriptiva$table[1,1])*100
CV_E1
```

```
## [1] 2.669883
```

```
CV_E2<-(descriptiva$table[2,2]/descriptiva$table[2,1])*100
CV_E2
```

```
## [1] 3.528029
```

5.6.2. Precisión intermedia

Determinación de igualdad de varianzas por parte de ambos estudiantes

1.Análisis visual

```
plotpres<-ggplot(data = nitpres, aes(x = Estudiante, y = Concentracion, colour = Estudiante)) +
  geom_boxplot(aes(),width=0.3) +geom_jitter(aes(shape=Estudiante),width=0.1,size=2) +
  scale_y_continuous(labels = scales::number_format(accuracy = 0.001,decimal.mark = '.'))+
  labs(title = "Dispersión de los datos de concentración",
        subtitle= "Factor de evaluación de la precisión intermedia: Estudiante", y="Concentración (mg/L)")+
  theme(legend.position = "none")
plotpresi ## grÁfico de cajas para visulaizar la dispersiÓN de los datos de cada estudiante
```

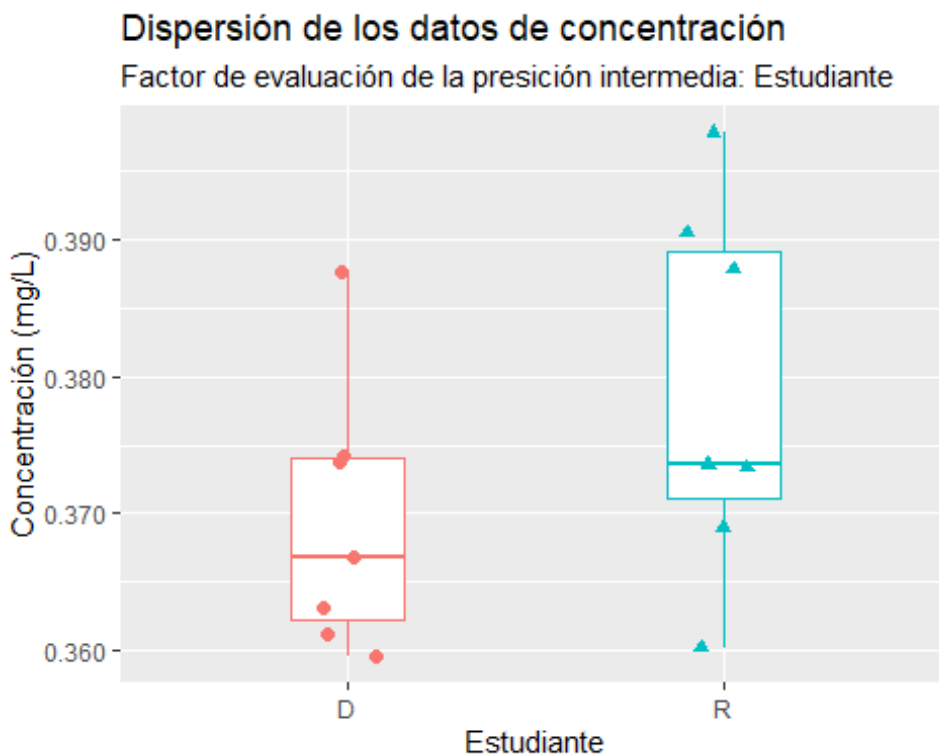


Figura 11. Dispersión de datos de concentración entre estudiantes para el método de validación de nitritos.

5.6.3. Prueba de Homogeneidad de varianzas

```
est1<-nitpres %>% filter(Estudiante == "D")#filtrado de los datos por estudiante
est2<-nitpres %>% filter(Estudiante == "R")

shapiro.test(est1$Concentracion)### prueba de normalidad para los valores de concnetraci?n

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: est1$Concentracion
## W = 0.89915, p-value = 0.3259

shapiro.test(est2$Concentracion)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
```

```
## data: est2$Concentracion
## W = 0.94907, p-value = 0.7212

var.test(x = est1$Concentracion,y = est2$Concentracion)## prueba F para probar varianzas

##
## F test to compare two variances
##
## data: est1$Concentracion and est2$Concentracion
## F = 0.54473, num df = 6, denom df = 6, p-value = 0.4786
## alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
## 95 percent confidence interval:
## 0.09359941 3.17017147
## sample estimates:
## ratio of variances
## 0.5447258

### La prueba F es muy potente para discriminar varianzas significativamente distintas, sin embargo
###posee la limitante que se supone que los datos deben de provenir de una población normal

leveneTest(y = nitpres$Concentracion, group = nitpres$Estudiante, center = "mean")

## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "mean")
## Df F value Pr(>F)
## group 1 1.4491 0.2519
## 12

### esta función corresponde al paquete car, la prueba de Levene, presenta varias ventajas
#permite comparar 2 o más poblaciones,permite elegir entre diversos estadísticos (mediana,
#media o media truncada) y además no requiere que los datos sean normales como si lo
#es para el caso de la prueba F de Fisher.

##Según los resultados de cualesquiera de las dos pruebas, se observa que no existe diferencia
#estadísticamente significativa en las varianzas de ambos estudiantes, con esto se
#valida la precisión intermedia.

### esta prueba se puede repetir cambiando el factor (Grupo por ejemplo)
```

5.7. Comprobación de igualdad de medias

El análisis puede complementarse con una prueba t student para analizar si hay diferencia significativa en el valor medio obtenido por ambos estudiantes

```
### Diferencia de medias
t.test(est1$Concentracion,est2$Concentracion,mu=0,paired=FALSE,var.equal=TRUE)

##
## Two Sample t-test
##
## data: est1$Concentracion and est2$Concentracion
## t = -1.4916, df = 12, p-value = 0.1616
## alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
## -0.023047306 0.004315001
## sample estimates:
## mean of x mean of y
## 0.3695071 0.3788733

## Otra prueba complementaria importante es determinar si existe diferencia estadísticamente
#significativa entre las medias. Para ello se aplica la prueba tstudent (revisar práctica 2).
```

5.8. Determinación de la Veracidad

ESCRIBA AQUÍ UNA BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÓMO SE GENERÓ LA DETERMINACIÓN

Contraste del valor medio obtenido contra el valor de referencia aportado por el MRC

```
t.test(est1$Concentracion,mu=0.370,alternative = "less")
```

```
##
## One Sample t-test
##
## data: est1$Concentracion
## t = -0.13218, df = 6, p-value = 0.4496
## alternative hypothesis: true mean is less than 0.37
## 95 percent confidence interval:
##   -Inf 0.3767528
## sample estimates:
## mean of x
## 0.3695071
```

*#Se realiza una prueba de una cola, el estudiante 1 obtuvo una media de 0.369.
#Hipótesis nula: la media del estudiantes 1 es igual a 0.370 (valor del MRC)
#hipótesis alterna: La media del estudiante 1 es menor a 0.370*

```
t.test(est2$Concentracion,mu=0.370,alternative = "greater")
```

```
##
## One Sample t-test
##
## data: est2$Concentracion
## t = 1.7563, df = 6, p-value = 0.06478
## alternative hypothesis: true mean is greater than 0.37
## 95 percent confidence interval:
## 0.369056   Inf
## sample estimates:
## mean of x
## 0.3788733
```

*#Se realiza una prueba de una cola, el estudiante 2 tuvo una media igual a 0.378
#Hipótesis nula: la media del estudiantes 1 es igual a 0.370 (valor del MRC)
#Hipótesis alterna: La media del estudiante 1 es MAYOR a 0.370.*

NOTA: probar que la media no difiere del MRC es solo una parte de la prueba de veracidad

5.9. Determinación de la Robustez

ESCRIBA AQUÍ UNA BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÓMO SE GENERÓ LA DETERMINACIÓN

Cálculo de las diferencias entre las variables “normales” y “modificadas”

```
nitrob<- read_excel("datavalidacion.xlsx",sheet = "robustez") ####Llamando la data
```

```
difA<-abs(mean(nitrob$Variable_A)-mean(nitrob$Variable_a))
difB<-abs(mean(nitrob$Variable_B)-mean(nitrob$Variable_b))
difC<-abs(mean(nitrob$Variable_C)-mean(nitrob$Variable_c))
difD<-abs(mean(nitrob$Variable_D)-mean(nitrob$Variable_d))
difE<-abs(mean(nitrob$Variable_E)-mean(nitrob$Variable_e))
```

```
#Creación de un objeto que contiene las diferencias de cada variable
prueba_variables_sensibles<-c(difA,difB,difC,difD,difE)
#Prueba lógica para determinar cual variable es mayor al criterio de aceptación
prueba_variables_sensibles>0.013*sqrt(2)

## [1] FALSE FALSE FALSE FALSE TRUE

#Indica cuál variable es la que presenta sensibilidad
which(prueba_variables_sensibles>0.013*sqrt(2))

## [1] 5
```

5.10. Determinación de la recuperación como estimador de la especificidad

ESCRIBA AQUÍ UNA BREVE INTRODUCCIÓN SOBRE CÓMO SE GENERÓ LA DETERMINACIÓN

```
###Llamando la data
nitesp<- read_excel("datavalidacion.xlsx",sheet = "especificidad")

#####Cálculo de la recuperación
recuperacion<-((abs((mean(nitesp$Muestra))-
(nitesp$Muestra_f))/nitesp$Fortificacion)*100)

###Prueba lógica para el rango aceptado de recuperación
recuperacion>90&recuperacion<110

## [1] TRUE NA NA
```

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

Este experimento consta de 3 partes, cada una de 4 horas (12 horas). La primera parte consiste en los incisos 4.5.a y 4.5.b, la segunda parte corresponde al inciso 4.5.c y la tercer corresponde a los incisos 4.5.d y 4.5.e.



7. Bibliografía especializada

- Alvarez-Prieto, M., Jiménez-Chacón, J. A fitness for purpose approach to validation and verification of analytical measurements. *Accred Qual Assur* **23**, 219–229 (2018) doi:10.1007/s00769-018-1331-y
- Barwick, V., Ellison, S.L.R., Gjengedal, E. et al. *Accred Qual Assur* (2017) 22: 253. doi: 10.1007/s00769-017-1286-4
- Brereton, R.G., Jansen, J., Lopes, J. et al. Chemometrics in analytical chemistry—part I: history, experimental design and data analysis tools. *Anal Bioanal Chem* 409, 5891–5899 (2017) doi:10.1007/s00216-017-0517-1
- Brereton, R.G., Jansen, J., Lopes, J. et al. Chemometrics in analytical chemistry—part II: modeling, validation, and applications. *Anal Bioanal Chem* 410, 6691–6704 (2018) doi:10.1007/s00216-018-1283-4
- De Bièvre, P., & Günzler, H. (Eds.). (2005). *Validation in Chemical Measurement*. Springer, Berlin, Heidelberg . doi:10.1007/b138530

- Hadjicostas E. (2004) Validation of analytical methods. In: Wenclawiak B.W., Koch M., Hadjicostas E. (eds) Quality Assurance in Analytical Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-09621-5_12
- Solís-Montiel, E., Fernández-Araya, J.F. 2016. Manual de Laboratorio de Análisis Instrumental. Escuela de Química, Universidad Nacional.
- Wenclawiak B., Hadjicostas E. (2010) Validation of Analytical Methods – to be Fit for the Purpose. In: Wenclawiak B., Koch M., Hadjicostas E. (eds) Quality Assurance in Analytical Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-13609-2_11

8. Gestión de residuos.

Cuadro 5. Gestión de residuos de la práctica de validación de un método analítico.

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas	Nitrito de sodio	6	6	líquido	
Residuos coloreados	Nitrito de sodio	6	4	líquido	
	Reactivo de n-(1-naftil)-etilendiamina	4			
Observaciones	Ninguna				

EXPERIMENTO 4

DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN FERTILIZANTES

1. Contenidos

- 1.1. Estudio de la importancia del fósforo como componente en fertilizantes.
- 1.2. Determinación del fósforo en fertilizantes por el método de cloruro de estaño (II)
- 1.3. Estudio de la técnica espectrofotométrica para análisis de fósforo.
- 1.4. Influencia del tiempo de estabilidad del complejo en el método de análisis.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante deberá tener conocimiento en la técnica espectrofotométrica UV-visible.

3. Introducción

El uso de compuestos fosforados en los suelos es una técnica muy común para proporcionar a las cosechas las cantidades requeridas de este nutriente en los cultivos.

El fósforo en los fertilizantes comerciales de origen mineral (fertilizantes inorgánicos), se presenta generalmente como ortofosfatos de calcio o de amonio, aunque también se puede presentar como metafosfatos y polifosfatos, el cual se fija en el suelo, en su mayor parte, y es asimilado lentamente por las plantas, en forma de iones HPO_4^- .

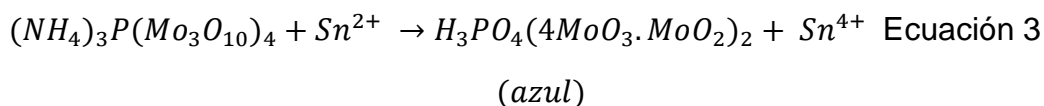
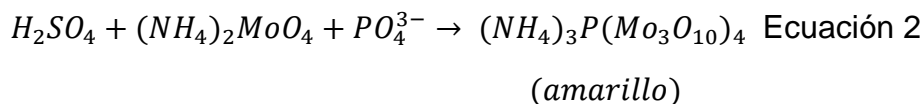
Es importante recalcar que los fertilizantes inorgánicos aportan cantidades relativamente grandes de fósforo, mientras que los fertilizantes orgánicos presentan menores cantidades de este elemento. Sin embargo, dado que el fósforo se puede presentar en forma de compuestos orgánicos, un método de digestión para determinar fósforo total debe ser capaz de oxidar la materia orgánica y/o hidrolizar todos los compuestos hasta formar ortofosfatos.

Los fosfatos que responden a las pruebas colorimétricas sin hidrólisis preliminar o digestión oxidativa de la muestra se denominan "fósforo reactivo", mientras que al realizar una digestión en medio ácido se convierten los fosfatos condensados, tales como piro-, tripoli- y especies de mayor peso molecular, tal como los hexametafosfatos, en ortofosfatos.

Para la determinación del fósforo, existen varios métodos colorimétricos los cuales son utilizados de acuerdo con la concentración que presente la muestra y otros factores de carácter técnico. En el caso del método de cloruro de estaño se pueden

realizar mediciones para soluciones con concentraciones de fósforo de 3 µg P/L, mientras que el método de ácido vanadomolibdofosfórico se adapta a soluciones que contengan 200 µg P/L.

El método utilizado en esta práctica será el de azul de molibdeno, donde se hace uso de cloruro de estaño (II) como agente reductor. En el método analítico, primero se ajusta el pH de la muestra con disolución fuertemente ácida hasta el cambio de la fenoftaleína y luego se añade la disolución de molibdato de amonio que da lugar a la formación del complejo amarillo de ácido fosfomolibdico (ecuación 2). Este complejo se reduce con disolución de cloruro de estaño (II) obteniéndose una disolución de color azul (ecuación 3), La intensidad del color es la base para la medición espectrofotométrica del elemento que constituye el átomo central del complejo, a una longitud de onda de 690 nm.



El tiempo de estabilidad del complejo es una variable importante en el método, por lo que debe controlarse apropiadamente. Se estima que el tiempo en el cual el complejo brinda mediciones cuantitativas oscila entre los 8 y 15 minutos

Los arseniatos, fosfatos, silicatos y algunos otros iones reaccionan con el molibdato para formar complejos como el ácido molibdofosfato de amonio y ácido molibdosilícico.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Agua desionizada
- Disolución patrón de trabajo de P- PO_4^{3-} (5 mg/L)
- Molibdato de amonio (2,5% m/v)
- Disolución fuertemente ácida: 30% v/v H_2SO_4 y 0,4% v/v HNO_3
- Ácido clorhídrico concentrado
- Fenolftaleína (0,5% m/v)
- Cloruro de estaño en glicerina (2,5% m/v)
- Muestra incógnita

4.2. Materiales

4.3. Instrumentación requerida

- Balanza analítica con una exactitud de 0,0001 g.
- Cronómetro
- Plantilla de calentamiento.
- Pipetas de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 y 10,00 mL
- Balones aforados de 100,00 mL.
- Balones aforados de 250,00 mL.
- Beaker de 50,0 mL
- Gotero
- Bureta 50,00 mL
- Probeta 10,00 mL
- Pistilo y mortero.

4.4. Muestras para análisis

Muestra incógnita de fertilizante.

4.5. Procedimiento

4.5.1. Preparación de la curva de calibración de fósforo.

1. Mida alícuotas de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 y 10,00 mL de disolución patrón de fósforo de 5,00 mg/L de $P - PO_4^{3-}$ y deposítelas en balones aforados de 100 mL. Añada 25 mL de agua desionizada.
2. Añada a cada balón aforado 2 gotas de fenolftaleína al 1%. Si la disolución se torna rosada, añada gota a gota disolución fuertemente acida hasta la desaparición del color.
3. Añada 4,00 mL de disolución de molibdato de amonio al 2,5% y agite la disolución. Posteriormente agregue 0,50 mL de la disolución de cloruro de estaño (II) al 2,5% y agite. Complete con agua desionizada a la marca de aforo.
4. Mida la absorbancia de cada disolución a 690 nm después de 8 minutos de haber generado el color azul. La medición no debe demorarse más de 15 minutos a partir del momento en que se desarrolló el color.

4.5.2. Análisis de fósforo soluble en un fertilizante

1. Homogenice la mezcla usando un pistilo y un mortero.
2. Mida en una balanza analítica, la masa del fertilizante que recomiende su profesor de laboratorio (0,25 g). Si se trata de un fertilizante líquido consulte a su profesor.
3. Añada a la muestra 5,00 mL de agua desionizada, 2,00 mL de HCl y 2,00 mL de HNO_3 concentrado.
4. Caliente cuidadosamente en una plantilla, dentro de una capilla de extracción de gases hasta la disolución de la muestra. Agite y trasvase cuantitativamente el contenido a un balón de 250,00 mL. Afore con agua desionizada. Esta disolución será conocida como disolución A.
5. De la disolución A, tome una alícuota de 5,00 mL, deposítela en un balón aforado de 100,00 mL y complete con agua desionizada, esta será la disolución B.
6. De la disolución B, tome por triplicado, alícuotas de 5,00 mL y deposítelas en balones aforados de 100,00 mL.
7. Añada a continuación 25,00 mL de agua desionizada.
8. Continúe con el procedimiento descrito para la generación de color desde el punto 3 relativo a la preparación de la curva de calibración.

Nota

1. Dependiendo del tipo de fertilizante las disoluciones pueden variar tanto en alícuota como los volúmenes a considerar.
2. No lave la cristalería con detergente que contenga fosfatos. En su lugar, use una solución al 2% o 5% en KOH, ácido nítrico o clorhídrico al 5% para limpieza de la misma.

5. Tratamiento de datos

1. Grafique la curva de calibración en términos de $P - \text{PO}_4^{3-}$.
2. A partir de la curva de calibración determine el porcentaje del fósforo presente en la muestra expresándolo como porcentaje de P y P_2O_5 . Evalúe la incertidumbre y la desviación estándar del resultado

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento




El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 4 horas.

7. Bibliografía especializada

- APHA. 2005. Standard Methods for Examination of Water & Wastewater; 21 edition. Port City Press, United States of America.
- Carrillo, C., Arvelo, C., Ruiz, M., Sánchez, A., Escalona, J., Castillo, L., Arteaga, E. Túa, M., Gutiérrez, R., Gamboa, O., Arrieché, I., Díaz, T. Sosa, F. 1999. Selección de un método para analizar fósforo total en fertilizantes inorgánicos. *Venezuelos*, 34 Vol. 7, Nº 1 y 2, pp 33-37
- de Castro, R. C.; de Melo Benites, V.; César Teixeira, P.; dos Anjos, M. J.; de Oliveira, L. F. Phosphorus Migration Analysis Using Synchrotron Radiation in Soil Treated with Brazilian Granular Fertilizers. *Appl. Radiat. Isot.* 2015, 105, 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2015.08.036>.
- Krüger, O.; Adam, C. Phosphorus in Recycling Fertilizers - Analytical Challenges. *Environ. Res.* 2017, 155 (February), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.02.034>.
- Sha, W., Niu, P., Zhen, C. et al. Analysis of Phosphorus in Fertilizer Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *J Appl Spectrosc* 85, 653–658 (2018). <https://doi-org.una.idm.oclc.org/10.1007/s10812-018-0700-y>
- Skoog, D. A., Holler J. y Crouch, S. 2008. Principios de análisis instrumental, 6 edición. Cengage Learning Editores, México.
- Solís-Montiel, E., Fernández-Araya, J.F. 2016. Manual de Laboratorio de Análisis Instrumental. Escuela de Química, Universidad Nacional.

8. Gestión de residuos.

Cuadro 6. Gestión de residuos de la práctica de determinación de fósforo en fertilizantes.

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas	fosfato diácido de potasio / fertilizantes	6	5	líquido	
	ácido nítrico	5			
	ácido clorhídrico	5			
Residuos coloreados	molibdato de amonio (2,5%)	5	5	líquido	
	ácido nítrico	5			
	ácido clorhídrico	6			
	Indicador de fenolftaleína	4*			
	Cloruro de estaño en glicerina	3*			
Residuos de incógnitas	**Disolución de fertilizantes	6	6	líquido	
Observaciones	<p>*Ni el indicador de fenolftaleína ni el cloruro de estaño se consideran para el número de prioridad de mezcla debido al pequeño volumen utilizado. ** Proceda a disolver las sales de fertilizante que componen la incógnita con agua desionizada y proceda a desechar como lo indica este tipo de residuos.</p>				

EXPERIMENTO 5

DETERMINACIÓN DE QUININA EN AGUA QUINADA

1. Contenidos

- 1.1. Identificar las características que presenta una molécula que emite radiación fluorescente.
- 1.2. Conocer los diferentes tipos de relajación en fluorescencia y fosforescencia.
- 1.3. Enumerar las ventajas y desventajas de la técnica fluorométrica.
- 1.4. Conocer los procesos de desactivación que afectan a la fluorescencia.
- 1.5. Identificar las partes que componen un sistema fluorométrico y espectrofluorométrico.
- 1.6. Conocer las variables que afectan la fluorescencia.
- 1.7. Identificar los ámbitos de concentración detectables con la técnica fluorométrica.
- 1.8. Conocer algunas aplicaciones analíticas de la técnica de fluorescencia molecular.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante debe tener conocimiento en el uso de la balanza analítica, pipetas aforadas y micropipetas, así como, conocimiento en la preparación de disoluciones, en la elaboración de curvas de calibración y sobre los principios de la técnica de fluorescencia.

3. Introducción

Muchos sistemas son fotoluminiscentes, es decir, pueden ser excitados por radiación electromagnética y en consecuencia emiten radiación de la misma longitud de onda o una longitud de onda mayor.

Las manifestaciones más comunes son la fluorescencia y la fosforescencia, ambas son generadas por mecanismos diferentes.

La fluorescencia consiste en la emisión de radiación por una molécula que ha absorbido energía radiante. Al absorber energía una molécula que tiene sus electrones en el estado fundamental, éstos pasan a un estado energético más alto y como consecuencia deben perder el exceso de energía para regresar a su estado basal o fundamental. El tiempo de relajación en el fenómeno de fluorescencia es del orden de 10^{-9} a 10^{-7} segundos y la fosforescencia del orden de 10^{-4} a 10 segundos.

El diagrama de Jablonski (figura 12), permite visualizar los procesos de una molécula asociados a la irradiación con luz: absorción fotónica y excitación del estado fundamental (S_0) a un nivel energético electrónico, vibracional o rotacional superior (S^*), y recuperación del estado fundamental S_0 a través de diferentes

estados electrónicos singlete S_1 y/o triplete T_1 , con emisión de fluorescencia o fosforescencia.

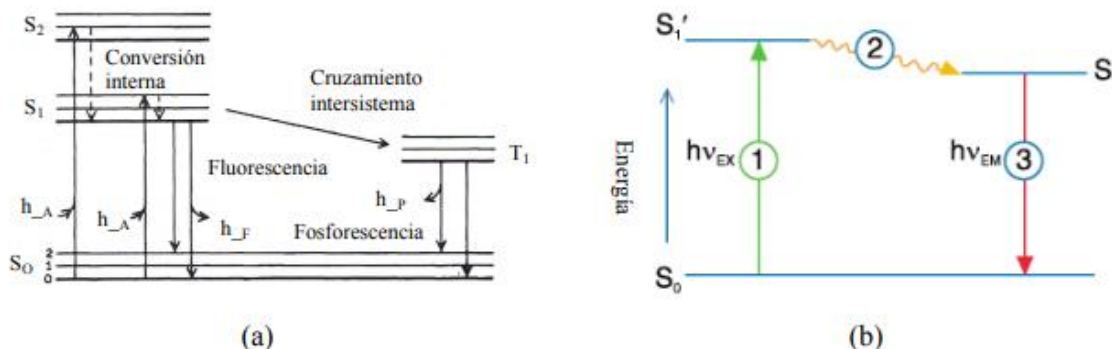


Figura 12. Diagrama de Jablonski. Los estados basales, primer excitado singlet y segundo excitado singlet se representan con S_0 , S_1 y S_2 , respectivamente. Las transiciones entre los estados se dibujan como líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción de la luz. (a) Las líneas horizontales numeradas denotan los niveles vibracionales. (b). 1: Excitación; 2: Conversión interna; 3: Emisión por fluorescencia.

Cuando uno de un par de electrones de una molécula es excitado y pasa a un nivel de energía superior, se forma un estado denominado singlete o triplete. En el estado singlete excitado el spin del electrón en el estado de mayor energía continúa apareado con el electrón del estado fundamental. En el estado triplete los espines de los dos electrones se han desapareado y por tanto son paralelos (figura 13). El estado triplete excitado es menos energético que el correspondiente estado singlete excitado.

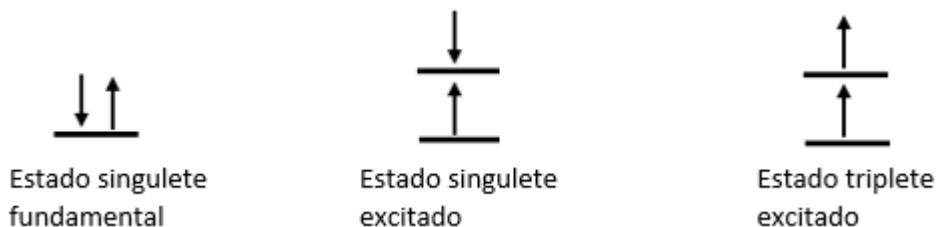


Figura 13. Comportamiento de los electrones excitados en su emisión fluorescente y fosforescente.

La medición de las intensidades de la fluorescencia permite cuantificar cantidades traza de muchas especies orgánicas e inorgánicas. En lo referente a la sensibilidad, vale la pena decir que los límites inferiores suelen ser 10 veces menores que los de los métodos de absorción molecular, lo que es igual a hablar de partes por billón, no obstante, debido al limitado número de sistemas químicos que fluorescen, esta técnica no ha tenido la relevancia de otros métodos de absorción.

A pesar de lo anterior, existen muchas aplicaciones de la técnica fluorométrica, las cuales van desde la determinación analítica de trazas de metales en el ambiente hasta el estudio de procesos físicos fundamentales de moléculas; relaciones

estructura-función e interacciones de biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos; secuenciación de ADN y caracterización genómica.

En el campo de la hidrología se utiliza esta técnica para dar seguimiento y cuantificación a los trazadores fluorescentes -cualquier sustancia que se incorpora a la masa de un determinado producto o matriz, con el fin de estudiar su comportamiento en un proceso físico o químico-, que se usan para estudiar el comportamiento del agua durante alguna fase del ciclo hidrológico o en problemas concretos derivados de su uso, aprovechamiento y medida de caudal en los ríos turbulentos, los trazadores más utilizados en este campo son la uranina (fluoresceína sódica), eosina, piranina, sulforodamina y rodamina.

El fluoroinmunoanálisis, es una aplicación que consiste en identificar especies biológicas con marcadores fluorescentes, principalmente para uso clínico, en donde se colocan etiquetas luminiscentes que por sí solas no brillan, pero que, al acoplarse químicamente con un anticuerpo asociado a una biomolécula u organismo, responde con luminiscencia cuando se ilumina con luz ultravioleta indicando la presencia de la biomolécula u organismo deseado.

La fluorescencia puede verse afectada por variables como el pH, la temperatura, el tipo de solvente, el oxígeno disuelto, la rigidez estructural, la estructura en sí y el rendimiento cuántico.

3.1 Instrumentación. Partes importantes de un espectrofluorómetro.

Los componentes de un fluorómetro son semejantes al que muestra la figura 14, a diferencia de que están presentes filtros de excitación y de emisión en lugar de los sistemas monocromadores de excitación y de emisión, propio de los espectrofotómetros.

Fuente de radiación.

La lámpara más común para los fluorómetros es la de arco de mercurio de baja presión con ventana de sílice fundida. La fuente emite radiación muy útil para producir excitación a 254, 302, 313, 546, 578, 681 y 773 nm. Dichas líneas se aíslan usando filtros de interferencia o de absorción. Para los espectrofluorómetros la fuente de radiación continua que normalmente se usa es de xenón. Este espectro es continuo entre 300 y 1300 nm.

Filtros y monocromadores.

En el caso de los fluorómetros se usan filtros para aislar la longitud de onda de excitación o de emisión fluorescente. En el caso de los espectrofluorómetros, las longitudes de onda son seleccionadas de manera más precisa mediante dos sistemas monocromadores tipo red de difracción, uno para la excitación y el otro para la emisión fluorescente.

Detectores.

Los detectores más comúnmente usados son los tubos fotomultiplicadores, diodos en serie y de transferencia de carga. La sensibilidad de los fotomultiplicadores es determinada por la corriente oscura y este efecto puede ser minimizado por un sistema de enfriamiento, ya que la corriente oscura se genera por activación térmica. Asimismo, la respuesta espectral de los fotomultiplicadores depende de la longitud de onda del análisis.

Celdas o cubetas.

Se usan celdas cilíndricas, rectangulares de vidrio o de sílice, dependiendo de la región en que deben emitir la radiación. Debe evitarse dejar huellas dactilares en las celdas, ya que la grasa de la piel con frecuencia flúorese.

Espectro de excitación: se obtiene midiendo la emisión fluorescente a una longitud de onda fija, mientras se varía la longitud de onda de excitación.

Espectro de emisión: se obtiene manteniendo la longitud de onda de excitación constante, mientras se hace un barrido de las longitudes de onda de emisión.

Espectros sincrónicos: se obtienen realizando barridos simultáneos de ambos sistemas monocromadores, por cada longitud de onda de excitación, se mide la intensidad de radiación en todas las longitudes de onda de emisión, lo anterior permite construir lo que se denomina como matrices de excitación-emisión, las cuales brindan información relevante para la comprensión de la composición de mezclas fluorescentes.

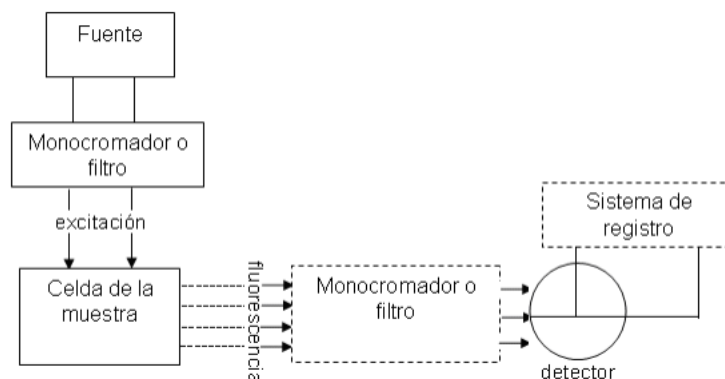


Figura 14. Componentes básicos de un espectrofluorómetro.

En este experimento se determinará la quinina (figura 15) presente en una muestra de agua quinada y en una muestra incógnita en disolución ácida, a una longitud de onda de excitación de (250 a 350) nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.

A su vez se evaluará el efecto que posee el pH y el apagado con bromuro de sodio en la intensidad de fluorescencia.

Para el desarrollo de la práctica se deberá considerar que la intensidad de fluorescencia de la quinina no varía en un intervalo de concentraciones en ácido sulfúrico de 0,01 a 0,2 eq/L.

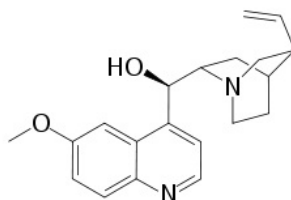


Figura 15. Estructura de la quinina

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

Disolución madre de quinina de 100 µg/mL.

Mida en una balanza analítica 120,70 mg de sulfato de quinina ($C_{20}H_{24}N_2O_6S$ (MM422,50) o 100 mg de quinina ($C_{20}H_{24}N_2O_2$ (MM324,41) pK1: 5,07 pK2: 9,7). Disuélvalos en 50 mL de agua destilada y deposítelos en un balón aforado de 1000 mL. Se añade 50 mL de disolución 1 M de ácido sulfúrico y se diluye a la marca de aforo con agua desionizada. Proteja de la luz.

Disolución de 10,0 µg/mL de quinina.

Mida una alícuota de 10 mL de disolución madre de quinina y diluya a 100 mL en un balón aforado con solución de 0,05 M de ácido sulfúrico.

Disolución 1,0 µg/mL de quinina.

Mida una alícuota de 1 mL de disolución de 100 µg/mL, deposítela en un balón aforado de 100 mL y complete a marca de aforo con solución de 0,05 M de ácido sulfúrico.

Disolución de 0,05 M de NaBr.

Disolución amortiguadora de pH 2,0, 4,0 y 7,0.

4.2. Materiales

- Micropipeta
- Pipetas aforadas de 1, 2, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25 mL
- Balones aforados de 50 y 250 mL

4.3. Instrumentación requerida

- Balanza analítica
- Espectrofluorómetro

4.4. Muestras para análisis

- Agua quinada

4.5. Procedimiento

4.5.1. Curva de calibración.

Mida una alícuota de 5, 10, 15, 20 y 25 mL de la disolución patrón de quinina de 1 $\mu\text{g/mL}$, deposítelas en balones aforados de 50 mL y diluya a línea de aforo con disolución de ácido sulfúrico 0,05 M.

4.5.2. Preparación de la incógnita.

Mida una alícuota de 5 mL del vial y deposítelo en balón aforado de 50 mL. Afore con disolución de ácido sulfúrico 0,05 M. Realice la muestra por triplicado. Lleve a la par un blanco reactivo.

4.5.3. Dilución recomendada para el agua quinada.

Cada estudiante llevará una botella de agua quinada.

Mida una única alícuota de 2 mL de agua quinada y deposítelos en un balón de 250 mL. De esta disolución mida 15 mL y diluya en 50 mL. En cada caso afore con disolución de ácido sulfúrico 0,05 M.

Lea en un espectrofluorómetro y siguiendo las indicaciones del fabricante del instrumento, la intensidad de cada patrón de calibración, así como de las repeticiones de la muestra.

4.5.4. Dependencia de la fluorescencia de la quinina respecto al pH.

1. Tome 4 alícuotas de 15 mL de disolución 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de quinina y deposítelos en sus respectivos balones aforados de 50 mL debidamente rotulados.
2. Adicione al primer balón y hasta su marca de aforo, disolución amortiguadora de pH 2, al segundo disolución de pH 4, al tercero disolución de pH 7 y al cuarto disolución de pH 9.
3. Lea la intensidad de fluorescencia de las disoluciones de quinina y anote sus observaciones.
4. Prepare un gráfico de intensidad de fluorescencia contra pH y calcule la concentración de quinina resultante para cada valor de pH utilizado.

4.5.5. Dependencia de la intensidad de fluorescencia con el efecto de supresión o apagado por el bromuro de sodio (quenching).

1. Tome 4 alícuotas de 15 mL de disolución de 0,1 µg/mL de quinina y deposítelos en los respectivos balones aforados de 50 mL, debidamente rotulados.
2. Adicione al primer balón 1 mL de NaBr 0,05 M y complete a marca de aforo con disolución de ácido sulfúrico 0,05 M.
3. Al segundo balón añada 2,0 mL de disolución 0,05 M de NaBr, 4 mL al tercero y 6 mL al cuarto. En cada caso afore los balones con disolución de ácido sulfúrico 0,05 M. Calcule la concentración molar en términos de NaBr.
4. Mida la intensidad de fluorescencia relativa de las disoluciones.
5. Prepare un gráfico de intensidad de fluorescencia contra el efecto de apagado por la concentración de la disolución de NaBr 0,05 M. Considere como primer punto la intensidad de la fluorescencia del patrón de 0,300 mg/L de la curva de calibración.

5. Tratamiento de datos

1. Construya la curva de calibración graficando la intensidad (I) contra la concentración de quinina y sulfato de quinina en mg/L o µg/L.
2. Determine la concentración de la muestra en mg/L como quinina y sulfato de quinina.
3. Evalúe la influencia del NaBr en la concentración del patrón de quinina usado.
4. Evalúe la influencia del pH en la concentración del patrón de quinina usado.
5. Para la incógnita, calcule la incertidumbre del resultado y la precisión en % RSD.

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 4 horas.


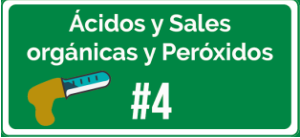
7. Bibliografía especializada

- Christian, G. D. Química Analítica. 6ta. Edición. McGraw Hill; México, 2009.
- El-Shahawi, M. S.; Al-Saidi, H. M.; Bashammakh, A. S.; Al-Sibaai, A. A.; Abdelfadeel, M. A. Spectrofluorometric Determination and Chemical Speciation of Trace Concentrations of Chromium (III & VI) Species in Water Using the Ion Pairing Reagent Tetraphenyl-Phosphonium Bromide. *Talanta* 2011, 84 (1), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.12.039>.
- Fuentes, A. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Segunda Edición. Editorial Reverté, Barcelona, 2001.
- Kolthoff, I. M.; Elving, P. J. and Sandell, E. Treatise on Analytical Chemistry. Part I, Vol 5, Interscience Publishers, New York, 1964.

- Kursheva, A. V.; Litvinenko, I. V.; Petrova, V. I.; Galishev, M. A. Spectrofluorometric Studies of the Aromatic Hydrocarbons in the Bottom Sediments and Water Mass of the Western Sector of the Arctic Region. *Oceanology* 2009, 49 (5), 655–662. <https://doi.org/10.1134/S0001437009050063>.
- Meloan, C. E. y Kissler, R. W. Problemas y Experimentos en Análisis Instrumental. 1ra Edición. Editorial Reverté, México, 1973.
- Pino, F. Análisis de elementos traza por espectrofotometría. Primera Edición. Universidad de Sevilla, España 2000.
- Santamaria-Solbes, M. M. Calibración de un espectrofluorímetro multifuncional para la medida y evaluación (visual) de colores fluorescentes. Universidad de Alicante, España, 2010.
- Sawyer, D. T.; Heineman, W. R. and Beebe, J. M. Chemistry Experiments for Instrumental Methods. John Wiley y Sons, New York, 1984.
- Shenk, G. E.; Hahn, R. B. y Hartkopf, A. V. Química Analítica Cuantitativa. CECSA, México. 1984.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Principios de Análisis Instrumental. Sexta Edición. Cengage Learning, México, 2008.
- Skoog, D.; West, D.; Holler F.J. y Crouch, S. R. Fundamentos de Química Analítica. Novena edición. Cengage Learning, México, 2015.
- Willard, H. H.; Merritt, L. L.; Dean, J. A. y Settle, F. A. Métodos Instrumentales de Análisis. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1991.
- Zhou, Y.; Yu, H.; Zhang, L.; Xu, H.; Wu, L.; Sun, J.; Wang, L. A New Spectrofluorometric Method for the Determination of Nicotine Base on the Inclusion Interaction of Methylene Blue and Cucurbit[7]Uril. *Microchim. Acta* 2009, 164 (1–2), 63–68. <https://doi.org/10.1007/s00604-008-0032-3>.

8. Gestión de residuos.

Cuadro 7. Gestión de residuos de la práctica determinación de quinina en agua quinada.

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas y residuos de incógnitas	sulfato de quinina	4	4	líquido	
	ácido sulfúrico	5			
Efecto pH y NaBr	Buffer pH 2	5	4	líquido	
	Buffer pH 4	4			
	Buffer pH 7	6			
	Buffer pH 9	6			
	sulfato de quinina / ácido sulfúrico	4			
	Bromuro de sodio	6			
Observaciones	Si debe desechar bebidas con sulfato de quinina puede colocarlas como residuo ordinario en envases de reciclaje de acuerdo con el recipiente que contiene la bebida.				

SECCIÓN III. ESPECTROSCOPIA ATÓMICA**EXPERIMENTO 6**
DETERMINACIÓN DE CALCIO POR ABSORCIÓN
ATÓMICA**1. Contenidos**

- 1.1. Introducción a la técnica de absorción atómica por llama (AA).
- 1.2. Identificación de las partes fundamentales de un equipo de absorción atómica.
- 1.3. Estudio de interferencias en el análisis de calcio por AA, así como la función de los supresores en el análisis.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante deberá tener conocimiento de la técnica de espectrometría por absorción atómica en llama. Además deberá tener la capacidad de realizar calibración instrumental por estándar externo y preparación de muestras incógnitas.

3. Introducción

La espectrometría de absorción atómica por llama es una técnica que permite la identificación y cuantificación de metales en muestras en disolución. La muestra es aspirada hasta la llama, donde se convierte en un vapor atómico. Los átomos libres y no excitados del metal en estudio se encuentran en los gases de la llama, estos átomos tienen la capacidad de absorber radiación de una fuente externa.

La fuente externa utilizada es una lámpara compuesta del elemento a determinar, el haz de luz que se emite de la lámpara es dirigido a través de la llama, hacia un monocromador y hacia un detector que mide la cantidad de luz absorbida por el elemento proveniente de la muestra atomizada.

Como cada metal tiene su propia longitud de onda de absorción característica, el método es relativamente libre de interferencias espectrales o de radiación y la cantidad de energía a la longitud de onda característica absorbida en la llama es, por tanto, proporcional a la concentración del elemento en la muestra durante un tiempo limitado. Para el análisis de calcio la longitud de onda característica es a 422,7 nm.

Muchos metales pueden determinarse por aspiración directa de la muestra en una llama de aire - acetileno. Sin embargo, existen interferencias químicas que resultan de varios procesos químicos que ocurren durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito. Por ejemplo, en la determinación de calcio

la presencia del fosfato o sulfato, provoca la formación de compuestos con el calcio que son difíciles de volatilizar. Con frecuencia las interferencias causadas por la formación de especies de baja volatilidad pueden ser eliminadas o moderadas mediante el uso de una llama de óxido nitroso-acetileno ya que al poseer temperaturas mayores permite la disociación de esos compuestos. Como alternativa, se pueden usar agentes liberadores, que son cationes que reaccionan de preferencia con el interferente y evitan su interacción con el analito. Por ejemplo, la adición de un exceso de ion estroncio o lantano reduce la interferencia del fosfato en la determinación de calcio.

En esta práctica se realizará la cuantificación de calcio y se estudiará la influencia del fosfato como interferente, así como la importancia del uso de agentes liberadores en el análisis.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Agua desionizada
- Incógnita
- Disolución madre de 50,0 mg/L de calcio
- Cloruro de lantano 5%
- Disolución de fosfato 100 mg/L P-PO₄³⁻

4.2. Materiales

- Filtro de 0,45 µm.
- Pipetas de 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 y 5,00 mL
- Balones aforados de 50,00 mL
- Bureta de 50,00 mL
- Erlenmeyer de 125 mL.
- Pipeta aforada de 5 mL

4.3. Instrumentación requerida

Espectrofotómetro de absorción atómica

4.4. Muestras para análisis

Muestra incógnita.

4.5. Procedimiento

4.5.1. Curva de calibración y muestras

1. Si fuera necesario filtre cada muestra de agua a través de un filtro de membrana de 0,45 μm .
2. Mida alícuotas de 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 y 5,00 mL de disolución madre de 50,0 mg/L de calcio y colóquelas en los respectivos balones aforados de 50 mL.
3. Añada a los patrones un 1,00 mL de disolución de cloruro de lantano para que la disolución final sea de 0,1% de este reactivo.

4.5.2. Incógnita

1. Mida por triplicado 5,00 mL de la incógnita y deposítela en un balón aforado de 50,00 mL. Añada a cada balón 1,00 mL de cloruro de lantano al 5%.
2. Afore todos los balones a la marca con agua desionizada.
3. Una vez que ha calibrado el instrumento de acuerdo a las instrucciones del fabricante, aspire en el espectrofotómetro cada uno de los patrones, así como las incógnitas. Anote las absorbancias obtenidas.

4.5.3. Estudio de interferencias o efectos del fosfato

1. Mida una alícuota de 4,00 mL de disolución patrón de calcio de 50,00 mg/L y deposítela en un balón de 50,00 mL.
2. Añada una alícuota de 5,00 mL de disolución de fosfato de 100 mg/L.
3. Añada 1 mL de disolución de cloruro de lantano al 5%.
4. Afore a la marca y mida a 422,7 nm en AA
5. Compare las absorbancias con la obtenida para una disolución de calcio de la curva de calibración de 4,0 mg/L que no contiene fosfatos. Anote y explique sus resultados.

Cuadro 8. Condiciones de operación del espectrofotómetro.

Parámetro	Calcio
Longitud de onda (nm)	422,7
Abertura de rejilla (slit)	0,7
Corriente de lámpara (ma)	10
Tipo de quemador	Premezcla
Tipo de llama	Oxidante
Presión de aire (psi)	80
Flujo de aire (L/min)	17
Presión del acetileno (psi)	12
Flujo de acetileno (L/min)	2,2

5. Tratamiento de datos

1. A partir de la curva de calibración, determine la concentración de calcio en la incógnita expresada en mg/L. Reporte el valor promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación y la incertidumbre.
2. Compare con el valor de la disolución patrón de 4,00 mg/L en calcio que tiene fosfato.
3. Compare con el valor de la disolución patrón de 4,00 mg/L en calcio que no contiene fosfato.

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 4 horas.



7. Bibliografía especializada

- Aceto, M., Abollino, O., Bruzzoniti, M. C., Mentasti, E., Sarzanini, C., & Malandrino, M. (2002). Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review. *Food Additives and Contaminants*, 19(2), 126–133. doi:1080/02652030110071336
- APHA. 2005. *Standard Methods for Examination of Water & Wastewater*; 21 edition. Port City Press, United States of America.
- Bings, N., Bogaerts, A., & Broekaert, J. (2006). *Atomic Spectroscopy*. *Analytical Chemistry*, 78(12), 3917–3945. [doi:10.1021/ac060597m](https://doi.org/10.1021/ac060597m)
- Bings, N. H., Bogaerts, A., & Broekaert, A. C. (2010). *Atomic Spectroscopy: A Review*. *Analytical Chemistry*, 82(12), 4653–4681. doi:10.1021/ac1010469
- Fifield, F. W., Kealey, D., Fifield, F. W., & Kealey, D. (1995). *An Introduction to Analytical Spectrometry*. In *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. doi:10.1007/978-1-4615-2179-2_7
- Lewen, N. (2011). The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(4), 653–661. doi:10.1016/j.jpba.2010.11.030
- Ramakrishna, T. V., Robinson, J. W., & West, P. W. (1966). The determination of calcium and magnesium by atomic absorption spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 36(C), 57–64. doi:10.1016/0003-2670(66)80006-5
- Solís-Montiel, E., Fernández-Araya, J.F. 2016. *Manual de Laboratorio de Análisis Instrumental*. Escuela de Química, Universidad Nacional.

- Skoog, D. A., Holler J. y Crouch, S. 2008. Principios de análisis instrumental, 6 edición. Cengage Learning Editores, México.

8. Gestión de residuos.

Cuadro 9. Gestión de residuos de la práctica determinación de calcio por AA.

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas y residuos de incógnitas	cloruro de calcio	6	5	líquido	
	ácido clorhídrico	5			
Prueba de Interferencia de fosfatos	disoluciones de calcio	5	ESPECIAL	líquido	
	cloruro de lantano	ESPECIAL			
	fosfato diácido de potasio	6			
Observaciones	<p>Los lavados con ácido clorhídrico deben efectuarse sobre cristalería completamente limpia y deben disponerse en un recipiente de #5 ácidos y sales inorgánicas.</p> <p>Los residuos que se mezclen con la disolución de lantano deben depositarse en un recipiente por aparte debidamente identificado como residuos especiales de lantano.</p>				

EXPERIMENTO 7

DETERMINACIÓN DE SODIO EN BEBIDAS ISOTÓNICAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA POR LLAMA

1. Contenidos

- 1.1. Conocer las diferencias más importantes entre la técnica de emisión atómica y la técnica de absorción atómica.
- 1.2. Identificar algunos factores experimentales que deben controlarse durante las mediciones por emisión atómica.
- 1.3. Comparar la concentración de sodio presente en bebidas isotónicas comerciales con la reportada por el fabricante en la etiqueta nutricional
- 1.4. Comparar los resultados obtenidos mediante la calibración por estándar externo (curva de calibración) y la calibración por adición de estándar.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante debe tener conocimiento en el uso de la balanza analítica, pipetas aforadas y micropipetas, así como, conocimiento en la preparación de disoluciones, en la elaboración de curvas de calibración y sobre los principios de la técnica de absorción y emisión atómica.

3. Introducción

La espectroscopía de emisión atómica (AES u OES) se basa en la medición de la emisión óptica de átomos excitados. Como método analítico, la emisión atómica es un método rápido, simple y sensible para determinación de iones metálicos traza en solución. Debido a que las líneas de emisión son muy angostas (~ 0.01 nm) y su longitud de onda es característica de los átomos de fase gaseosa en el plasma o en la llama, el método está relativamente libre de interferencias de otros elementos. En general, el método se basa en el análisis de una disolución del analito que se aspira a una zona de excitación (llama o plasma), en donde los átomos son desolvatados, vaporizados y atomizados. Estas fuentes de atomización de alta temperatura proporcionan suficiente energía para los electrones de los átomos, promoviéndolos a niveles de energía más altos, y una vez que los átomos vuelven a su estado basal, emiten luz a longitudes de onda características. Dado que las transiciones energéticas se dan entre niveles de energía atómica bien definidos, las líneas de emisión en los espectros correspondientes son estrechas como se mencionó anteriormente. Sin embargo, cuando se deben analizar espectros de muestras multielementales, estos pueden estar muy saturados y la separación espectral de las transiciones atómicas cercanas requiere un espectrómetro de alta resolución. Dado que todos los átomos de una muestra se excitan simultáneamente, también

pueden ser detectados simultáneamente, siendo esta la principal ventaja de AES en comparación con la espectroscopía de absorción atómica (AA). Al igual que en AA, las muestras líquidas son nebulizadas y llevadas a la fuente de excitación por un gas de arrastre, mientras que las muestras sólidas pueden introducirse en la fuente mediante una suspensión o mediante ablación por láser de la muestra sólida en una corriente de gas.

La espectroscopía de emisión atómica es adecuada para muchos elementos metálicos, especialmente para aquellos metales que son fácilmente excitados a niveles de energía más altos y a temperaturas relativamente bajas (ej., Li, Na, K, Rb, Cs, Ca, Cu, Sr y Ba). Los metaloides y los no metales generalmente no producen átomos neutros aislados en una llama, sino principalmente radicales poliatómicos e iones. Por lo tanto, estos elementos no metálicos no son en general adecuados para la determinación por espectroscopía de emisión de llama. La espectroscopía de emisión atómica requiere de una calibración cuidadosa, asociada principalmente a la determinación de un intervalo de calibración adecuado, ya que son muchas las variables experimentales que afectan la intensidad de la luz emitida por la llama y como ésta viaja desde la llama al detector.

En este experimento se determinará la concentración de sodio en bebidas isotónicas mediante emisión atómica. Dado que algunas bebidas isotónicas son formuladas con colorantes artificiales, se estudiará si estas sustancias tienen un efecto sobre la respuesta de la llama mediante la comparación de dos métodos de calibración instrumental: calibración por estándar externo y calibración por adición de estándar.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

Disolución madre de sodio (1000 µg/mL).

Mida en una balanza analítica 2.5420 g de cloruro de sodio (99.99%, previamente desecado a 105-110°C), disuélvalos en 100 mL de agua desionizada y deposítelos en un balón aforado de 1.00 L. Añada 10 mL de ácido nítrico concentrado, agite y diluya con agua desionizada hasta la marca.

Disolución de trabajo de sodio (25 µg/mL)

Mida una alícuota de 25 mL de disolución de 1000 µg/mL de sodio, deposítela en un balón aforado de 1000 mL. Complete a la marca con agua desionizada.

4.2. Materiales

- Pipetas aforadas de 0.5, 1, 2, 3, 4 mL
- Balones aforados de 50 y 250 mL

4.3. Instrumentación requerida

- Espectrofotómetro de absorción atómica (AAS)

4.4. Muestras para análisis

- Bebidas isotónicas de diferentes marcas comerciales. Se deben utilizar muestras de bebidas isotónicas con colorante artificial y sin colorante artificial

4.5. Procedimiento

4.5.1. Calibración instrumental a través del estándar externo

Mida una alícuota de 0.5, 1, 2, 3 y 4 mL de la disolución patrón de sodio de 25 $\mu\text{g/mL}$, deposítelas en balones aforados de 50 mL y diluya a línea de aforo con agua desionizada. Como blanco reactivo se utilizará el agua desionizada utilizada para preparar los patrones y las muestras. Debido a que es posible que el agua desionizada pueda tener cantidades cuantificables de sodio, se recomienda corregir los valores de intensidad de emisión usando el valor correspondiente del blanco reactivo. Es por ello que la curva de calibración debe incluir un punto adicional (0,0), ya que la intensidad de los patrones fue corregida por el blanco.

4.5.2. Preparación de las bebidas isotónicas y calibración instrumental a través de la adición estándar

Mida una alícuota de cada bebida isotónica y deposítela en balón aforado de 250 mL, el volumen de la alícuota deberá de ser calculado para salvaguardar que la concentración esperada se encuentre en el rango de calibración. Para el caso de bebidas comerciales como "Electrolit" se recomienda un volumen de 0.3 mL, en el caso de bebidas comerciales como "Powerade" se recomienda un volumen de 0.5 a 0.7 mL. Sobre este último aspecto, se recomienda verificar las alícuotas con respecto a la concentración teórica con el objetivo de que la concentración de sodio sea cercana a 0.8 mg/L. Las disoluciones se aforan con agua desionizada. Realice la dilución de la muestra por triplicado. Utilice un blanco reactivo de agua desionizada.

Para evaluar si existe algún efecto debido al colorante y otros componentes tipo electrolitos y azúcares presentes en la matriz, se propone realizar 4 disoluciones más (por cada tipo de bebida) como en el punto anterior, sin embargo, a estas se les añadirán volúmenes de 2, 4, 6 y 8 mL de la disolución de trabajo. De igual manera, se afora con agua desionizada y se recomienda utilizar agua desionizada como blanco reactivo.

La intensidad de emisión de los patrones y las muestras se leerán en un espectrofotómetro de absorción atómica y siguiendo las indicaciones del fabricante del instrumento.

4.5.3. Muestra Incógnita

Mida tres alícuotas 5 mL de la disolución incógnita suministrada por su profesor, dépositelas en balones aforados de 50 mL y diluya a línea de aforo con agua desionizada. Como blanco reactivo se utilizará el agua desionizada utilizada para preparar los patrones y las muestras.

5. Tratamiento de datos

Para la calibración con estándar externo, construya la curva de calibración graficando la intensidad (I) contra la concentración de sodio en mg/L. A partir de esta curva determine la concentración de sodio (mg/L) en la muestra incógnita con su respectiva incertidumbre y porcentaje de desviación estándar relativa.

Con los datos obtenidos mediante la calibración por adición estándar, realice lo siguiente:

- a. Realice un gráfico que contenga ambas curvas de calibración (estándar externo y adición estándar).
- b. Evalúe si existe efecto matriz a través del contraste de medias para los valores de pendientes entre los dos tipos de calibración. (realice esta comparación por tipo de bebida) (ver la data suplementaria)

Determine la concentración en mg/L de sodio a partir de las mediciones realizadas al triplicado de muestra de bebida isotónica, utilizando:

- a. La ecuación de la curva de estándar externo: Reporte la incertidumbre del resultado, el porcentaje de desviación estándar relativa y el porcentaje de error en relación con el contenido de sodio declarado en la etiqueta del producto.
- b. la ecuación para cálculo de concentración a partir de adición estándar.

Determine si existe diferencia estadísticamente significativa en la concentración obtenida por ambos métodos.

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 4 horas.

7. Bibliografía especializada

- Fortunato, F.M., Bechlin, M.A., Gomes Neto, J.A., Virgilio, A., Donati, G.L., Jones, B.T. 2016. Standard dilution analysis in flow system: Sodium determination by flame atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 124, 662-667, doi:10.1016/j.microc.2015.10.019.
- Froes, R.E.S. Borges Neto, W., Naveira, R.L.P., Silva, N.C., Nascentes, C.C., da Silva, J.B.B. 2009. Exploratory analysis and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) applied in the determination of metals in soft drinks. *Microchemical Journal*, 92(1), 68-72, doi:10.1016/j.microc.2008.12.008.
- Kurilenko, L. N., & Kostyreva, T. G. (2016). Determination of quantities of sodium and potassium taking into account their mutual influence in glass and zeolites using the method of flame atomic emission spectrometry. *Glass Physics and Chemistry*, 42(3), 266–269. doi:10.1134/S1087659616030068
- Leśniewicz, A., Grzesiak, M., Żyrnicki, W. *et al.* 2016. Mineral Composition and Nutritive Value of Isotonic and Energy Drinks. *Biol Trace Elem Res* 170, 485–495 . doi:10.1007/s12011-015-0471-8
- Mauri, A., Llobat, M., Herráez, R., (2010). *Laboratorio de Análisis Instrumental*. Valencia, España: Editorial Reverté.
- Nielsen S.S. 2010. Sodium and Potassium Determinations by Atomic Absorption Spectroscopy and Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy. In: Nielsen S.S. (eds) *Food Analysis Laboratory Manual*. Food Science Texts Series. Springer, Boston, MA Styburski, D., Dec, K., Baranowska-Bosiacka, I., Goschorska, M., Hołowko, J., Żwieretło, W., Skórka-Majewicz, M., Janda, K., Rosengardt, A., Gutowska, I. 2019. Can Functional Beverages Serve as a Substantial Source of Macroelements and Microelements in Human Nutrition?—Analysis of Selected Minerals in Energy and Isotonic Drinks. *Biological Trace Element Research* doi:10.1007/s12011-019-01973-3.
- Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., Miró, M., Fernández-Sánchez, M. L., Fernández-Arguelles, M. T., & Costa-Fernández, J. M. 2019. Atomic Emission Spectrometry | Flame Photometry. *Encyclopedia of Analytical Science*, 160–168. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14533-0

8. Gestión de residuos.

Cuadro 10. Gestión de residuos de la práctica determinación de sodio por emisión atómica

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas y residuos de incógnitas	cloruro de sodio	6	5	líquido	
	ácido nítrico	5			
Residuos de muestras	residuos de bebidas isotónicas	-	-	líquido	
Observaciones	<p>Los lavados con ácido nítrico deben efectuarse sobre cristalería completamente limpia y debe depositarse en el recipiente #5 ácidos y sales inorgánicas. Recuerde colocar recipientes de bebidas en envases de reciclaje.</p>				

EXPERIMENTO 8

DETERMINACIÓN DE ZINC Y MANGANESO EN CONCENTRADOS ALIMENTICIOS POR ABSORCIÓN ATÓMICA

1. Contenidos

- 1.1. Introducción a la técnica de absorción atómica por llama (AA).
- 1.2. Identificación de las partes fundamentales de un equipo de absorción atómica.
- 1.3. Reconocimiento de las principales etapas necesarias para la digestión de muestras alimenticias
- 1.4. Aplicación de diferentes técnicas utilizadas en el laboratorio para la digestión de muestras
- 1.5. Comparar la recuperación de las diferentes técnicas de digestión utilizadas.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante debe tener conocimiento en el uso de la balanza analítica, pipetas aforadas y micropipetas, así como la capacidad de realizar calibración instrumental por estándar externo y preparación de muestras. Además, el estudiante deberá tener conocimiento de la técnica de espectrometría por absorción atómica en llama y ser capaz de hacer pruebas de contraste entre medias

3. Introducción

La espectrometría de absorción atómica por llama, ha sido utilizada ampliamente en el análisis cuantitativo y cualitativo de analitos en diversas matrices, incluyendo, pero no limitándose a: efluentes gaseosos, aguas naturales, residuales, de procesos industriales, sedimentos, minerales, alimentos procesados, materias primas, entre otros.

Debido a esta versatilidad, los procesos de análisis químico mediante esta técnica, en la mayoría de las ocasiones involucran una serie de procedimientos de relativa complejidad, específicamente en la etapa de preparación, puesto que representa crucial importancia no solo para introducir adecuadamente la muestra al sistema espectroscópico, si no que para lograr una adecuada disponibilidad y/o liberación del analito de su matriz.

Los analitos metálicos en estas matrices pueden encontrarse en diversos estados de oxidación y a su vez, formando compuestos químicos de variada solubilidad. En el caso de las matrices acuosas, los metales pueden encontrarse como iones disueltos o iones acomplejados con materia orgánica, mientras que en alimentos u otro tipo de matrices utilizadas como materia prima, pueden estar presentes en

sales o minerales de relativa baja solubilidad, o bien, formando parte de la matriz unidos a macromoléculas orgánicas, representando un reto de mayor complejidad comparado con la matriz acuosa para obtener al analito fácilmente disponible para el análisis espectroscópico. Para lograr este objetivo, diversas técnicas de digestión de muestras han sido utilizadas, donde la matriz es sometida a diversos tratamientos físicos o químicos, principalmente térmicos y de reacción con ácidos y agentes oxidantes fuertes.

La digestión seca consiste en un tratamiento térmico donde la matriz es calcinada a una temperatura generalmente entre 400 - 600 °C. En este rango de temperatura se asegura la volatilización de la materia orgánica, carbonizando la matriz y logrando realizar la mineralización de la muestra donde los analitos metálicos se encontrarán en forma de óxidos o sales. Una segunda técnica consiste en la digestión húmeda, esta se fundamenta en la reacción química de la matriz con ácidos y/o agentes oxidantes fuertes, permitiendo aumentar la disponibilidad del analito por efectos de liberación de matriz y aumento de solubilidad de las sales u óxidos metálicos, por lo anterior, esta puede ser aplicada de manera independiente o en combinación con la digestión seca. Finalmente, una tercera técnica de amplio uso y relativamente moderna, consiste en la digestión de muestras por horno microondas, esta es muy similar a la digestión húmeda, no obstante, el calentamiento de la muestra se genera por medio de radiación microonda de alta potencia, permitiendo acelerar el proceso de digestión y obteniendo resultados satisfactorios con pequeñas cantidades de muestra y tiempos cortos de digestión.

En esta práctica se realizará la cuantificación de zinc y manganeso en muestras de concentrados alimenticios, además se estudiará el efecto de utilizar diversas técnicas de digestión de muestras y la recuperación relativa asociada a estas.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Agua desionizada
- Ácido clorhídrico 12 M
- Ácido nítrico 14 M
- Disolución de trabajo de zinc 12 mg/L
- Disolución de trabajo de manganeso 20 mg/L

4.2. Materiales

- Pipetas aforadas de 2, 4, 6, 8 y 20 mL
- Balones aforados de 25, 50 y 100 mL
- Crisoles de porcelana de 30 mL
- Tubos de teflón
- Embudo de espiga corta
- Espátula acanalada

4.3. Instrumentación requerida

- Espectrofotómetro de absorción atómica (AAS)
- Mufla de calcinación
- Plantillas de calentamiento
- Equipo para digestión microondas

4.4. Muestras para análisis

- Concentrados alimenticios
- Muestras incógnitas

4.5. Procedimiento

4.5.1. Digestión y preparación de las muestras

4.5.1.1. Digestión seca con posterior digestión húmeda

Mida por duplicado, la masa de 5 g de muestra en un crisol de porcelana (no es necesario que se encuentre en masa constante) e introdúzcalo en una mufla de calcinación a 150 °C. Realice un ascenso de temperatura aproximado de 100°C cada 20 min hasta llegar a los 550 °C, posteriormente deje reposar a esta temperatura durante 2 horas.

Transcurrido este tiempo, permita que la muestra se enfríe y en una capilla de extracción, humedezca con un poco de agua desionizada las cenizas, posteriormente agregue poco a poco y con la ayuda de un gotero, el ácido clorhídrico concentrado hasta un 75% de capacidad del crisol (aproximadamente 10 mL de ácido), caliente a baja temperatura hasta que no desprenda gases (no más de 100°C). Posteriormente adicione 10 gotas del ácido nítrico concentrado y caliente a baja temperatura por 5 minutos. Deje enfriar a temperatura ambiente

Trasvase cuantitativamente las muestras a balones aforados de 50 mL y diluya con agua desionizada hasta la marca de aforo. De esta disolución tome una alícuota de 5 mL y deposítela en un balón aforado de 25 mL, afore con agua desionizada

4.5.1.2. Digestión por horno microondas

Mida por duplicado, la masa de 0.25 g de muestra y trasvase cuantitativamente a los tubos de teflón para horno microondas. Adicione 10 mL de HNO₃ concentrado y 2 mL de HCl concentrado. Posteriormente, cierre los tubos de manera adecuada y asegúrese de hacerlo correctamente en aras de evitar fugas y pérdida de muestra. Seguidamente los tubos son dispuestos en el carrusel respectivo y son introducidos en el equipo microondas con el programa descrito en el cuadro 11.

Cuadro 11. Condiciones de operación del horno microondas.

Parámetro	Valores
Potencia	400 W (100%)
Tiempo de rampa (minutos)	15 minutos
Presión (psi)	800
Temperatura	200 °C
Agitación	Apagado
Tiempo de espera (minutos)	15

Terminada esta etapa, permita un enfriamiento aproximado de 10 minutos para abrir el equipo y otros 30 minutos adicionales para el enfriamiento de los tubos. Finalmente, proceda a transvasar el contenido a balones aforado de 25 mL o la dilución que sea apropiada para la muestra en cuestión.

4.5.2. Análisis de recuperación

Para determinar la efectividad de recuperación de los métodos de digestión, se propone realizar el análisis de muestras fortificadas con disolución de concentración conocida de cada analito. Estos controles se realizarán siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección a, no obstante, se deben tomar en cuenta las siguientes recomendaciones.

4.5.2.1. Digestión seca con posterior digestión húmeda

A los crisoles con 5 g de muestra, se les añadirá una alícuota de 5 mL de la disolución de trabajo con concentración de 12 mg/L de Zn y 20 mg/L de Mn, o en su efecto, la cantidad de disolución de concentración respectiva para obtener una fortificación de 0.06 mg Zn y 0.1 mg Mn por cada 5 g de muestra. Tome en consideración que el crisol no puede ser insertado en la mufla con mucho de volumen de líquido para evitar salpicaduras de muestra.

4.5.2.2. Digestión por horno microondas

A los tubos de teflón para horno microondas con 0.25 g de muestra, se les añadirá una alícuota de 0.5 mL de la disolución de trabajo con concentración de 12 mg/L de Zn y 20 mg/L de Mn, o en su efecto, la cantidad de disolución de concentración respectiva para obtener una fortificación de 0.006 mg Zn y 0.01 mg Mn por cada 0.25 g de muestra. Tome en consideración que el volumen de líquido máximo en el tubo no puede ser superior de los 12.5 mL.

4.6. Curva de calibración

Mida alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 20 mL de las disoluciones de trabajo de cada metal (o en su efecto de la disolución de trabajo mixta), deposítelas en balones aforados de 100 mL y diluya a línea de aforo con agua desionizada. La curva de calibración puede prepararse como una disolución mixta de ambos analitos. Como blanco reactivo se utilizará el agua desionizada utilizada para preparar los patrones y las muestras

Posterior a esto, se procede a realizar la calibración instrumental utilizando los parámetros del cuadro 12.

Cuadro 12. Condiciones de operación del espectrofotómetro.

Parámetro	Manganeso	Zinc
Longitud de onda (nm)	279.5	213.9
Abertura de rejilla (slit)	0.7 H	0.2
Corriente de lámpara (ma)	10	10
Tipo de quemador	Premezcla	
Tipo de llama	Oxidante	
Presión de aire (psi)	80	
Flujo de aire (L/min)	17	
Presión del acetileno (psi)	12	
Flujo de acetileno (L/min)	2,2	

5. Tratamiento de datos

1. Elabore y grafique los modelos de regresión lineal con los datos obtenidos en el inciso c.
2. Cuantifique la concentración en mg/kg de cada analito en la muestra analizada y para cada tipo de digestión realizada.
3. Para cada resultado promedio calculado anteriormente reporte la desviación estándar, el coeficiente de variación, la incertidumbre y el porcentaje de error respecto al valor nominal suministrado para la muestra.
4. Para los análisis realizados en el inciso b, cuantifique la recuperación obtenida, para esto calcule el promedio del duplicado y sustraiga la concentración promedio de la muestra cuantificada en el inciso anterior. El valor resultante corresponde a la concentración recuperada del análisis, este valor, se divide entre la concentración teórica añadida y se multiplica por 100.
5. Determine si existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor de recuperación obtenido por ambos métodos de digestión.

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento



El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 8 horas.

7. Bibliografía especializada

- AOAC (2000). Official Method. Official Methods of Analysis, vol. 2, 17th ed.
- Araújo, G. C. L., Gonzalez, M. H., Ferreira, A. G., Nogueira, A. R. A., & Nóbrega, J. A. (2002). Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 57(12), 2121–2132. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(02\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00164-7)
- Ayanda, O. I., Bello, O. A., & Nwabuisi, O. I. (2020). Trace metal toxicity in some food items in three major markets in ado-odo/ota lga, ogun state, nigeria and associated health implications. *African Health Sciences*, 20(4), 2050–2061. <https://doi.org/10.4314/ahs.v20i4.63>
- Bings, N. H., Bogaerts, A., & Broekaert, A. C. (2010). Atomic Spectroscopy: A Review. *Analytical Chemistry*, 82(12), 4653–4681. doi:10.1021/ac1010469
- Fifield, F. W., Kealey, D., Fifield, F. W., & Kealey, D. (1995). An Introduction to Analytical Spectrometry. In *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. doi:10.1007/978-1-4615-2179-2_7
- Ozbek, N., & Akman, S. (2016). Method development for the determination of calcium, copper, magnesium, manganese, iron, potassium, phosphorus and zinc in different types of breads by microwave induced plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 200, 245–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.043>
- Rybicka, I., & Gliszczynska-Świgło, A. (2017). Minerals in grain gluten-free products. The content of calcium, potassium, magnesium, sodium, copper, iron, manganese, and zinc. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.006>
- Schwank, T., Pitzke, K., Gusbeth, K., Ashley, K., & Breuer, D. (2019). Comparison of Microwave-Assisted Digestion and Consensus Open-Vessel Digestion Procedures for Evaluation of Metalliferous Airborne Particulate Matter. *Annals of Work Exposures and Health*, 63(8), 950–964. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxz068>
- Shokunbi, O. S., Adepoju, O. T., Mojapelo, P. E. L., Ramaite, I. D. I., & Akinyele, I. O. (2019). Copper, manganese, iron and zinc contents of Nigerian foods and estimates of adult dietary intakes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82(May 2018), 103245. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103245>
- Skoog, D. A., Holler J. y Crouch, S. 2008. Principios de análisis instrumental, 6 edición. Cengage Learning Editores, México.
- Solís-Montiel, E., Fernández-Araya, J.F. 2016. Manual de Laboratorio de Análisis Instrumental. Escuela de Química, Universidad Nacional.

8. Gestión de residuos.

Cuadro 13. Gestión de residuos de la práctica determinación de zinc y manganeso por AA.

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas y residuos de incógnitas	ácido clorhídrico	6	5	líquido	
	ácido nítrico	5			
	Disoluciones de Zn y Mn	6			
Residuos de muestras	residuos de concentrados alimenticios	-	-	líquido	
Observaciones	Los lavados con ácido nítrico deben efectuarse sobre cristalería completamente limpia y pueden disponerse en el recipiente #5 ácidos y sales inorgánicas.				

SECCIÓN IV. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

EXPERIMENTO 9

OPERACIONES FUNDAMENTALES EN CROMATOGRAFÍA DE GASES

1. Contenidos

- 1.1 Identificación y reconocimiento de los componentes principales de un sistema cromatográfico.
- 1.2 Utilización de la jeringa de inyección en un sistema cromatográfico, para la evaluación del efecto de la inyección manual en la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados.
- 1.3 Identificación de analitos en una corrida cromatográfica.
- 1.4 Reconocimiento de algunos parámetros cromatográficos como indicadores de la eficiencia de separación de la corrida (N, H, Rs, etc.)
- 1.5 Cuantificación algunos componentes orgánicos haciendo uso de una curva de calibración.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante debe tener conocimiento en el uso de pipetas aforadas, micropipetas y pipetas electrónicas, así como, conocimiento en la preparación de disoluciones, en la elaboración de curvas de calibración y sobre los principios de la técnica de cromatografía de gases.

3. Introducción

La cromatografía de gases es una técnica de separación de sustancias desarrollada por Martin y Synge en 1941, la cual consiste en la inyección de una pequeña cantidad de muestra en una corriente de gas inerte a elevada temperatura. Esta corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica que separará los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición, adsorción o una mezcla de ambos. Los componentes separados emergen de la columna a intervalos discretos y llegan hacia un sistema de detección donde se podrán identificar y cuantificar.

La muestra se inyecta en un bloque de calentamiento (horno), donde se transforma instantáneamente en vapor y mediante un gas transportador de naturaleza inerte (inyector), se introduce dentro de un tubo empacado con un soporte sólido cubierto con una fase líquida (generalmente) que logra separar los analitos (columna). La interacción entre los componentes de la muestra presentes en la corriente de gas y el recubrimiento, conducen a una separación diferencial de los componentes de la

mezcla. Este proceso de adsorción-desorción se realiza muchas veces, mientras la muestra se desplaza hacia la salida de la columna y los analitos son conducidos a través de la celda del detector. Haciendo uso de un registrador, integrador o PC, las señales cromatográficas aparecen en el gráfico en forma de picos en función del tiempo. El tiempo de elución de un pico ayuda a identificar el componente y el área del pico permite determinar la concentración relativa de cada sustancia en la mezcla (Figura 16).

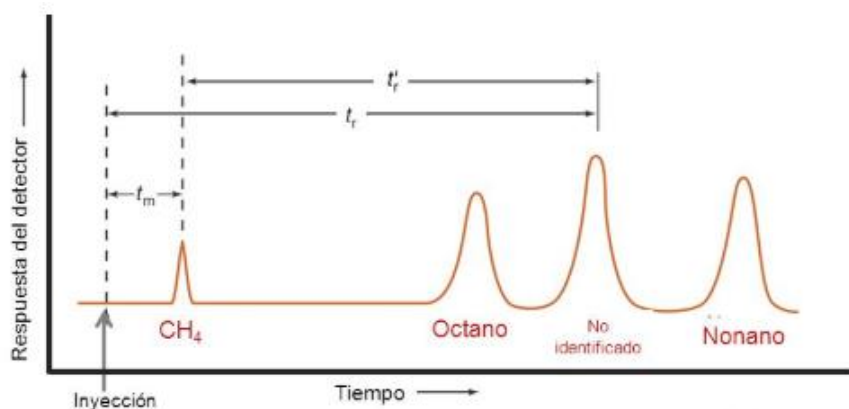


Figura 16. Cromatograma de una mezcla de octano y nonano; donde t_m es tiempo muerto; t_r es tiempo de retención y t'_r es tiempo de retención ajustado.

Algunas de las ventajas de la cromatografía son el rango de medición (desde niveles de ppm hasta el 100 por ciento), la detección de una amplia gama de componentes, además, requiere de pequeñas cantidades de muestras del orden de décimas de microlitros. Sin embargo, una limitante es requerir compuestos volátiles.

Componentes de un sistema de cromatografía de gases

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases son: La fuente de gas, el sistema de inyección, el horno y la columna, el sistema de detección y el sistema de registro (figura 17).



Figura 17. Esquema básico de un sistema cromatográfico. Fuente: Restek. com

3.1. Gases de arrastre

Generalmente se utilizan como gases de arrastre el nitrógeno, helio e hidrógeno debido a que cumplen con ciertas condiciones: son inertes, capaces de minimizar la difusión gaseosa, fácilmente disponible y puros.

Su selección dependerá del tipo de detector y columna a utilizar, sin embargo, se conoce que el hidrógeno es el gas de arrastre que posee una mayor velocidad lineal lo que influye en el tiempo del análisis.

3.2. Inyector

La primera etapa del análisis es la inyección y si ésta falla, la cuantificación representará dificultades por la no reproducibilidad en las áreas de los analitos eluidos. La muestra puede ser inyectada al sistema ya sea por inyección manual o automática (figura 18)

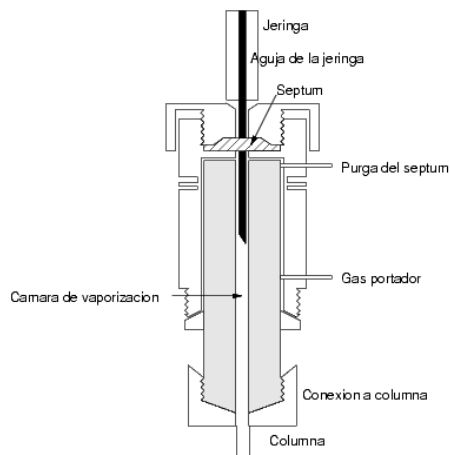


Figura 18. Sistema de inyección para cromatografía de gases.

La mayoría de los cromatógrafos poseen cámaras de inyección termostatazadas en donde la muestra se vaporiza y el gas resultante se arrastra hacia la columna. Esta vaporización se debe realizar lo más rápido posible sin que se discrimine ningún componente de la muestra y que la banda que llegue a la columna sea fina.

Cuando se utilizan columnas empacadas se pueden inyectar porciones de muestra mayores que cuando se utilizan columnas capilares, esto debido a que las columnas capilares son afectadas por los disolventes. Los volúmenes que son inyectados en una columna capilar son muy pequeños y no hay jeringas con volúmenes inferiores a 0.1 microlitros, es por lo anterior, que los inyectores utilizados con este tipo de columnas deben permitir el ingreso de una porción del total de la muestra inyectada, split, con esta separación una parte de la muestra pasa a la columna mientras que la otra parte sale del sistema. Por otro lado, la inyección splitless, dirige la totalidad de la muestra hacia la columna.

3.3. Horno y columna

El horno es un componente que se mantiene a temperatura elevada para favorecer los procesos adsorción-desorción para la muestra que se encuentra en la columna, permiten gradientes de temperatura para una mejor eficiencia de elusión en la columna.

Las columnas utilizadas en cromatografía de gases pueden ser empacadas o capilares, en ellas, la muestra inyectada en el gas portador interactúa con la fase estacionaria y se establece un equilibrio entre la concentración de cada componente en la fase gaseosa y la fase estacionaria. El gas de arrastre fluye por la columna y cada compuesto sale de la fase estacionaria a su propia velocidad. La separación se incrementa después de muchas interacciones de los analitos a lo largo de la columna.

3.4. Detectores

Los detectores que se utilizan en cromatografía de gases son de tipo diferencial, no producen señal cuando el gas portador pasa por ellos, sino que responden ante alguna propiedad que varía cuando el gas portador se encuentra mezclado con la muestra eluída en la columna.

Existe una amplia variedad de detectores entre los que se encuentra el detector de masas (MS), el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura electrónica (ECD), el detector ultravioleta (UV), entre otros.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Disolución al 0.3 o 0.5% de la mezcla de alcoholes: isopropanol, n-propanol e isobutanol en agua.
- Agua desionizada tipo I

4.2. Materiales

- Jeringa para cromatografía de gases
- Columna Capilar
- Pipeta graduada de: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mL o micropipeta de 1.0 mL y pipeta electrónica de 10.0 mL
- Balones aforados de 50 mL

4.3. Instrumentación requerida

- Cromatógrafo de gases con detector FID

4.4. Muestras para análisis

- Muestras incógnitas
- Licores comerciales de alta graduación.

4.5. Procedimiento

4.5.1. Tiempos de retención y repetibilidad.

Asegúrese antes de cualquier inyección, verificar que el septum no está roto, ha sido revisado y que no hay fugas de gas por el mismo debido a inyecciones anteriores, además se deben verificar las condiciones cromatográficas que se encuentran en el cuadro 14 y 15 dependiendo de la columna utilizada.

Cuadro 14. Parámetro y valores usados en el análisis cromatográfico de mezclas de alcoholes en agua. **Columna Carbowax.**

PARÁMETRO	VALOR	PARÁMETRO	VALOR	PARÁMETRO	VALOR
Columna Widebore	0,53 nm	Inyección	1 μ L	Flujo de nitrógeno	2 mL/min
Temp Detector	200°C	Fase líquida	Carbowax 20 M	Split/Splitless	0,30 min
Temp Columna	90°C	Largo	12 metros	Make up	N ₂
Temp Inyección	150°C	Film	1,2 μ m	Tiempo de análisis	1,5 min
		Columna	Alltech Econocap	Detector	FID

Cuadro 15. Parámetro y valores usados en el análisis cromatográfico de mezclas de alcoholes en agua. **Columna StabilWAX.**

PARÁMETRO	VALOR	PARÁMETRO	VALOR	PARÁMETRO	VALOR
Columna Widebore	0,53 nm	Inyección	1 μ L	Flujo de nitrógeno	15,9 mL/min 122 cm/s
Temp Detector	250°C	Fase líquida	StabilWAX	Split/Splitless	1:100
Temp Columna	80°C	Largo	15 metros	Make up	----
Temp Inyección	250°C	Film	0,5 μ m	Tiempo de análisis	0,7 min
		Columna	Restek Corp.	Detector	FID



Figura 19. Ferrules y septums

4.5.2. Procedimiento de inyección. Solvent Flush.

1. Lave varias veces la jeringa con la mezcla de alcoholes.
2. Mida en la jeringa 1 μL de aire y luego 0.5 o 1 μL de la mezcla de alcoholes.
3. Inyecte la muestra en el cromatógrafo. Tiene la opción de retirar inmediatamente la jeringa después de depositar la muestra o también, puede dejarla en el inyector y esperar 3 segundos después de inyectar. La jeringa se debe retirar perpendicular al septum.
4. Enjuague la jeringa mínima 3 veces con la mezcla de alcoholes.
5. Repita los pasos anteriores 2 veces más después de finalizar la corrida cromatográfica.

4.5.3. Determinación de una mezcla de alcoholes. Isopropanol, isobutanol y n-propanol.

4.5.3.1. Curva de calibración de alcohol isopropílico, n-propanol e isobutanol (IPA-nPA-IBA) en agua.

1. Preparación de la curva de calibración (0.05 a 0.50%)
2. A partir de una solución de 5.00% en isopropanol, n-propanol e isobutanol, mida las alícuotas de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mL y deposítelas en balones aforados de 50 mL, completando con agua desionizada.

4.5.3.2. Preparación de la muestra.

1. Realice el procedimiento de dilución más apropiado para el análisis de su muestra en aras de obtener una concentración que se ajuste al intervalo lineal de trabajo de calibración preparado anteriormente.

4.5.3.3. Inyección de las muestras y patrones.

1. Inyecte 0.5 o 1 μL de cada disolución patrón o muestra preparada, haciendo uso de la técnica de solvent flush.
2. Realice el procedimiento por triplicado.
3. Inyecte de 0.5 a 1 μL en idénticas condiciones de trabajo que con la curva de calibración.
4. Realice el proceso por triplicado.

5. Tratamiento de datos

5.1. Tiempos de retención y repetibilidad.

1. Considerando para cada analito, el tiempo de retención (t_r), el área de pico calculada por el equipo (A) y las repeticiones realizadas, determine la media, mediana y la desviación estándar para cada parámetro por analito. 2. Calcule el número de platos teóricos de la columna, $n = 16(t_r/W_b)^2$ para cada analito y la altura equivalente del plato teórico, $H = L/N$, donde L es la longitud de la columna usada en mm y N el número de platos teóricos de ésta. Calcule el promedio, mediana y desviación estándar para H y N de cada analito. 3. Calcule el valor de R_s entre los picos 1 – 2 y 2 – 3.

2. Construya los modelos de regresión lineal para realizar la cuantificación respectiva de analito. No olvide calcular la concentración y la incertidumbre de cada analito, así como estimar la precisión de la determinación (%RSD)

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 8 horas.



7. Bibliografía especializada

- Christian, G. D. **Química Analítica**. 6ta. edición. McGraw Hill, México, 2009.
- Dabrio, M. V. **Cromatografía de gases I**. Editorial Alhambra, Barcelona, 1971.
- Day, R. A. y Underwood, A. L. **Química Analítica Cuantitativa**. 5ta. edición. Prentice Hall, México, 1989.
- Dubey, P. S., & Mittal, N. (2020). Estimation and Validation of Residual Solvents in Marketed Formulation of Anti-Hypertensive Drug By Gas Chromatographic Method. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*, 7(2), 2194–2203. <https://doi.org/10.21276/irjps.2020.7.2.12>
- Harris, D. C. **Análisis Químico Cuantitativo**. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1992.
- MacMaster, M.; MacMaster, C. **GC / MS. A Practical User's Guide**. Wiley-VCH, New York, 1998
- McNair, H. M.; Bonelli, E. J. **Basic Gas Chromatography**. 5ta. edición. Varian Instruments, 1969.
- .
- Rubinson, K. A y Rubinson, J. F. **Análisis Instrumental**. Prentice Hall, España, 2001.
- Skoog, D. A.; Holler F.J. y Crouch, S. R. **Principios de Análisis Instrumental**. Sexta edición. Cengage Learning, México, 2008.

- Suchatanugal, N., Chedthanorrakul, P., Thaveesangsakulthai, I., Nhujak, T., & Kulsing, C. (2020). Thin layer chromatography based extraction approaches for improved analysis of volatile compounds with gas chromatography–mass spectrometry and direct analysis with gas analyzer. *Journal of Separation Science*, November, 1–10. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000917>
- Weerasooruya, W. M. ., Liyanage, J. A., & Jayaratna, D. . (2020). Quantitative analysis of organic volatile compounds in two ayurveda pharmaceuticals widely used in Sri Lanka. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 7(12), 01–04.
- Willard, H. H.; Merritt, L. L.; Dean, J. A. y Settle, F. A. **Métodos Instrumentales de Análisis**. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1991.
- <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490771433.pdf>
- [http://www.esclab-algerie.com/v1/downloads/telechargement\(117\).pdf](http://www.esclab-algerie.com/v1/downloads/telechargement(117).pdf)

8. Gestión de residuos.

Cuadro 16. Gestión de residuos de la práctica de cromatografía de gases

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas y residuos de incógnitas	iPA	3	3	líquido	
	nPA	3			
	iBA	3			
Residuos de disoluciones para equipo	Acetato de etilo	3	3	líquido	
Observaciones	Ninguna				

EXPERIMENTO 10

DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA POR HPLC

1. Contenidos

- 1.1. Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación de cafeína por cromatografía líquida.
- 1.2. Aplicación de la cromatografía líquida con fines cualitativos y cuantitativos
- 1.3. Análisis de alimentos por cromatografía líquida.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante debe tener conocimiento en el uso de la balanza analítica, pipetas aforadas y micropipetas, así como, conocimiento en la preparación de disoluciones, en la elaboración de curvas de calibración y de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

3. Introducción

La cromatografía es un método físico de separación, en el cual, las sustancias a separar se distribuyen en dos fases: estacionaria y móvil. Esta separación se debe a las repetidas adsorciones y desorciones de las sustancias en la fase estacionaria, conforme se van moviendo por efecto de la fase móvil, obteniéndose la separación por las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos compuestos.

La fase estacionaria está compuesta de diferentes tipos de materiales, mientras que la fase móvil puede ser un gas, lo que se llamaría cromatografía gaseosa o puede ser un líquido o una mezcla de líquidos, conocida como cromatografía líquida.

La cromatografía líquida dependiendo de la forma que tenga la fase estacionaria puede dividirse en cromatografía de capa fina, cromatografía de papel o cromatografía de columna. Esta última se puede clasificar según los procesos de separación en cromatografía de adsorción, de partición, intercambio iónico y de exclusión.

Además, la cromatografía líquida también puede ser clasificada según la polaridad de la fase estacionaria como: cromatografía líquida en fase normal y cromatografía líquida en fase reversa. En el primer tipo, la fase estacionaria tiene una naturaleza fuertemente polar, mientras que la fase móvil es fuertemente apolar (hexano o tetrahidrofurano), en este caso las sustancias más polares se verían mayormente retenidas en la fase estacionaria.

En la cromatografía en fase reversa, la fase estacionaria es de naturaleza apolar y la fase móvil presenta un carácter polar (agua o alcoholes), en este caso aquellas sustancias más polares serían menos retenidas por la fase estacionaria.

En cromatografía líquida es muy común modificar la polaridad de la fase móvil, en el caso de la fase normal, se puede hacer una adición de una sustancia más polar, mientras que, en fase reversa, el aditivo será una sustancia menos polar.



Figura 20. Cromatografía líquida en fase normal y en fase reversa.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) es una de las técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de compuestos no volátiles y térmicamente inestables presentes en matrices complejas, tales como: fluidos biológicos, productos naturales, matrices ambientales, alimentos, entre otros.

La técnica más popular para la determinación de cafeína en diferentes mezclas es por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), sin embargo otros métodos de análisis incluyen espectrofotometría UV-Vis, cromatografía de capa fina, cromatografía de iones, espectroscopia Raman por transformada de Fourier y espectrofotometría infrarroja de transformada de Fourier.

La cafeína es un alcaloide natural, parte de un grupo de compuestos conocidos como metilxantinas, cuyo nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina con una estructura molecular tal como la presentada en la figura 21.

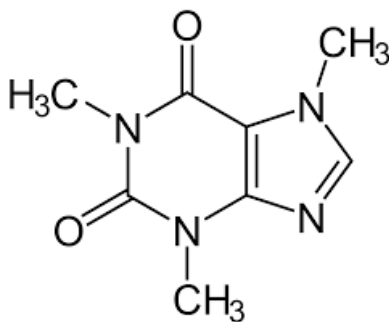


Figura 21. Estructura química de la cafeína.

La cafeína se puede encontrar en las hojas, semillas o frutos de aproximadamente 60 a 80 especies de plantas. Entre las fuentes más conocidas de cafeína están la planta de café, los granos de cacao, las nueces de cola y las hojas de té.

La cafeína es una sustancia farmacológicamente activa y, dependiendo de la dosis, puede ser un estimulante leve del sistema nervioso central, cardíaco y respiratorio, puede ser utilizado como agente saborizante. En el caso de ingestión de la cafeína, esta no se acumula en el cuerpo a lo largo del tiempo y normalmente se excreta dentro de varias horas de consumo.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Agua desionizada tipo I
- Disolución patrón de 100 mg/L de cafeína

4.2. Materiales

- Filtro de 0.45 μm .
- Pipetas aforadas de 1.00; 2.00; 3.00; 4.00 y 5.00 mL
- Balones aforados de 10.00 mL

4.3. Instrumentación requerida

- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC)

4.4. Muestras para análisis

- Muestras incógnitas
- Bebidas comerciales

4.5. Procedimiento

Antes de realizar el análisis verifique las condiciones cromatográficas mostradas en el cuadro 17.

Cuadro 17. Condiciones experimentales del análisis cromatográfico de cafeína por la técnica de cromatografía líquida.

Característica	Valor
Columna	Agilent, Eclipse Plus (C18)
Largo	100 mm
Diámetro Interno	4.6 mm
Tamaño de partícula	3.5 μm
Cantidad inyectada (lazo)	5 μL
Disolución de aforo	agua desionizada tipo I
Fase móvil	agua: acetonitrilo 95:5 90:10
Flujo	1.0 mL/min

4.5.1. Curva de calibración

1. Mida alícuotas de 1.00; 2.00; 3.00; 4.00 y 5.00 mL de la disolución patrón de 100 mg/L de cafeína y colóquelas en los respectivos balones aforados de 10.00 mL.
2. Complete con agua desionizada
3. Si fuera necesario filtre cada muestra de agua a través de un filtro de membrana de 0.45 μm con una jeringa de 5 o 10 mL.
4. Recoja parte de este en un vial rotulado para tal efecto.
5. Inyecte cada disolución o colóquelo en el automuestreador, si lo hubiese.

4.5.2. Preparación de la muestra

1. Mida 1,00 mL de incógnita y deposítela en un balón aforado de 10.00 mL o en su efecto, la dilución más apropiada para el rango lineal de calibración elaborado.
2. Afore con agua o fase móvil. Realice por duplicado.
3. Continúe el procedimiento descrito desde el punto 3 de la subsección anterior.

5. Tratamiento de datos

1. Determine la repetibilidad de las inyecciones en la incógnita y evalúe la precisión de las mismas, para ello tome el tiempo de retención T_r y calcule el promedio con su respectivo desvío estándar.
2. Calcule el número de platos teóricos (N) y la altura de los mismos para la columna.
3. Calcule f (factor de respuesta) ($f= C/A$), a partir de los patrones de cafeína. Puede hacer el promedio de los patrones. (**)
4. Luego úselos para calcular la concentración de la incógnita.
5. Construya el modelo de regresión lineal para realizar la cuantificación respectiva de la concentración de cafeína en las muestras analizadas. No olvide hacer la estimación de incertidumbre respectiva hacia como la estimación de precisión (%RSD).
6. Compare el valor de la concentración calculada con el factor de respuesta (f), respecto a la obtenida mediante la curva de calibración.

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 4 horas.

7. Bibliografía especializada



- Aung, W. L., Kyaw, M., Hlaing, T. M., & Zaw, T. (2020). Determination of caffeine content in different brands of pure coffee, instant coffee and tea available in the naypyitaw market. *International Journal of Engineering Applied Sciences and Technology*, 5(4), 500–504.
- Belay, A.; Ture, K.; Redi, M.; Asfaw, A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry*, 108 (2008) 310-315. Doi <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.024>
- Chirfa, G., Merdassa, Y., & Gure, A. (2020). Salting-out Assisted Liquid–Liquid Extraction for Analysis of Caffeine and Nicotinic Acid in Coffee by HPLC–UV/Vis Detector. *Journal of Analysis and Testing*, 4(4), 298–306. <https://doi.org/10.1007/s41664-020-00148-7>
- Eticha, S., & Bedassa, T. (2020). Determination of Caffeine in Coffee Samples by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Violet - Visible Spectrophotometry Methods from Wollega, Ethiopia. *International Journal of*

Biochemistry, Biophysics & Molecular Biology, 5(1), 8.
<https://doi.org/10.11648/j.ijbbmb.20200501.12>

- Imanulkhan, Setyaningsih, W., Rohman, A., & Palma, M. (2020). Development and validation of hplc-dad method for simultaneous determination of seven food additives and caffeine in powdered drinks. *Foods*, 9(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods9081119>
- Sancho, A. Estudio comparativo del contenido de cafeína en diferentes bebidas. Escuela de Ingeniería y Arquitectura, Universidad de Zaragoza, España. 2013
- Santiago, W. D., Teixeira, A. R., Santiago, J. de A., Lopes, A. C. A., Brandão, R. M., Caetano, A. R., Cardoso, M. das G., & Resende, M. L. V. (2020). Development and validation of chromatographic methods to quantify organic compounds in green coffee (*Coffea arabica*) beans. *Australian Journal of Crop Science*, 14(8), 1275–1282. <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.08.p2433>
- Solís-Montiel, E., Fernández-Araya, J.F. 2016. Manual de Laboratorio de Análisis Instrumental. Escuela de Química, Universidad Nacional.
- Skoog, D. A., Holler J. y Crouch, S. 2008. Principios de análisis instrumental, 6 edición. Cengage Learning Editores, México.
- Srdjenovic, B. Djordjevic-Mili, V. Gruji, N. Injac, R. Lepojevic, Z. Simultaneous HPLC determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Food, Drinks, and Herbal Products. *Journal of Chromatographic Science* 46 (2008) 144-149
- Ziak, L.; Májek, P.; Hroboňová, K.; Cacho, F.; Sadecka, J. Simultaneous determination of caffeine, caramel and riboflavin in cola-type and energy drinks by synchronous fluorescence technique coupled with partial least squares. *Food Chemistry* 159 (2014) 282–286. Doi <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.034>

8. Gestión de residuos. DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA POR HPLC

Cuadro 18. Gestión de residuos de la práctica determinación de cafeína por HPLC

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas y residuos de incógnitas	cafeína	4	4	líquido	
Residuos de disoluciones para equipo	Fase móvil (acetato de amonio)	3	3	líquido	
	Metanol	3			
	acetonitrilo	3			
	iPA	3			
Observaciones	En las disoluciones del equipo se debe contemplar la del drenaje del equipo, estas tienen la misma naturaleza y por ende la misma segregación				

EXPERIMENTO 11

ANÁLISIS DEL CONTENIDO IÓNICO EN AGUAS DE CONSUMO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE IONES

1. Contenidos

- 1.1. Identificación de los principios que sustentan las separaciones y mediciones en cromatografía de iones.
- 1.2. Análisis de las principales variables de optimización para los métodos cromatográficos aplicados a la detección de iones.
- 1.3. Estudio de la concentración de iones disueltos en aguas de consumo.
- 1.4. Determinación de los límites de detección y cuantificación para las especies analizadas.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante deberá poseer conocimientos básicos de la técnica de cromatografía líquida, así como un manejo adecuado de la herramienta para el análisis de datos de Excel o del lenguaje de programación R; además deberá ser capaz de hacer pruebas de contraste entre medias y determinar los límites de detección y cuantificación de técnicas analíticas.

3. Introducción

La cromatografía de iones (CI) es una técnica analítica que puede ser entendida como una variante a la cromatografía líquida de fase reversa (CLFR), cuyo interés de aplicación se centra en la determinación de iones disueltos, principalmente en una matriz acuosa. Además del ámbito de aplicación de esta técnica, existen diferencias importantes en relación con la CLFR como la preparación que requieren las muestras, la naturaleza química de los eluentes, los materiales que componen las columnas cromatográficas, los métodos de detección y la inclusión de una etapa entre la salida de la columna y la entrada al detector, llamada supresión de conductividad; no obstante, los procesos y principios generales de la cromatografía líquida, son también aplicados a esta técnica.

Las muestras analizadas por CI, normalmente no requieren procesos complejos de preparación, en la mayoría de casos, basta con un filtrado con una membrana de 0.45 μm para ser introducidas al sistema; no obstante, para aplicaciones donde la muestra puede contener fuerza iónica importante u otros constituyentes capaces de interferir en la claridad de la señal o separación del analito (aguas residuales, aguas marinas, lixiviados, extractos acuosos de matrices alimenticias o de sedimentos, entre otros), se requiere de procesos de dilución o de limpieza de las muestras mediante extracción en fase sólida.

El proceso de separación en esta técnica, está determinado por los procesos de interacción existentes entre los analitos y la matriz de intercambio iónico utilizada como fase estacionaria, estos procesos son influenciados por variables como: el tamaño y la carga del ion, así como por la velocidad y la fuerza del eluyente, entre las sustancias utilizadas para este fin están compuestos ácidos como: el ácido metasulfónico, nítrico u oxálico, mientras que eluentes como: el hidróxido de potasio, carbonato de sodio y carbonato ácido de sodio, son utilizados en las determinaciones de aniones.

La principal diferencia de esta técnica en relación con la CLFR, radica en la inclusión de una etapa intermedia entre la separación y la detección de los iones, llamada supresión de conductividad, la cual tiene como objetivo atenuar la conductividad eléctrica que aporta la fase móvil en aras de detectar con mayor sensibilidad la señal de los analitos; ya sea por un mecanismo de supresión químico o electrolítico, en ambos casos el fundamento radica en una reacción ácido-base que neutraliza los iones hidronio o hidroxilo responsables de la fuerza iónica de la fase móvil.

Partiendo del principio que los analitos separados en esta técnica son especies con carga eléctrica, puede resultar básico que el método de detección más utilizado es el diferencial de conductividad, no obstante, no está de más indicar que para aplicaciones muy específicas (ej. especiación de cromo, metales de transición, lantánidos o actínidos) pueden ser utilizados detectores de absorción de radiación UV-Vis o incluso de fluorescencia.

Los rangos lineales de trabajo en esta técnica oscilan entre las decimas y centenas de partes por millón con valores de recuperación entre 80-110%, por su parte los límites de detección alcanzados pueden ser de decenas de partes por billón; lo anterior, aunado al poco o nulo procesamiento de muestra requerido, así como a la capacidad intrínseca de la cromatografía para realizar separación y detección simultánea de dos o más componentes, le confieren a esta técnica, múltiples aplicaciones en el campo ambiental, industrial, alimentario y médico, incluso para ser utilizada como base en metodologías regulatorias o de control de calidad. Diferentes estudios demuestran la aplicación de esta técnica para la detección de cloruros, nitritos y nitratos en muestras de carne, determinación de la composición química de agua de lluvia y niebla, caracterizaciones hidrogeoquímicas de aguas subterráneas, superficiales marinas y de lagos; así como el uso en el monitoreo de la calidad del agua de consumo en sistemas de abastecimiento a la población.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha emitido lineamientos que pretenden servir como guías para evaluar la calidad del agua de consumo humano, estas a su vez, han servido como base en diferentes países para reglamentar los valores recomendados y máximos admisibles en relación con la concentración de sustancias disueltas en el agua. Bajo este escenario, resulta necesario poder detectar y medir la concentración de varios componentes iónicos que se encuentran de manera natural en las aguas, siendo la cromatografía iónica una solución que se

ha tipificado como método base para este propósito, algunos ejemplos son el método 300.1 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA) y el método 4110 de los métodos estándares para la examinación del agua y agua residual.

En este experimento se determinará el contenido iónico en muestras de agua de consumo mediante cromatografía líquida con detección de conductividad y supresión electrolítica, además, se determinarán los límites de detección y cuantificación a partir de los modelos de regresión lineal utilizados para el cálculo de las concentraciones de cada ion. Finalmente, los resultados serán comparados con el Reglamento para la Calidad del Agua Potable (Decreto N°38924-S) y se realizarán pruebas de inferencia estadística para determinar si existe diferencia significativa entre las medias para algunos iones del agua según la región de muestreo.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Agua desionizada tipo I
- Fase móvil aniónica (Hidróxido de potasio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio)
- Fase móvil catiónica (Ácido metasulfónico, Ácido nítrico)
- Disoluciones patrón de cationes (1000 mg/L del analito de interés)
- Disoluciones patrón de aniones (1000 mg/L del analito de interés)

4.2. Materiales

- Material volumétrico y cristalería de laboratorio general
- Viales para automuestreador

4.3. Instrumentación requerida

- Cromatógrafo de iones con capacidad de análisis dual

4.4. Muestras para análisis

- Muestras de agua de consumo tomadas de diferentes regiones del país.

4.5. Procedimiento

Antes del análisis verifique las condiciones cromatográficas que se muestran en el cuadro 19.

Cuadro 19. Condiciones cromatográficas recomendadas para el análisis de cationes y aniones mediante el cromatógrafo ThermoScientific ICS-5000+EG

Variable	Especificación		
	Aniones	Cationes	
Guarda columna	AG18 (2 x 50 mm)	CG18 (2 x 50 mm)	
Columna analítica	AS18 (2 x 250 mm)	CS18 (2 x 250 mm)	
Eluente	t (min)	KOH (mM)	36 mM Ácido metasulfónico
	0	10 mM	
	17	23 mM	
	19	23mM	
	20	10mM	
Flujo	0.25 mL/min (isocrático)	0.40 mL/min (isocrático)	
Volumen de inyección	10 µL	10 µL	
Supresión	AERS 2mm	CERS 2mm	
Amperaje del supresor	11 mA	30 mA	
Temperatura de la columna	35 °C	35 °C	
Temperatura del detector	35 °C	35 °C	
Tiempo de corrida	27.5min		

4.5.1. Preparación de la muestra

Las muestras analizadas deben estar libres de sólidos en suspensión para evitar saturación de los filtros que se encuentran en las tapas de los viales u obturación de las tuberías capilares del sistema cromatográfico, esto se puede asegurar haciendo pasar la muestra por un filtro de 0,45 µm de poro.

Las muestras posteriormente se depositan y son selladas en los viales correspondientes al sistema automuestreador utilizado.

4.5.2. Preparación de los estándares a utilizar para la construcción de modelos lineales de regresión

Utilizando disoluciones estándar de 1000 mg/L de cada ion de interés, prepare 200.00 mL de una "disolución de trabajo" mixta con las concentraciones indicadas en el cuadro 20 para cada analito.

Cuadro 20. Concentración recomendada para cada ion de interés en la disolución de trabajo.

Aniones		Cationes	
Ion	Concentración (mg/L)	Ion	Concentración (mg/L)
Fluoruro	10	Litio	10
Cloruro	100	Sodio	100
Nitrito	25	Amonio	10
Bromuro	50	Magnesio	100
Nitrato	100	Potasio	50
Sulfato	100	Calcio	100

Se prepara una disolución de trabajo mixta para aniones y otra para cationes, lo anterior debido a que los estándares de cada ion son preparados a partir de sales de nitrato y cloruro para el caso de los cationes y de sodio o potasio para el caso de los aniones.

A partir de estas disoluciones de trabajo, prepare 100.00 mL para cada nivel de concentración a incluir en el modelo de regresión lineal; se recomienda preparar entre 5 y 7 niveles de concentración, cuyas alícuotas serían 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00, 15.00, 30.00 y 50.00 mL.

4.5.3. Preparación de controles de calidad.

Los controles de calidad para evaluar la recuperación del sistema cromatográfico pueden realizarse con matriz o sin matriz. En ambos casos, calcule el volumen de alícuota necesario para preparar una disolución cuya concentración en los iones de interés sea próxima o inferior, al nivel máximo de calibración (si no utiliza matriz, la concentración puede ser próxima a este último valor), posteriormente afore con agua desionizada tipo I o con matriz, según corresponda.

5. Tratamiento de datos

1. Construya los modelos de regresión lineal para cada ion analizado (Análisis gráfico y estadístico de la regresión).
2. Calcule los límites de detección y cuantificación a partir de la estadística de cada modelo.
3. Cuantifique la concentración de cada ion analizado en las muestras de agua, reporte adecuadamente las concentraciones no cuantificables o detectables, según corresponda.
4. Realice una comparación de las concentraciones obtenidas, con relación al Reglamento para la Calidad del Agua Potable (Decreto N°38924-S).
5. Determine si existe diferencia estadísticamente significativa entre la concentración promedio de cada ion, de acuerdo con la región donde la muestra fue colectada.

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El tiempo estimado para la preparación de muestras, estándares de calibración y controles de calidad es de 4 horas, no obstante, el análisis de cada corrida cromatográfica puede oscilar de 20-30 minutos, por lo que se aprovechará la capacidad de auto inyección brindada por el equipo.

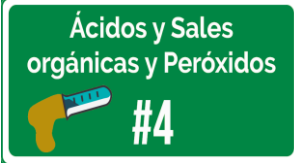
7. Bibliografía especializada

- Baue, K.-H., & Gluhak, T. (2019). Ion chromatography in water analysis. Retrieved May 18, 2020, from Wiley Analytical Science website: <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitlab.18459>
- D'Amore, T., Di Taranto, A., Vita, V., Berardi, G., & Iammarino, M. (2019). Development and Validation of an Analytical Method for Nitrite and Nitrate Determination in Meat Products by Capillary Ion Chromatography (CIC). *Food Analytical Methods*, 12(8), 1813–1822. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01529-0>
- Gros, N. (2013). Ion chromatographic analyses of sea waters, brines and related samples. *Water (Switzerland)*, 5(2), 659–676. <https://doi.org/10.3390/w5020659>
- Lopez-Moreno, C., Viera-Perez, I., & Urbano, A. M. (2016). Development and validation of an ionic chromatography method for the determination of nitrate, nitrite and chloride in meat. *Food Chemistry*, 194, 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.017>
- Michalski, R. (2018). Ion chromatography applications in wastewater analysis. *Separations*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/separations5010016>
- Pfaff, J. D., Hautman, D. P., & Munch, D. J. (1999). Method 300.1: Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography. In *U.S. Environmental Protection Agency* (pp. 1–40). Cincinnati, Ohio.
- Sinniah, K., & Piers, K. (2001). Ion chromatography: Analysis of ions in pond waters. *Journal of Chemical Education*, 78(3), 358–362. <https://doi.org/10.1021/ed078p358>
- Sánchez-Gutiérrez, R., Mena-Rivera, L., Sánchez-Murillo, R., Fonseca-Sánchez, A., & Madrigal-Solís, H. (2020). Hydrogeochemical baseline in a human-altered landscape of the central Pacific coast of Costa Rica. *Environmental Geochemistry and Health*, 5. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00501-5>
- Sánchez-Gutiérrez, R., Benavides-Benavides, C., Chaves-Villalobos, M., & Quirós-Vega, J. (2020). Calidad del agua para consumo humano en una comunidad rural : caso Corral de Piedra , Guanacaste , Costa Rica. *Tecnología En Marcha*, 33(2), 3–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.18845/tm.v33i2.4165>
- Srinivasan, K. (2017). Ion Chromatography Instrumentation for Water Analysis. In *Chemistry and Water: The Science Behind Sustaining the World's Most Crucial Resource*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809330-6.00009-X>
- Thermo Scientific. (2016). Ion Chromatography. *Ion Chromatography: Municipal Water Analysis Applications Summary*, 2–33. Retrieved from <https://www.thermoscientific.com>
- Vásquez Morera, T., Alfaro Solís, R., Sibaja Brenes, J., Esquivel Hernández, G., & Valdés González, J. (2012). Composición química del agua de lluvia y de niebla recolectada en la reserva biológica Monteverde. *Uniciencia*, 26(1), 51–64.
- Wang, H., Zhu, B., Shen, L., Xu, H., An, J., Xue, G., & Cao, J. (2015). Water-soluble ions in atmospheric aerosols measured in five sites in the Yangtze River Delta, China: Size-fractionated, seasonal variations and sources. *Atmospheric Environment*, 123, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.05.070>

- Water Corporation. (2001). Systems for Ion Experience a Higher Level of Performance.

8. Gestión de residuos.

Cuadro 21. Gestión de residuos de la práctica de cromatografía de iones.

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones y residuos del equipo	Fase móvil aniónica	6	4	Líquido	
	Fase móvil catiónica	4			
	Patrones de trabajo mixtos	6			
Observaciones	En las disoluciones del equipo se debe contemplar la del drenaje del equipo, estas tienen la misma naturaleza y por ende la misma segregación. En caso de obtener alguno de los reactivos o soluciones sin contaminar con otras disoluciones procure segregárlas por separado.				

SECCIÓN V. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS EXPERIMENTO 12

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO ALCHÓLICO EN LICORES COMERCIALES DE ALTA GRADUACIÓN.

1. Contenidos

- 1.1. Aplicación de métodos instrumentales sencillos utilizados en la industria para el control de calidad de productos.
- 1.2. Identificación de los principios que sustentan las mediciones refractométricas y densimétricas de mezclas binarias.
- 1.3. Determinación de la concentración de alcohol presente en licores comerciales de alta graduación tipo destilados.
- 1.4. Comparación de la concentración de alcohol presente en un licor comercial obtenida a través de la técnica densimétrica y refractométrica
- 1.5. Comparación del contenido alcohólico indicado en las tablas de concentración con respecto al método de calibración por medio de estándar externo.

2. Conocimientos previos requeridos

El estudiante deberá tener un manejo adecuado de la técnica de pipeteo y del uso de material volumétrico en general, así como del uso de balanza analítica; además deberá ser capaz de hacer pruebas de contraste entre medias.

3. Introducción

El alcohol etílico es una de las sustancias más simples de este grupo funcional de compuestos orgánicos, su polaridad, le confiere la propiedad de miscibilidad en agua. La producción de alcohol involucra una serie de procesos unitarios, siendo la fermentación de azúcares y la destilación posterior de la mezcla, los procesos más importantes para obtener esta sustancia en un variado rango de graduaciones.

Esta sustancia ha sido introducida en la dieta humana cientos de años atrás en gran diversidad de alimentos, principalmente en bebidas fermentadas, destiladas y fortificadas. No obstante, el uso del alcohol en la industria alimenticia también se remonta a la utilización de disoluciones de esta sustancia como disolvente de ingredientes tales como: tintes, especias y sabores.

Debido a la amplitud de aplicaciones industriales, las mezclas de alcohol etílico normalmente son sometidas a procesos de aseguramiento de calidad que permitan verificar las especificaciones en relación con las concentraciones de las mezclas. Hoy en día existen diversas técnicas analíticas cuantitativas mediante las cuales se puede medir el contenido alcohólico en una mezcla, algunas de ellas, más sencillas

que otras, con rangos de trabajo y limitaciones analíticas diferentes. Entre las técnicas más utilizadas podemos citar: métodos enzimáticos, espectrometría de infrarrojo cercano con transformada de Fourier, cromatografía en fase líquida y/o gaseosa, espectrofotometría de absorción molecular por retroceso, densimetría por hidrometría o gravimetría específica e índice de refracción.

Las técnicas basadas en el índice de refracción y en la densimetría, poseen limitaciones en relación con el tipo de matriz y a la incapacidad para determinar más de un tipo de alcohol, esto debido a que un supuesto básico para aplicar estos métodos de análisis reside en que la mezcla debe ser binaria, ya que en principio la concentración del componente, será proporcional a la densidad de la mezcla, por lo tanto, esto limita el análisis de mezclas que posean más de un tipo de alcohol, o bien que posean concentraciones importantes de otros componentes como los azúcares, puesto que estos modificarán la densidad de la mezcla y por ende afecta el fundamento teórico que sustenta a estas metodologías. A pesar de lo anterior, es importante destacar que estas poseen la ventaja de ser métodos muy fáciles de implementar a nivel de laboratorio e incluso son ampliamente utilizadas a nivel de planta industrial, ya que no requieren instrumentos muy especializados, alta capacitación, gran cantidad de insumos y que además la obtención de resultados es bastante rápida,

La densimetría por gravimetría consiste en obtener un valor de gravedad específica para la mezcla mediante la relación de la masa de la sustancia y la masa del agua, esto en un volumen específico, normalmente se utiliza el picnómetro como instrumento volumétrico para contener a la sustancia previa a la medición de sus masas. Por su parte la refractometría consiste en la medición del índice de refracción de las mezclas por analizar, el índice de refracción es la capacidad de una sustancia para desviar un haz de luz cuando pasa de un medio a otro cuyas densidades son diferentes, este fenómeno está gobernado por la Ley de Snell. Para ambas metodologías, los valores obtenidos, pueden ser correlacionados con la composición porcentual de alcohol ya sea mediante un estándar externo o tablas validadas por entes internacionales como el AOAC.

En este experimento se determinará el contenido alcohólico en licores comerciales de alta graduación mediante dos técnicas analíticas las cuales son de amplio uso industrial, a la vez se compararán los resultados obtenidos cuando las mediciones realizadas se cuantifican contra un estándar externo o mediante tablas de composición validadas por entes internacionales.

4. Sección experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

- Agua desionizada
- Etanol absoluto (o de concentración conocida)

4.2. Materiales

- Material volumétrico y cristalería de laboratorio
- Picnómetros

4.3. Instrumentación requerida

- Refractómetro Abbé o similar

4.4. Muestras para análisis

- Muestras de licor comercial de alta graduación

4.5. Procedimiento

4.5.1. Preparación de la muestra

Las muestras analizadas deben estar libres de sólidos en suspensión para evitar interferencias ópticas o alteración de la densidad, para ello se hace pasar la muestra por un filtro de 0,4 μm .

Si el licor es coloreado, se recomienda eliminar la coloración del mismo añadiendo 5g de carbón activado a 100 mL de la muestra. Esto se realiza con agitación constante durante al menos 20 minutos, posteriormente se filtra la muestra para eliminar el sólido.

4.5.2. Determinación densimétrica de alcohol.

Mida la masa de un picnómetro limpio y seco, posteriormente adicione agua desionizada y afore el contenido del mismo, asegúrese que el agua se encuentre a 20 °C y que el picnómetro se encuentre totalmente lleno. Mida la masa de este picnómetro asegurándose que no existan gotas de agua derramada en la superficie exterior del mismo. Repita este procedimiento 2 veces más.

Enjuague el picnómetro al menos 3 veces con la muestra a la cual se le determinará el contenido de alcohol, repita el procedimiento descrito anteriormente con el objetivo de obtener 3 mediciones de la muestra. Es importante que las mediciones de masa para la muestra y el agua se realicen a la misma temperatura.

4.5.3. Determinación refractométrica de alcohol.

Prepare una curva de calibración en el rango de 0-5 % v/v de etanol. Para esto tome alícuotas de 100-500 μL del etanol absoluto, deposítelos en balones aforados de 10 mL y afore con agua desionizada.

De las muestras para analizar se toma 1 mL y se deposita en balón aforado de 10 mL, complete el aforo con agua desionizada. Este procedimiento se realiza por quintuplicado.

El índice de refracción para los patrones y muestras se miden en un refractómetro tipo abbé o similar, siguiendo las indicaciones del fabricante del instrumento.

5. Tratamiento de datos

1. Con los resultados obtenidos en el inciso b, calcule la gravedad específica del triplicado realizado al licor comercial. Utilice el material suplementario de este experimento para convertir los valores de gravedad específica en % v/v de etanol en la muestra.

2. Grafique la curva de calibración realizada en el inciso c y calcule la concentración en %v/v de etanol para del quintuplicado de la muestra a partir de la regresión lineal.

3. Con los mismos valores quintuplicados del índice de refracción y utilizando el material suplementario de este experimento, calcule el % v/v en la muestra.

4. Para cada resultado promedio calculado anteriormente reporte la desviación estándar, el coeficiente de variación, la incertidumbre y el porcentaje de error respecto al valor nominal en la etiqueta.

5. Determine si existe diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos utilizados para el cálculo de la concentración de etanol mediante la técnica refractométrica (Tablas y estándar externo)

6. Determine si existe diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido por densimetría y refractometría, tomando como base los valores obtenidos con las tablas del material suplementario.

6. Tiempo estimado para el desarrollo del experimento

El tiempo estimado para el desarrollo de este experimento es de 4 horas.

7. Bibliografía especializada

- Bakalinsky, A. T., & Penner, M. . (2003). ALCOHOL: Properties and Determination. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd Editio, pp. 107–111). doi:10.1016/B0-12-227055-X/00024-9


- Barboza, F. D., & Poppi, R. J. (2003). Determination of alcohol content in beverages using short-wave near-infrared spectroscopy and temperature correction by transfer calibration procedures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(4), 695–701. doi:10.1007/s00216-003-2128-2

- Gerogiannaki-Christopoulou, M., Kyriakidis, N. V., & Athanasopoulos, P. E. (2003). New refractive index method for measurement of alcoholic strength of small volume samples. *Journal of AOAC International*, 86(6), 1232–1235. doi:10.1093/jaoac/86.6.1232

- González-Rodríguez, J., Pérez-Juan, P., & Luque De Castro, M. D. (2003). Determination of ethanol in beverages by flow injection, pervaporation and density measurements. *Talanta*, 59(4), 691–696. doi:10.1016/S0039-9140(02)00612-4
- Nguyen, N. L. T., Baek, S. H., Akbar, Z. A., Jang, S. Y., Ha, S., Park, J. P., & Park, T. J. (2018). Rapid Determination of Ethyl Alcohol in Alcoholic Beverages Using a Fluorescent Nanofiber Film. *Biochip Journal*, 12(3), 240–248. doi:10.1007/s13206-017-2305-6
- Spedding, G. (2016). Alcohol and Its Measurement. In *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence*. doi:10.1016/B978-0-12-799954-8.00007-1
- Wang, M. L., Choong, Y. M., Su, N. W., & Lee, M. H. (2003). A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(2), 133–140.
- Solís-Montiel, E., Fernández-Araya, J.F. 2016. Manual de Laboratorio de Análisis Instrumental. Escuela de Química, Universidad Nacional.

8. Gestión de residuos.

Cuadro 22. Gestión de residuos de la práctica de determinación del contenido alcohólico en licores comerciales de alta concentración.

Proceso	Reactivos	Número de prioridad	Prioridad de mezcla	Estado físico	Recipiente de residuos
Residuos de disoluciones preparadas	etanol	3	3	líquido	
Observaciones	A pesar de caracterizarse como Disolventes Orgánicos No Halogenados puede disponerse como un residuo ordinario y depositarse en la pila al tratarse de diluciones de un producto comercial.				

SECCIÓN VI. ANEXOS

Anexo 1. Densidad del agua en función de la temperatura

1 atm		0,8 atm		0,6 atm		0,4 atm	
Temperatura (K)	Densidad (g/mL)	Temperatura (K)	Densidad (g/mL)	Temperatura (K)	Densidad (g/mL)	Temperatura (K)	Densidad (g/mL)
273,16	0,99984	273,16	0,99983	273,16	0,99982	273,16	0,99981
274,16	0,9999	274,16	0,99989	274,16	0,99988	274,16	0,99987
275,16	0,99994	275,16	0,99993	275,16	0,99992	275,16	0,99991
276,16	0,99997	276,16	0,99996	276,16	0,99995	276,16	0,99994
277,16	0,99997	277,16	0,99996	277,16	0,99995	277,16	0,99994
278,16	0,99997	278,16	0,99996	278,16	0,99995	278,16	0,99994
279,16	0,99994	279,16	0,99993	279,16	0,99992	279,16	0,99991
280,16	0,9999	280,16	0,99989	280,16	0,99988	280,16	0,99987
281,16	0,99985	281,16	0,99984	281,16	0,99983	281,16	0,99982
282,16	0,99978	282,16	0,99977	282,16	0,99976	282,16	0,99975
283,16	0,9997	283,16	0,99969	283,16	0,99968	283,16	0,99967
284,16	0,99961	284,16	0,9996	284,16	0,99959	284,16	0,99958
285,16	0,9995	285,16	0,99949	285,16	0,99948	285,16	0,99947
286,16	0,99938	286,16	0,99937	286,16	0,99936	286,16	0,99935
287,16	0,99925	287,16	0,99924	287,16	0,99923	287,16	0,99922
288,16	0,9991	288,16	0,99909	288,16	0,99908	288,16	0,99907
289,16	0,99894	289,16	0,99894	289,16	0,99893	289,16	0,99892
290,16	0,99878	290,16	0,99877	290,16	0,99876	290,16	0,99875
291,16	0,9986	291,16	0,99859	291,16	0,99858	291,16	0,99857
292,16	0,99841	292,16	0,9984	292,16	0,99839	292,16	0,99838
293,16	0,99821	293,16	0,9982	293,16	0,99819	293,16	0,99818
294,16	0,99799	294,16	0,99798	294,16	0,99797	294,16	0,99797
295,16	0,99777	295,16	0,99776	295,16	0,99775	295,16	0,99774
296,16	0,99754	296,16	0,99753	296,16	0,99752	296,16	0,99751
297,16	0,9973	297,16	0,99729	297,16	0,99728	297,16	0,99727
298,16	0,99705	298,16	0,99704	298,16	0,99703	298,16	0,99702
299,16	0,99678	299,16	0,99677	299,16	0,99677	299,16	0,99676
300,16	0,99651	300,16	0,9965	300,16	0,99649	300,16	0,99649
301,16	0,99623	301,16	0,99622	301,16	0,99621	301,16	0,99621
302,16	0,99594	302,16	0,99594	302,16	0,99593	302,16	0,99592
303,16	0,99565	303,16	0,99564	303,16	0,99563	303,16	0,99562
304,16	0,99534	304,16	0,99533	304,16	0,99532	304,16	0,99531
305,16	0,99502	305,16	0,99502	305,16	0,99501	305,16	0,995
306,16	0,9947	306,16	0,99469	306,16	0,99468	306,16	0,99467
307,16	0,99437	307,16	0,99436	307,16	0,99435	307,16	0,99434

308,16	0,99403	308,16	0,99402	308,16	0,99401	308,16	0,994
309,16	0,99368	309,16	0,99367	309,16	0,99366	309,16	0,99366
310,16	0,99333	310,16	0,99332	310,16	0,99331	310,16	0,9933
311,16	0,99296	311,16	0,99295	311,16	0,99294	311,16	0,99294
312,16	0,99259	312,16	0,99258	312,16	0,99257	312,16	0,99256
313,16	0,99221	313,16	0,9922	313,16	0,99219	313,16	0,99219
314,16	0,99183	314,16	0,99182	314,16	0,99181	314,16	0,9918
315,16	0,99143	315,16	0,99142	315,16	0,99141	315,16	0,99141
316,16	0,99103	316,16	0,99102	316,16	0,99101	316,16	0,99101
317,16	0,99062	317,16	0,99061	317,16	0,99061	317,16	0,9906
318,16	0,99021	318,16	0,9902	318,16	0,99019	318,16	0,99018
319,16	0,98979	319,16	0,98978	319,16	0,98977	319,16	0,98976
320,16	0,98936	320,16	0,98935	320,16	0,98934	320,16	0,98933
321,16	0,98892	321,16	0,98891	321,16	0,9889	321,16	0,9889
322,16	0,98848	322,16	0,98847	322,16	0,98846	322,16	0,98845
323,16	0,98803	323,16	0,98802	323,16	0,98801	323,16	0,988
324,16	0,98757	324,16	0,98757	324,16	0,98756	324,16	0,98755
325,16	0,98711	325,16	0,9871	325,16	0,9871	325,16	0,98709
326,16	0,98664	326,16	0,98664	326,16	0,98663	326,16	0,98662
327,16	0,98617	327,16	0,98616	327,16	0,98615	327,16	0,98614
328,16	0,98569	328,16	0,98568	328,16	0,98567	328,16	0,98566
329,16	0,9852	329,16	0,98519	329,16	0,98518	329,16	0,98517
330,16	0,98471	330,16	0,9847	330,16	0,98469	330,16	0,98468
331,16	0,98421	331,16	0,9842	331,16	0,98419	331,16	0,98418
332,16	0,9837	332,16	0,98369	332,16	0,98368	332,16	0,98368
333,16	0,98319	333,16	0,98318	333,16	0,98317	333,16	0,98316
334,16	0,98267	334,16	0,98266	334,16	0,98266	334,16	0,98265
335,16	0,98215	335,16	0,98214	335,16	0,98213	335,16	0,98212
336,16	0,98162	336,16	0,98161	336,16	0,9816	336,16	0,98159
337,16	0,98109	337,16	0,98108	337,16	0,98107	337,16	0,98106
338,16	0,98055	338,16	0,98054	338,16	0,98053	338,16	0,98052
339,16	0,98	339,16	0,97999	339,16	0,97998	339,16	0,97997
340,16	0,97945	340,16	0,97944	340,16	0,97943	340,16	0,97942
341,16	0,97889	341,16	0,97888	341,16	0,97887	341,16	0,97886
342,16	0,97833	342,16	0,97832	342,16	0,97831	342,16	0,9783
343,16	0,97776	343,16	0,97775	343,16	0,97774	343,16	0,97773
344,16	0,97719	344,16	0,97718	344,16	0,97717	344,16	0,97716
345,16	0,97661	345,16	0,9766	345,16	0,97659	345,16	0,97658
346,16	0,97602	346,16	0,97601	346,16	0,976	346,16	0,97599
347,16	0,97543	347,16	0,97542	347,16	0,97541	347,16	0,9754
348,16	0,97484	348,16	0,97483	348,16	0,97482	348,16	0,97481

349,16	0,97424	349,16	0,97423	349,16	0,97422	349,16	0,97421
350,16	0,97363	350,16	0,97362	350,16	0,97361	349,32	0,97411
351,16	0,97302	351,16	0,97301	351,16	0,973		
352,16	0,9724	352,16	0,9724	352,16	0,97239		
353,16	0,97178	353,16	0,97178	353,16	0,97177		
354,16	0,97116	354,16	0,97115	354,16	0,97114		
355,16	0,97053	355,16	0,97052	355,16	0,97051		
356,16	0,96989	356,16	0,96988	356,16	0,96987		
357,16	0,96925	357,16	0,96924	357,16	0,96923		
358,16	0,9686	358,16	0,9686	358,16	0,96859		
359,16	0,96795	359,16	0,96795	359,16	0,96794		
360,16	0,9673	360,16	0,96729	359,41	0,96777		
361,16	0,96664	361,16	0,96663				
362,16	0,96597	362,16	0,96596				
363,16	0,9653	363,16	0,96529				
364,16	0,96463	364,16	0,96462				
365,16	0,96395	365,16	0,96394				
366,16	0,96326	366,16	0,96325				
367,16	0,96257	366,99	0,96268				
368,16	0,96188						
369,16	0,96118						
370,16	0,96048						
371,16	0,95977						
372,16	0,95906						
373,12	0,95837						

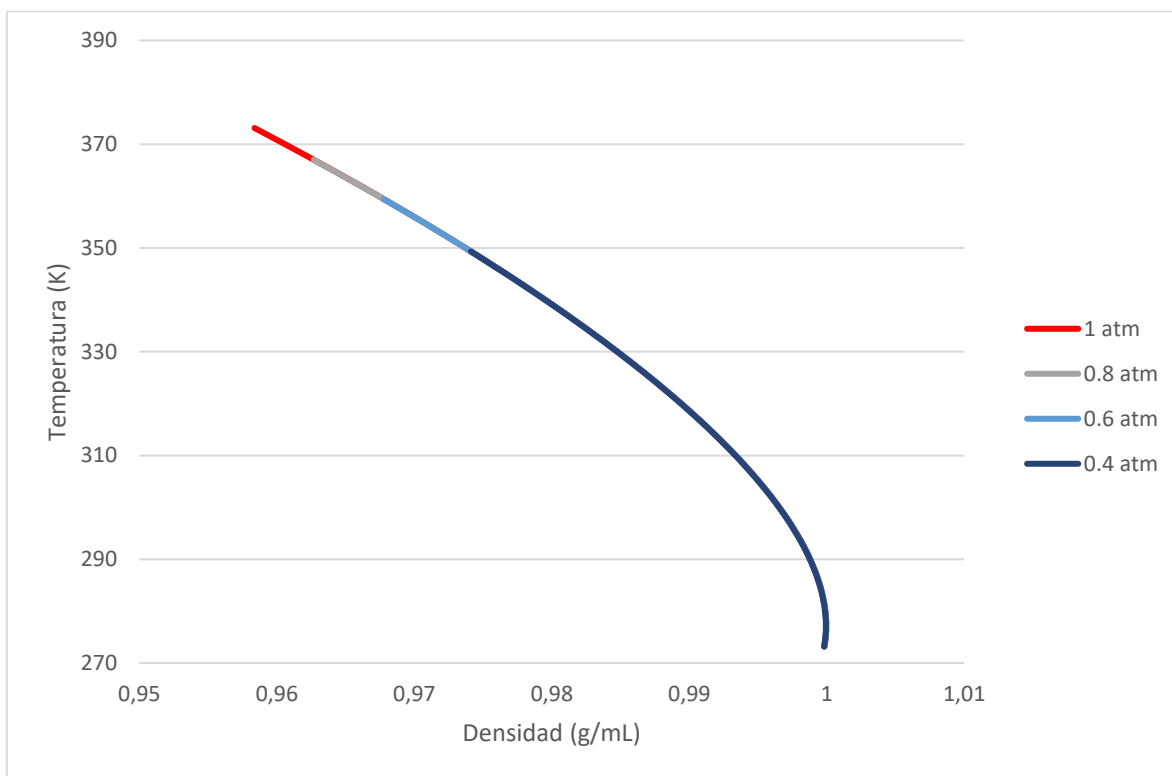


Figura 22. Isobaras para densidad del agua en función de la temperatura y a distintas presiones

Anexo 2. Tolerancia del material de uso común en el laboratorio.**Tolerancia para pipetas aforadas**

Clase	Capacidad (mL)	Tolerancia(\pm mL)
A	0,5	0,005
B	0,5	0,01
A	1	0,008
B	1	0,015
A	2	0,01
B	2	0,02
A	5	0,015
B	5	0,03
A	10	0,02
B	10	0,04
A	20	0,03
B	20	0,06
A	25	0,03
B	25	0,06
A	50	0,05
B	50	0,1
A	100	0,08
B	100	0,15
A	200	0,1
B	200	0,2

Tolerancia para buretas

Clase	Mínima división (mL)	Capacidad (mL)	Tolerancia (\pm mL)
A	0,02	10	0,02
B	0,02	10	0,05
A	0,05	25	0,03
B	0,05	25	0,05
A	0,1	50	0,05
B	0,1	50	0,1

Tolerancia para balones aforados

Clase	Capacidad (mL)	Tolerancia(\pm mL)
A	5	0,025
B	5	0,05
A	10	0,025
B	10	0,05
A	25	0,04
B	25	0,08
A	50	0,06
B	50	0,12
A	100	0,1
B	100	0,2
A	200	0,15
B	200	0,3
A	250	0,15
B	250	0,3
A	500	0,25
B	500	0,5
A	1000	0,4
B	1000	0,8
A	2000	0,6
B	2000	1,2

Fuentes: ISO 385, Laboratory glassware — Burettes, ISO 648, Laboratory glassware — Single-volume pipettes, ISO 1042, Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks

Anexo 3. Porcentaje por volumen a 15.56°C (60°F) de alcohol etílico correspondiente a la gravedad específica aparente a varias temperaturas.

Apparent Specific Gravity	15.56/15.56	20/20	22/22	24/24	25/25	26/26	28/28	30/30	32/32	34/34	35/35	36/36
1.0000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.9999	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.07
98	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13
97	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20
96	.27	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26	.26
95	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33	.33
94	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40	.40
93	.47	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46	.46
92	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53	.53
91	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60	.60
90	.67	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66	.66
89	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73
88	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80
87	.87	.87	.87	.87	.87	.87	.86	.86	.86	.86	.86	.86
86	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93	.93
85	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	.99	.99	.99	.99	.99
84	.07	.07	.07	.07	.07	.07	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06
83	.14	.14	.14	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13	.13
82	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.20	.19	.19	.19	.19	.19
81	.27	.27	.27	.27	.27	.27	.27	.26	.26	.26	.26	.26
80	.34	.34	.34	.34	.34	.34	.33	.33	.32	.32	.32	.32
79	.41	.41	.41	.40	.40	.40	.40	.39	.39	.39	.39	.39
78	.48	.48	.48	.47	.47	.47	.47	.46	.46	.46	.46	.46
77	.54	.54	.54	.54	.54	.54	.53	.53	.53	.53	.53	.53
76	.61	.61	.61	.60	.60	.60	.60	.59	.59	.59	.59	.59
75	.68	.68	.68	.67	.67	.67	.67	.66	.66	.66	.66	.66
74	.75	.75	.75	.74	.74	.74	.73	.73	.73	.72	.72	.72
73	.82	.81	.81	.81	.81	.80	.80	.80	.80	.79	.79	.79
72	.88	.88	.88	.87	.87	.87	.86	.86	.86	.85	.85	.85
71	.95	.95	.95	.94	.94	.94	.94	.93	.93	.92	.92	.92
70	2.02	2.02	2.02	2.01	2.01	2.01	2.01	2.00	2.00	0.99	0.99	0.99
69	.09	.09	.09	.08	.08	.08	.08	.07	.07	.07	.06	.06
68	.16	.15	.15	.14	.14	.14	.14	.14	.13	.12	.12	.12
67	.23	.22	.22	.21	.21	.21	.20	.20	.20	.19	.19	.19
66	.30	.29	.29	.28	.28	.28	.27	.27	.27	.26	.26	.26
65	.37	.36	.36	.35	.35	.35	.34	.34	.33	.32	.32	.32
64	.43	.43	.43	.42	.42	.42	.41	.41	.40	.39	.39	.39
63	.50	.50	.50	.49	.49	.49	.48	.48	.47	.46	.46	.46
62	.57	.57	.57	.56	.56	.56	.55	.54	.54	.53	.53	.53
61	.64	.64	.64	.63	.63	.63	.62	.61	.60	.60	.59	.59
60	.71	.70	.70	.70	.70	.70	.69	.68	.67	.67	.66	.66
59	.78	.77	.77	.77	.77	.77	.76	.75	.74	.74	.73	.73
58	.85	.84	.84	.83	.83	.83	.82	.82	.81	.81	.80	.80
57	.92	.91	.91	.90	.90	.90	.89	.88	.87	.87	.86	.86
56	.99	.98	.98	.97	.97	.97	.96	.95	.94	.94	.93	.93
55	3.06	3.05	3.05	3.04	3.04	3.04	3.03	3.02	3.01	3.01	3.00	3.00
54	.13	.12	.12	.11	.11	.11	.10	.09	.08	.08	.07	.07
53	.20	.19	.19	.18	.18	.18	.17	.16	.15	.15	.14	.14
52	.27	.26	.26	.25	.25	.25	.24	.23	.22	.22	.21	.21
51	.34	.33	.33	.32	.32	.32	.31	.30	.29	.28	.27	.27
50	.41	.40	.40	.39	.39	.39	.38	.37	.36	.35	.34	.34
49	.49	.47	.47	.46	.46	.46	.45	.44	.43	.42	.41	.41
48	.56	.54	.54	.53	.53	.53	.52	.51	.50	.49	.48	.48
47	.63	.61	.61	.60	.60	.60	.59	.58	.57	.56	.55	.55
46	.70	.68	.68	.67	.67	.67	.66	.65	.64	.63	.62	.62
45	.77	.76	.75	.74	.74	.74	.73	.72	.70	.69	.68	.68
44	.84	.83	.82	.81	.81	.81	.79	.78	.77	.76	.75	.75
43	.91	.90	.89	.88	.88	.88	.86	.85	.84	.83	.82	.82
42	.99	.97	.96	.95	.95	.95	.93	.92	.91	.90	.89	.89
41	4.06	4.04	4.03	4.02	4.02	4.02	4.00	.99	.98	.97	.96	.96
40	.13	.11	.10	.10	.09	.09	.07	4.06	4.05	4.04	4.03	4.03
39	.20	.18	.17	.17	.16	.16	.14	.13	.12	.11	.10	.10
38	.28	.26	.25	.25	.24	.23	.21	.20	.19	.18	.17	.17
37	.35	.33	.32	.32	.31	.30	.28	.27	.26	.25	.24	.24
36	.42	.40	.39	.39	.38	.37	.36	.35	.33	.32	.31	.30
35	.50	.48	.47	.46	.45	.44	.43	.42	.40	.39	.38	.37
34	.57	.55	.54	.53	.52	.51	.50	.49	.47	.46	.45	.44
33	.64	.62	.61	.60	.59	.58	.57	.56	.54	.53	.52	.51
32	.71	.69	.68	.67	.66	.65	.64	.63	.61	.60	.59	.58
31	.79	.77	.76	.75	.74	0.73	.72	.70	.68	.67	.66	.65
30	4.88	4.84	4.83	4.82	4.81	4.80	4.79	4.77	4.75	4.74	4.73	4.72
29	.93	.91	.90	.89	.88	.87	.86	.84	.82	.81	.80	.79
28	5.01	.98	.97	.96	.95	.94	.93	.91	.89	.88	.87	.86
27	.08	5.06	5.04	5.03	5.02	5.01	5.00	.98	.96	.95	.94	.93
26	.16	.13	.12	.11	.10	.09	.07	5.06	6.05	5.02	5.01	5.00
25	.23	.21	.19	.18	.17	.16	.14	.12	.10	.09	.08	.07
24	.31	.28	.26	.25	.24	.23	.21	.20	.18	.16	.15	.14
23	.39	.36	.34	.33	.32	.31	.29	.27	.25	.23	.22	.21
22	.46	.43	.41	.40	.39	.38	.36	.34	.32	.30	.29	.28
21	.54	.51	.49	.48	.47	.46	.44	.42	.40	.38	.37	.36
20	.61	.58	.56	.55	.54	.53	.51	.49	.47	.46	.44	.43
19	.69	.66	.64	.62	.61	.60	.59	.56	.54	.52	.51	.50
18	.77	.73	.71	.70	.69	.68	.66	.64	.62	.59	.58	.57
17	.84	.81	.79	.77	.76	.75	.73	.71	.69	.66	.65	.64
16	.92	.89	.86	.85	.84	.83	.80	.78	.76	.74	.73	.72
15	.99	.96	.94	.92	.91	.90	.87	.85	.83	.81	.80	.79
14	6.07	6.03	6.01	6.00	.99	.98	.95	.92	.91	.88	.87	.86
13	.13	.11	.09	.07	6.06	6.05	6.02	6.00	.98	.95	.94	.93
12	.23	.18	.16	.15	.14	.13	.10	.08	5.05	5.02	5.01	5.00
11	.30	0.26	.24	.22	.21	.20	.17	.15	.12	.10	.09	.08
10	.38	.34	.32	.30	.29	.28	.25	.23	.20	.17	.16	.15
9	.46	.41	.39	.37	.36	.35	.32	.30	.28	.25	.24	.23
8	.54	.49	.47	.45	.44	.43	.40	.38	.35	.32	.31	.30
7	.62	.57	.55	.53	.52	.51	.48	.45	.42	.39	.38	.37
6	.70	.65	.63	.60	.59	.58	.55	.53	.50	.47	.46	.45
5	.77	.73	.71	.68	.67	.66	.63	.60	.57	.54	.53	.52
4	.85	.80	.78	.75	.74	.73	.70	.68	.65	.62	.60	.59
3	.93	.88	.86	.83	.82	.81	.78	.75	.72	.69	.68	.67
2	7.01	.96	.93	.90	.89	.88	.85	.83	.80	.77	.75	.74
1	.09	7.04	7.01	.98	.97	.95	.92	.90	.87	.84	.82	.81
0	.17	.12	.09	7.06	7.05	7.03	7.00	.98	.94	.91	.90	.88

Tomado del AOAC Official Methods of Analysis (2005) Apéndice C p.16

Cuadro para calcular porcentaje de alcohol por volumen a 15,56°C (60°F) en mezclas de alcohol etílico y agua desde la inmersión Zeiss por lectura de refractometría e índices refractivos a 17.7-25°C

Scale reading	Refractive Index	17.5	18	19	20	21	22	23	24	25
13.2	1.33250									.00
.4	3257									.18
.5	3265								0.14	0.35
.6	3273							0.10	0.31	0.53
14.0	3281						0.04	.28	.49	.70
.2	3288					.04	.24	.45	.67	.88
.4	3296					.23	.41	.63	.84	1.06
.6	3304				0.15	0.38	.59	.80	1.02	1.24
.8	3312			0.14	0.34	0.55	0.77	0.98	1.19	1.40
15.00	3319	0.00	0.10	0.31	0.52	0.73	0.94	1.16	1.36	1.55
.2	3327	0.17	0.27	0.48	0.69	0.91	1.12	1.32	1.51	1.71
.4	3335	0.34	0.44	0.65	0.85	1.03	1.29	1.47	1.66	1.86
.6	3343	0.51	0.60	0.82	1.03	1.24	1.44	1.62	1.82	2.01
.8	3350	0.68	0.78	0.99	1.23	1.40	1.60	1.77	1.97	2.17
16.00	3358	0.84	0.94	1.17	1.36	1.55	1.75	1.92	2.12	2.33
.2	3366	1.02	1.12	1.32	1.51	1.70	1.90	2.08	2.27	2.48
.4	3374	1.18	1.29	1.47	1.66	1.85	2.05	2.24	2.43	2.62
.6	3381	1.34	1.43	1.62	1.83	2.00	2.20	2.39	2.57	2.77
.8	3389	1.49	1.57	1.77	1.95	2.15	2.35	2.53	2.72	2.92
17.00	3397	1.63	1.72	1.92	2.11	2.30	2.50	2.69	2.87	3.06
.2	3405	1.77	1.87	2.05	2.25	2.45	2.65	2.82	3.02	3.21
.4	3412	1.92	2.01	2.21	2.41	2.59	2.79	2.97	3.17	3.36
.6	3420	2.07	2.16	2.36	2.56	2.74	2.94	3.12	3.32	3.51
.8	3428	2.21	2.31	2.51	2.70	2.89	3.09	3.27	3.46	3.66
18.00	3435	2.35	2.45	2.66	2.85	3.04	3.23	3.42	3.61	3.81
.2	3443	2.50	2.60	2.81	3.00	3.19	3.37	3.57	3.76	3.96
.4	3451	2.65	2.75	2.96	3.15	3.34	3.52	3.71	3.91	4.11
.6	3459	2.80	2.90	3.10	3.30	3.48	3.66	3.86	4.06	4.26
.8	3466	2.95	3.05	3.25	3.45	3.63	3.81	4.01	4.21	4.41
19.00	3474	3.10	3.19	3.40	3.59	3.77	3.96	4.16	4.36	4.56
.2	3482	3.25	3.34	3.55	3.73	3.92	4.11	4.31	4.51	4.70
.4	3489	3.39	3.48	3.70	3.88	4.07	4.26	4.46	4.65	4.85
.6	3497	3.53	3.63	3.84	4.03	4.22	4.41	4.61	4.80	5.00
.8	3505	3.68	3.78	3.98	4.17	4.37	4.56	4.75	4.95	5.15
20.00	3513	3.83	3.93	4.13	4.32	4.52	4.72	4.90	5.10	5.29
.2	3520	3.97	4.07	4.27	4.47	4.66	4.87	5.05	5.24	5.44
.4	3528	4.12	4.22	4.42	4.61	4.82	5.01	5.20	5.38	5.58
.6	3536	4.26	4.36	4.56	4.75	4.96	5.15	5.34	5.52	5.72
.8	3543	4.41	4.51	4.70	4.90	5.10	5.29	5.48	5.67	5.87
21.00	3551	4.56	4.65	4.85	5.04	5.24	5.44	5.62	5.82	6.02
.2	3559	4.70	4.80	4.99	5.19	5.39	5.58	5.77	5.96	6.16
.4	3566	4.84	4.94	5.14	5.33	5.53	5.72	5.91	6.11	6.30
.6	3574	4.99	5.09	5.28	5.47	5.67	5.87	6.06	6.25	6.44
.8	3582	5.13	5.23	5.43	5.61	5.82	6.01	6.20	6.39	6.59
22.00	1.33590	5.27	5.37	5.57	5.76	5.96	6.15	6.34	6.54	6.73
.2	3597	5.41	5.51	5.71	5.90	6.11	6.29	6.49	6.68	6.87
.4	3605	5.56	5.65	5.85	6.05	6.25	6.43	6.63	6.82	7.01
.6	3613	5.70	5.80	6.00	6.19	6.39	6.57	6.77	6.96	7.16
.8	3620	5.85	5.94	6.14	6.33	6.53	6.71	6.91	7.10	7.31

Tomado del AOAC Official Methods of Analysis (2005) Apéndice C p.17

Fuentes:

Wagner, W.; Pruss, A., *The IAPWS formulation 1995 for the thermodynamic properties of ordinary water substance for general and scientific use*, **J. Phys. Chem. Ref. Data**, 2002, 31, 2, 387-535

Saul, A.; Wagner, W., *A Fundamental Equation for Water Covering the Range From the Melting Line to 1273 K at Pressures up to 25000 MPa*, **J. Phys. Chem. Ref. Data**, 1989, 18, 4, 1537-1564.

AOAC (2005) Official method of Analysis. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC, Appendice C.