

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA - FISICA

"Caracterización, evaluación y optimización de una planta de desalación por Electrodiálisis Reversible"

D. Ramón Valerdi Pérez

1999

Apéndice 1

CARACTERIZACION DEL AGUA

SUMARIO: 1.1.Caracterización Fisico-Química del Agua. 1.2.Clasificación de Aguas. Normas e Indices. 1.3.Técnicas Analíticas. 1.4.Indices Predictivos del Ensuciamiento Cristalino ("Scaling").

1.1. CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DEL AGUA

En la caracterización físico-química de un agua, se debe tener presente cuál ha de ser su uso ulterior. Así por ejemplo, para aguas que han de ser sometidas a procesos de filtración con membranas, se deben detectar y cuantificar aquellas sustancias que puedan provocar daños irreversibles en la estructura íntima de las mismas, además de aquellas otras cuya presencia dé lugar a una disminución de su productividad.

Entre los componentes del agua que producen daños irreversibles a la estructura íntima de las membranas podemos citar: ácidos y bases (pH del agua), agentes oxidantes (cloro libre, ozono, etc.) y microorganismos (bacterias, hongos, etc.). El efecto producido por cada una de estas sustancias depende de la concentración de las mismas y del tipo de membrana en cuestión; por ejemplo, las membranas de poliamida son más susceptibles al ataque de los agentes oxidantes que las celulósicas, mientras que estas últimas, son más sensibles a las variaciones del pH y al ataque de micoorganismos. Es necesario aclarar que los microorganismos, principalmente bacterias y hongos, no causarían un daño irreparable por su simple deposición sobre la superficie de las membranas, sino que es el efecto de su metabolismo (cambios del pH, producción de determinadas sustancias, etc.), lo que puede alterar la estructura química de las mismas.

Los componentes que producen ensuciamiento de las superficies de contenedores o membranas, afectan a todos estos elementos de manera parecida independientemente del material del que estén constituidos. Dentro de los fenómenos de ensuciamiento, se pueden diferenciar entre lo que se denomina en la bibliografia inglesa "scaling" y que nosotros llamaremos ensuciamiento cristalino, que consiste en la cristalización sobre superficies de las sustancias disueltas en el agua de alimentación, cuando por efecto de un progresivo aumento de concentración, se excede el límite de solubilidad, y "fouling" o ensuciamiento coloidal, que no es otra cosa que la deposición en las superficies de coloides o partículas en suspensión presentes en el agua de alimentación. Entre los principales agentes causantes del "fouling" se pueden citar: óxidos metálicos (principalmente de Fe^{+2} y Mn⁺²), coloides (orgánicos e inorgánicos) y materiales de origen biológico (bacterias, hongos, algas, etc.). Mientras que entre los principales componentes que causan "scaling" destacaremos: CaCO3, CaSO4, BaSO4, SrSO₄, SiO₂, CaF₂ y Mg(OH)₂.

Análisis Tipo de un agua problema			
Temperatura (mínima/máxima) °C			
	pH		
Conductivida	d Eléctrica (µS/cm)		
Cationes (mg/l)	Aniones (mg/l)		
Na	Cl		
K ⁺	SO_4^{-2}		
Ca ⁻²	NO ₃		
Mg ⁻²	PO ₄ -3		
NH_4^+	HCO ₃		
Fe^{-2}	CO_3^{-2}		
Mn ⁻⁴	F ⁻		
Ba ⁻²			
Sr ⁻²			
Al ⁻³			
SiO_2 (mg/l)	Indices		
CO ₂ libre (mg/l)	Predictor de "Fouling" (SDI)		
O ₂ libre (mg/l)	Predictor de "Scaling" (LSI,S+DSI)		
Cl ₂ libre (mg/l)			
$H_2S (mg/l)$	Análisis Microbiológicos		
Sólidos Totales Disueltos (TSD) (mg	(1) Determinación de Materia Orgánica		
	(DQO, DBO, COT,)		

Tabla 2

La Tabla 2 muestra los epígrafes que debe recoger un análisis tipo para un agua problema. No obstante, un dato importante que determinará la idoneidad para un uso específico, basándose en la obtención de unos determinados parámetros u otros, es el origen del agua. Así, si se trata de aguas superficiales (río, lago, etc.), los valores de los análisis sobre materia orgánica y los microbiológicos cobrarán una mayor importancia que si se trata de agua subterránea.

Ya hemos indicado que los resultados de un análisis de agua, en lo referente a su contenido en sales o iones, se suele expresar generalmente en partes por millón (ppm). Una parte por millón es equivalente a un mg/l y a 0,0001%.

Otra unidad empleada para informar de la concentración de iones de una disolución son los equivalentes por millón (epm). Esta unidad está estrechamente relacionada con las ppm, y se calcula dividiendo la cantidad de cada uno de los componentes expresada en ppm por sus pesos equivalentes. Para disoluciones muy diluidas, los equivalentes por millón se suelen corresponder con miliequivalentes por litro.

Como el término equivalente por millón (epm) o miliequivalente por litro se basa en las cargas iónicas, para cada análisis de agua se puede aplicar la siguiente regla: la suma de todos los epm de los cationes (epm⁻) debe ser igual a la suma de los epm de los aniones (epm⁻). Esta regla se suele utilizar para comprobar la bondad de un determinado análisis de agua; se puede considerar como un error analítico asumible, una diferencia en torno al 10%.

La Tabla 3, presenta los pesos iónicos, valencias y pesos equivalentes, de los iones más frecuentes en las aguas de origen natural.

Otra manera de expresar la concentración de los iones presentes en una muestra de agua es la utilización de un compuesto de referencia. Por ejemplo, el calcio (Ca^{+2}) se expresa frecuentemente como ppm equivalentes de carbonato cálcico $(CaCO_3)$. Para convertir la concentración de un ion expresado en ppm como ppm equivalentes de un compuesto de referencia, como el CaCO₃, el primer paso es convertir las ppm del ion en epm, de la manera descrita anteriormente, posteriormente los epm se multiplican por el peso equivalente del compuesto de referencia, que en el caso del CaCO₃ es de 50.

Cuando varios constituyentes del agua se expresan como ppm equivalentes de CaCO₃, sus cantidades pueden sumarse o restarse directamente. Así, la *dureza total* de una muestra de agua la constituye la suma de los iones Ca⁺² y Mg⁺² expresados como ppm equivalentes de CaCO₃. De igual manera, la *alcalinidad* de una disolución se corresponde con la cantidad de iones bicarbonato (HCO₃⁻) expresados como ppm equivalentes de CaCO₃.

Anionas	nieucientes en las aguas naturales.					Deee	
Amones	reso	valencia	Peso	Cationes	Peso	valencia	Peso
	iónico	<u>.</u>	Equivalente		iónico		Equivalente
Cl	35,5	1	35,5	H^+	1,0	1	1,0
$ SO_4^{-2} $	96,0	2	48,0	Na⁺	23,0	1	23,0
NO ₃	62,0	1	62,0	\mathbf{K}^+	39,1	1	39,1
PO ₄ -3	95,0	3	31,7	$\mathrm{NH_4}^+$	18,0	1	18,0
HCO ₃	61,0	1	61,0	Ca ⁺²	40,0	2	20,0
$ CO_3^{-2} $	60,0	2	30,0	Mg ⁺²	24,4	2	12,2
F ⁻	19,0	1	19,0	Fe ⁺²	55,8	2	27,9
OH	17,0	1	17,0	Fe ⁺³	55,8	3	18,6
S ⁻²	34,0	2	16,0	Ba ⁺²	137,3	2	68,7
			-	Sr ⁺²	87,6	2	43,8
				Mn ⁺⁴	55,0	4	13,8
				Mn^{+2}	55,0	2	27,5
				Al ⁺³	27,0	3	9,0

 Tabla 3

 Pesos iónicos, valencias y pesos equivalentes de los iones más frecuentes en las aguas paturales

Tabla 4			
Rango de dureza de aguas			
Dureza	Clasificación		
(ppm equivalentes de CaCO ₃)			
0-60	Blanda		
61-120	Moderadamente dura		
121-180	Dura		
más de 180	Muy dura		

La Tabla 4 muestra una clasificación de aguas con relación a su dureza. De acuerdo con la "American Water Association" un agua ideal no debe superar los 80 mg/l de CaCO₃, aunque en muchas zonas de USA se considera un agua dura respecto de su potabilidad, cuando exhibe una duración superior a 50 ppm CaCO₃. No obstante, para la mayoría de usos, se considera un agua dura cuando presenta valores superiores a 100 ppm CaCO₃.

La Tabla 5 muestra un ejemplo de informe de un análisis de agua. Los epm (mequiv/litro) expresados como porcentaje ayudan en la clasificación de la muestra de agua dentro de algunas de las "fascies" o tipo de agua más frecuentes (cloruradas, sulfatadas, carbonatadas, sódicas, cálcicas, etc.). Cuando se han identificado y cuantificado todos los componentes de una muestra de agua, el valor total de sólidos disueltos puede obtenerse sumando la concentración de todos los componentes, de modo que puede obviarse su determinación directa por los métodos descritos anteriormente.

Otro parámetro importante, como factor favorecedor del "fouling" potencial de un agua, es su contenido en materia orgánica, la cual además favorece el desarrollo de poblaciones de microorganismos, principalmente bacterias, sobre las superficies de las membranas. Por ello, es muy importante valorar la presencia de materia orgánica, sobre todo en aguas de origen superficial en las que es frecuente encontrarla a elevadas concentraciones. Para la determinación de la carga orgánica de un agua se han desarrollado una serie de métodos empíricos; entre los más utilizados están la *Demanda Bioquímica de Oxígeno* (DBO), la *Demanda Química de Oxígeno* (DQO) y el método de determinación directa *Carbono Orgánico Total* (COT).

La DBO se define como la cantidad de oxígeno necesaria para la degradación microbiana, a 20 ° C, de los compuestos orgánicos presentes en el agua. El método más frecuente para su determinación consiste en la incubación en laboratorio durante cinco días de la muestra objeto de análisis, con el que se determina la llamada DBO₅ que equivale aproximadamente al 70-80% de la DBO total (20 días). El oxígeno consumido por los microorganismos está directamente relacionado con la cantidad de materia orgánica biodegradable presente en el agua.

La DQO se define como la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar las sustancias que se hallan presentes en una muestra de agua susceptibles de oxidación por un oxidante químico fuerte. Uno de los métodos más utilizados para su determinación es el de oxidación mediante dicromato potásico. El valor de DQO de un agua suele ser superior al de DBO, debido a que se cuantifican también algunas sustancias inorgánicas, tales como iones ferrosos, sulfatos, sulfuros, nitritos, etc.

Informe sobre contenido id	ónico de un	a muestra	de agua	salobre,	del tipo	clorurada-
sulfatada-sódico-cálcica (e	fectuado en	el Labora	torio de I	Desaliniz	ación de	l Departa-
mento de Física/INUAMA-	Universidad	l de Murci	a)			

Tabla 5

IONES	ppm (mg/l)	epm (meg/l)	% epm	ppm como CaCO2 (mg/l como		
	(116/1)	(meq/l)	(// mcq/1)	CaCO ₃)		
ANIONES						
Cloruro (Cl ⁻)	1231	34,7	46,6	1734		
Sulfato (SO_4^{-2})	1265	26,4	35,4	1318		
Bicarbonato (HCO ₃ ⁻)	728	11,9	16,0	597		
Nitrato (NO ₃ ⁻)	92	1,5	2,0	74		
	Tota	al epm ⁻ = 7	4,5			
CATIONES		. · ·				
Sodio (Na ⁺)	738	32,1	43,1	1604		
Calcio (Ca ⁺²)	578	28,9	38,8	1445		
Magnesio (Mg ⁺²)	149	12,2	16,4	244		
Potasio (K ⁺)	51	1,3	1,7	65		
Total $epm^+ = 74,5$						
Sólidos T	Sólidos Totales Disueltos (TSD) = 4832 ppm (mg/l)					
Dureza Total = $1689 \text{ ppm como } CaCO_3$						
Alcalinidad = 597 ppm como $CaCO_3$						

Puede existir carbono orgánico presente en un agua que no sea detectable por los métodos de DBO y DQO. Por ello se desarrollaron los métodos de detección del COT que representan, de una manera más directa, el contenido en carbono orgánico de una muestra de agua.

Para determinar la cantidad de carbono presente en la materia orgánica de una muestra de agua se han de romper todas las moléculas orgánicas hasta la obtención de unidades moleculares de un solo átomo de carbono, de manera que estas últimas puedan cuantificarse. Los métodos para determinar el COT utilizan calor y oxígeno, radiación ultravioleta, oxidantes químicos o combinaciones de estos oxidantes hasta convertir el carbono orgánico en dióxido de carbono. El CO₂ puede medirse directamente en un analizador de infrarrojos no dispersivo, o bien puede reducirse hasta metano (CH₄) y medirse con un detector iónico de llama, o también, el CO₂ como tal puede ser valorado químicamente.

Otro factor importante es el Análisis Microbiológico del agua problema. Es necesario conocer la cantidad total y tipo de microorganismos, principalmente bacterias, presentes en la muestra de agua. Los métodos utilizados más frecuentemente, son los basados en recuentos microscópicos, que nos darán una idea del número total de microorganismos y los basados en la realización de siembras en medios de cultivo apropiados de las correspondientes diluciones de la muestra de agua, para una vez transcurrido el período de incubación realizar el recuento de las colonias que hubieran aparecido. Este segundo método nos da información de los microorganismos viables presentes en el agua que podrían, siempre que no se adoptasen la medidas correspondientes, desarrollarse sobre la superficie de las membranas, provocando, por efecto de su actividad metabólica, daños irreparables en la estructura química de las mismas. Este fenómeno se ve muy potenciado, si además de una elevada población de bacterias viables, el agua contiene una elevada concentración de materia orgánica

susceptible de ser utilizada como fuente energética y de carbono por los microorganismos.

Dada la importancia de parámetros tales como temperatura, conductividad eléctrica y pH., haremos una serie de consideraciones puntuales sobre los mismos.

1.1.1 Temperatura

Para aguas de alimentación de instalaciones con membranas, la temperatura afecta a la productividad de las mismas, a su degradación fisico-química y a la propia solubilidad de las sales. Es un dato importantísimo en el diseño de una planta de filtración, por lo que se debe comprobar, no sólo con medidas puntuales, sino también considerando su rango de variación estacional. En este sentido, también las aguas de origen subterráneo se muestran más estables (suelen presentar un rango de variación de unos 4 °C) que las superficiales. Un incremento de la temperatura de un grado Celsius suele traducirse en un incremento de producción en planta en torno al 3%, aunque una mayor temperatura acelera los procesos de degradación fisico-químicos de las membranas, acortando su vida media operativa.

1.1.2 Conductividad Eléctrica

Ya hemos indicado que este parámetro indica, de forma indirecta y aproximada, el contenido de sales disueltas en el agua. La medida de la conductividad eléctrica se basa en el principio de que el flujo de corriente eléctrica que se transmite a través de una disolución, bajo determinadas condiciones, varía con la concentración de sales presentes en la misma. Esto se debe a que los iones disociados presentes en la disolución, transportan las cargas eléctricas entre los electrodos de medida. Las unidades en las que se mide la conductividad eléctrica son micromhos por centímetro, según la antigua terminología, o microsiemens por centímetro (μ S/cm) según la terminología más comúnmente aceptada.

La conductividad de una disolución depende, no sólo de su concentración iónica, sino también de su composición iónica y de la temperatura. La composición iónica de una disolución afecta a su conductividad eléctrica porque ni todos los iones transportan con la misma facilidad las cargas eléctricas ni presentan la misma movilidad en el seno de la disolución. La conductividad de una disolución está directamente relacionada con la temperatura de la misma, debido a que un incremento de la temperatura provoca un aumento de la velocidad de los iones en la disolución.

Un grupo de investigadores del Laboratorio de Salinidad de EEUU, estudiaron la relación entre el valor de la conductividad eléctrica (CE) de las aguas y la concentración total de sólidos disueltos (TSD) y encontraron, para una temperatura de 20°C, una relación aproximada entre estos índices, según la cual:

$$ISD \cong 0,64 \times CE$$

estando TSD expresado en ppm (mg/l) y CE en μ S/cm. Igualmente encontraron que para la temperatura indicada, entre la conductividad eléctrica y la presión osmótica de una disolución se puede establecer la siguiente relación:

$$\Pi \cong -0.36 \times CE$$

donde II es la presión osmótica en bares.

Sin lugar a dudas, el parámetro más importante en la caracterización fisicoquímica de un agua problema es su contenido en sales, tanto el contenido total de sólidos disueltos (TSD), como la concentración en la que se encuentra cada una de las formas iónicas presentes en la misma. El contenido en sales de un agua se determina formas iónicas presentes en la misma. El contenido en sales de un agua se determina directamente a partir del análisis del total de sólidos disueltos, o bien mediante evaporación completa de un volumen de agua de peso conocido y cálculo del peso del residuo seco que se produce en esta operación, considerándose el residuo seco cuando su peso no varía a pesar de mantener las muestras en condiciones de evaporación a 103 °C (evaporación hasta peso constante).

1.1.3 pH

El pH es una forma de expresar la actividad de los iones H^+ en el agua y como es bien sabido, se define como el logaritmo de la actividad de iones H^+ de una disolución cambiado de signo. Su valor, medido a 25 °C y referido a un agua químicamente pura, es 7; si la disolución presenta un valor de pH inferior a 7 se dice que es ácida o corrosiva, y si es superior a 7, básica o incrustrante.

En general, las aguas tanto las de origen superficial como las subterráneas, presentan un rango de pH que oscila entre 6,0 y 8,6. En las aguas superficiales la acción fotosintética de las algas (consumo de CO_2) puede provocar incrementos diurnos del pH que puede alcanzar valores superiores a 10 en las capas más superficiales.

Las aguas naturales, sobre todo las superficiales, están en contacto con la atmósfera, intercambiando gases con la misma, mediante reacciones a las que no es ajeno el pH. Por ejemplo, el CO_2 en el agua da lugar a una de las más importantes, cuya relación con el pH se ajusta al siguiente esquema:

$$CO_{2} + H_{2}O \leftrightarrow H_{2}CO_{3}$$
$$H_{2}CO_{3} \leftrightarrow HCO_{3}^{-} + H^{+}$$
$$HCO_{3}^{-} \leftrightarrow CO_{3}^{-2} + H^{+}$$

Las dos últimas reacciones producen H^+ y en consecuencia afectan al pH del agua, como ya se ha apuntado en el párrafo anterior.

El CO₂ de la atmósfera, considerando constante su concentración, se disuelve en el agua hasta un límite que depende principalmente de la temperatura. Por tanto, para unas condiciones de 1 atmósfera de presión y 25 °C de temperatura, la aplicación de la ley de acción de masas a las ecuaciones anteriores, proporciona los siguientes valores de constantes de equilibrio

$$a[H_{2}CO_{3}]/a[CO_{2}]a[H_{2}O] = K_{s} = 10^{-1.43}$$
$$a[HCO_{3}]a[H^{+}]/a[H_{2}CO_{3}] = K_{1} = 10^{-6.35}$$
$$a[CO_{3}^{-2}]a[H^{+}]/a[HCO_{3}^{-}] = K_{2} = 10^{-10.33}$$

Por otra parte, la actividad de los iones H⁻ afecta al carbonato cálcico presente según la siguiente reacción:

$$CaCO_3 + H^+ \leftrightarrow HCO_3^- + Ca^{+2}$$

La correspondiente constante de equilibrio (K), a 1 atmósfera y 25 °C, calculada a partir de la actividades iónicas en moles por litro, se puede expresar de la siguiente forma

$$a\left[HCO_{3}^{-}\right]a\left[Ca^{+2}\right]/a\left[CaCO_{3}\right]a\left[H^{+}\right] = K = 97$$

donde a[CO₃Ca] = 1, al encontrarse éste en estado puro. Así pues, la actividad iónica del hidrógeno en un agua en equilibrio con el CO₃Ca, se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$a[H^+] = a[HCO_3^-]a[Ca^{+2}]/97$$

ecuación que puede reescribirse en la forma:

$$\frac{1}{a[H^+]} = \frac{97}{a[HCO_3^-]a[Ca^{+2}]}$$

A partir de aquí podemos obtener el pHs, definido como el pH a valor de saturación o en equilibrio y que será igual a

$$pH_s = pH_{(HCO_3^-)} + pH_{(Ca^{+2})} + 1,98$$

El pHs es pues el valor de pH al cual no se producirá ni precipitación ni disolución de carbonatos.

Es claro pues, que el pH juega un importante papel en la cristalización de la sales menos solubles del agua en procesos de concentración.

1.1.4 Muestreo

Para la correcta caracterización de un agua problema se ha de tener presente que, en aquellas regiones de condiciones climáticas de marcada estacionalidad, se debe realizar una caracterización del agua problema en cada una de las estaciones del año, sobre todo si se trata de agua superficial.

Uno de los requisitos fundamentales para la realización de un análisis satisfactorio del agua problema es el método de toma de muestras. Las muestras tienen que ser lo más representativas posible; la localización y el método de muestreo serán decisiones a tomar por el analista, en función de su conocimiento de las condiciones medioambientales locales y de las técnicas analíticas que van a utilizarse.

Se puede contemplar una clasificación de diferentes tipos de muestras en función de las determinaciones que se van a llevar a cabo, de acuerdo con la siguiente enumeración:

- a) Muestras para la determinación "in situ" de parámetros fisico-químicos, tales como temperatura, pH, conductividad, concentración de O₂ disuelto.
- b) Muestras para la determinación "in situ" de constituyentes del agua mediante métodos químicos, tales como Cl₂ libre, CO₂, H₂S. Para este tipo de muestreo, se han desarrollado toda una serie de baterías portátiles de pruebas, para la determinación "in situ" de constituyentes del agua. Estos minilaboratorios, generalmente del tamaño de un maletín, son fáciles de utilizar y los métodos de detección empleados se basan generalmente en principios fotométricos.
- c) Muestras para la determinación de constituyentes del agua en un laboratorio alejado de la zona de muestreo, pero que no requieren especiales medidas de conservación ya que dichos constituyentes son bastante estables y no sufren variación durante su transporte. Por ejemplo Cl_2 , SO_4^{-2} , HCO_3^{-1} , etc..
- d) Muestras para la determinación de componentes cuya concentración puede variar, si no se toman adecuadas medidas de conservación. Así, para la realización de los análisis microbiológicos, las muestras se deberían conservar en refrigeración (unos 4 °C) hasta el momento de ser procesadas en el laboratorio, siempre dentro de la 24 horas siguientes a la realización del muestreo.
- e) Muestras para determinaciones especiales. Por ejemplo, para la determinación del índice de "fouling" potencial, se requiere una cantidad

de agua problema que variará en función de la concentración de sustancias en suspensión y coloides del agua; no obstante, como norma general, se puede establecer como volumen mínimo de muestra, unos 25 litros de agua.

En función del origen del agua problema podemos diferenciar:

- 1) *Muestras de agua subterránea*. Las aguas subterráneas suelen ser bastante homogéneas, no obstante el agua se debe bombear en continuo durante cierto tiempo (como mínimo 5 horas), antes de tomar la muestra.
- 2) Muestras de agua superficial (ríos, lagos y mares). En estos casos es recomendable la utilización de cualquiera de los muestreadores automáticos existentes en el mercado, que suelen operar tomando muestras puntuales, proporcionales al caudal y a determinados tiempos, en función de como hayan sido programado. Se obtienen así, las denominadas muestras compuestas, que son más representativas que las puntuales y están sujetas a una menor variabilidad. Además estos muestreadores automáticos suelen equiparse con diferentes recipientes para la toma de muestras, así como de las unidades de conservación de las mismas (refrigeración, adición de agentes conservantes, etc.).

1.2. CLASIFICACION DE AGUAS. NORMAS E INDICES

1.2.1 Balance lónico

Las sales son compuestos iónicos que cuando se disuelven en el agua pierden su identidad y se separan en iones. Por ello, es normal que en un análisis químico la composición salina del agua se exprese en función de la concentración de aniones y cationes, debiéndose verificar que la suma de aniones y la de cationes expresados en miliequivalentes por litro sean iguales. Este hecho, denominado balance iónico, sirve para calcular la exactitud de los análisis.

Para las aguas naturales (superficiales y subterráneas), el balance iónico se calcula en función de los iones mayoritarios (cloruro, sulfato, bicarbonato, nitrato, sodio, calcio, magnesio y potasio) que suponen alrededor del 99% de las sales disueltas.

El balance iónico se puede expresar en términos de error relativo, para lo cual, se divide aquél por el mayor del sumatorio de aniones o cationes. El error analítico expresado en tanto por ciento, se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$Erroranalitico = \frac{\sum aniones - \sum cationes}{\sum aniones} \times 100$$

Un análisis de agua se considera fiable cuando el error analítico es igual o inferior al 5%. En caso contrario se recomienda repetir el análisis.

1.2.2 Normas "Riverside"

Son una clasificación conjunta de la salinidadd y contenido en sodio del agua. El sodio puede afectar a los cultivos, en la medida en que produce la alcalinización del suelo agrícola y la pérdida de permeabilidad.

	Tabla 6			
Clase	C.E. (µS/cm)	Riesgo de Salinización		
C-1	< 250	Bajo		
C-2	250 - 750	Mediano		
C-3	750 - 2.250	Mediano a Elevado		
C-4	2.250 - 4.000	Elevado		
C-5	4.000 - 5.000	Muy Elevado		
C-6	> 5.000	Grave		

En la Tabla 6 se señalan los intervalos considerados y las clases definidas en función de la salinidad del agua expresada en términos de conductividad eléctrica.

El contenido en sodio del agua de riego es un parámetro de especial significación debido a su incidencia en la permeabilidad del suelo y en la nutrición de la planta (toxicidad). El riesgo de alcalinización del suelo se mide con el S.A.R. (Relación de Adsorción de Sodio):

$$SAR = \frac{rNa^{+}}{\sqrt{\frac{rCa^{+2} + rMg^{+2}}{2}}} \quad donde \quad r = meq / l$$

Los intervalos y clases definidas se indican en la en la Tabla 7:

	Tabla 7				
Clase	S.A.R.	Riesgo de Alcalinización			
S-1	0 - 10	Bajo			
S-2	10 - 18	Mediano			
S-3	18 - 26	Elevado			
S-4	> 26	Muy Elevado			

La representación gráfica conjunta de ambos criterios (salinización y alcalinización) es lo que se refleja en las gráficas de *Riverside*.

Este sistema de clasificación de aguas para riego, ha sido criticado por ser demasiado conservador, ya que establece límites muy restrictivos para definir un agua como totalmente apta para el riego (100 - 250 μ S/cm, como correspondiente a C1). En la mayor parte de las zonas áridas es difícil hallar aguas de tan baja conductividad eléctrica. También la categoría C2 (250 - 750 μ S/cm) se considera excesivamente restrictiva, ya que estas aguas son consideradas como satisfactorias para la mayoría de los cultivos y situaciones.

En cuanto a la sodificación, se establecen límites que asignan un riesgo por sodio creciente, para valores constantes del SAR a medida que aumenta la CE, no teniendo en cuenta otros factores que intervienen en el procesos de sodificación.

1.2.3 Normas Greene

Son función de la relación entre el porcentaje de sodio (%Na) y el total de sales, expresado en meq/l. El porcentaje se calcula a partir de:

$$\%Na = \frac{r(Na^{+} + K^{+})l00}{r(Ca^{+2^{+}} + Mg^{+2} + Na^{+} + K^{+})} \qquad r = meq / l$$

1.2.4 Normas Wilcox

Se basan en la relación entre el porcentaje de sodio y la conductividad eléctrica. En la gráfica correspondiente se señalan las diferentes clases de agua según estos dos criterios. De ella se desprende que los límites permitidos de %Na en un agua de riego serían de 40 a 60.

En la Tabla 8 se señalan los intervalos considerados y las clases definidas en función de la salinidad del agua expresada en términos de conductividad eléctrica.

T-LL 0

	1 auta 8	
C.E. (µS/cm)	Calidad del agua	
< 750	Excelente a Buena	
750 - 2.000	Buena a Tolerable	
2.000 - 3.000	Dudosa a Mala	
> 3.000	Mala	

1.2.5 Indice de Scott

Se define como la altura de agua, en pulgadas, que hay que verter en un suelo de cuatro pies de espesor para que, tras la evaporación, sea inviable el cultivo de las especies más sensibles.

La referencia analítica de este índice son las concentraciones, en mg/l, de cloruro, sodio y sulfato, en el agua objeto de evaluación. A partir de estos datos el cálculo de K se practica de acuerdo con los criterios siguientes:

- a) Si $[Na^+]$ -0,65[Cl⁻] es igual o menor que cero: K = 2.040/[Cl⁻]
- b) Si $[Na^+]$ -0,65[Cl⁻] es positivo, pero menor o igual que 0,48 SO₄, entonces $K = 6.620/([Na^+]+2,6[Cl^-])$
- c) Si [Na⁺]-0,65[Cl⁻] es mayor que 0,48[SO₄⁻²], entonces $K = 662/([Na^+]-0,32[Cl⁻] -0,43[SO₄⁻²])$

Según el valor de K, la clasificación del agua sería la que se recoge en la Tabla 9.

K	Clasificación	Observaciones			
< 1,2	Mala	Prácticamente no es utilizable para riego			
1,2 - 6	Mediocre	Debe seleccionarse el suelo. A veces es preciso un drenaje artificial			
6 -18	Tolerable	Tomar precauciones para impedir la acumulación de sales, excepto en los suelos con drenaje libre			
>18	Buena	Se puede utilizar muchos años sin tomar precauciones para impedir la acumulación de sales			

Tabla 9

1.2.6 Diagrama de Schoeller

Es una representación logarítmica de una serie de parámetros del agua en relación a su calidad como agua potable o agua que va a ser destinada para su potabilización. Según el Código Alimentario Español (1982), la consideración de un agua como potable responde a los criterios expuestos en la Tabla 10:

Clasificación	pH	Residuo	Cl^{-}	NO_3	Ca^{++}	Mg^{++} (mg/l)	SO_4^{++}
		110°C	(1119/1)	(1112/1)	(111g/1)	(111g/1)	(Ing/I)
		(mg/l)					
No aconsejable	<6,5;>9,5	>1.500	>350	>50	>200	>50	>400
Tolerable	6,5-7;	750-1.500	25-350	25-50	100-	30-50	25-400
	8,5-9,5				200		
Conveniente	7-7,5;	<750	<25	<25	<100	<30	<25
	7,5-8		[

m 11. 10

1.2.7 Diagrama de Piper

En 1944 Piper propuso un diagrama trilateral para clasificar aguas, tal como el que se esquematiza en la Figura 1. Los puntos representativos de una muestra se ubican sobre el rombo superior y se determinan mediante la intersección de rectas paralelas a los lados del mismo, que se trazan partiendo de puntos característicos del tipo de agua, que se sitúan en los triángulos inferiores. A veces se incluye información sobre la concentración, mediante el dibujo de círculos, cuyos diámetros dan el TSD, cuando se miden con una escala adecuada que se da en el diagrama.

Este tipo de diagrama constituye en muchos casos una herramienta útil para interpretar los análisis de aguas, La mayoría de los procedimientos gráficos reflejan conjuntos de datos y apuntan características de la muestra, que requieren por lo general un estudio más profundo, sirviendo el diagrama de Piper para este propósito. Entre las aplicaciones del mismo, se incluye el examen de grupos de análisis de aguas (fascies), para determinar si un agua particular puede resultar de una mezcla simple de otras, cuyas analíticas son conocidas, o si la muestra está afectada por disolución o precipitación de una determinada sal.

No obstante a lo dicho, el valor del diagrama para determinados propósitos, es tan sólo relativo, habida cuenta de que resulta difícil reflejar adecuadamente en él, las diferencias de concentración iónica total entre aguas y porque además no incluye información sobre solutos no iónicos, tal como la sílice.

En el diagrama de la Figura 1, se indican los distintos tipos de aguas que se pueden contemplar en el diagrama de Piper, según la zona en la que se sitúen sus puntos representativos.



1.3. TECNICAS ANALITICAS

En muchos casos es preciso detectar y cuantificar cada una de las formas iónicas presentes en un agua problema. A continuación pasaremos revista de forma breve, a las técnicas analíticas de determinación de iones, cuya utilización está más extendida en la actualidad.

1.3.1 Valoraciones

Aunque el número de métodos instrumentales directos de análisis va creciendo continuamente, las valoraciones siguen siendo un procedimiento habitual de análisis de rutina en los laboratorios. Sin embargo, las valoraciones normales pueden consumir bastante tiempo y la precisión de sus resultados depende en gran medida de la habilidad del operador. Esto no ocurre con las valoraciones automáticas cuya eficiencia y precisión están bastante demostradas hoy día. El método de detección puede basarse en principios volumétricos o colorimétricos. En la actualidad, la comercialización y el uso de baterías para la valoración de iones del agua por métodos colorimétricos está bastante extendida por su bajo coste, facilidad de manejo y rapidez en los resultados.

1.3.2 Potenciometría con Electrodos de lon Selectivo

Las investigaciones sobre desarrollo y aplicación de nuevos electrodos selectivos de iones constituye un área de la Química Analítica de creciente interés en las últimas décadas. Una de sus principales características es la rapidez con que permiten determinar el contenido de un ion determinado de la muestra, otras pueden ser, el bajo coste de la instrumentación requerida, ser aplicables a volúmenes de muestra pequeños, etc. Dado que los electrodos proporcionan una variación en el potencial, proporcional al logaritmo de la actividad del ion, la exactitud y precisión de las determinaciones son, en general, inferiores a las proporcionadas por otras técnicas, especialmente a altas concentraciones.

1.3.3 Técnicas Cromatográficas

Aunque las técnicas convencionales colorimétricas, electrométricas o volumétricas, son válidas para la determinación de aniones individuales, la **cromatografia de intercambio ionico**, proporciona una técnica sencilla que permite su medida rápida y secuencial. Entre las ventajas de la utilización de esta técnica podemos citar: requiere volúmenes pequeños de la muestra a analizar, permite análisis simultáneo de varios aniones, rapidez en el análisis (unos 20 min) y una mayor sensibilidad y mejor reproducibilidad de los resultados. En este método se usan columnas separadoras de aniones con resinas de intercambio aniónicas, con una precolumna de aniones y una columna supresora, con resina de intercambio de cationes; la reposición periódica de estas columnas encarece este método de análisis.

1.3.4 Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

Es una modalidad del Análisis en Flujo Continuo. Se realiza una inyección directa en el flujo, de volúmenes pequeños y conocidos de muestra disuelta, que es arrastrada por los conductos del sistema, pudiendo tener lugar un proceso adicional (reacción química, extracción, etc.), entre ésta y el fluido portador. Al pasar este analito, o su producto de reacción, por un detector continuo, se origina una señal transitoria que es registrada. Una característica muy importante de esta metodología es que el tiempo de operación debe ser muy reproducible, pues las medidas se efectúan en condiciones de no estabilidad (no se alcanza ni el equilibrio físico, que supondría una homogeneización del flujo, ni el equilibrio químico, en el momento de la detección).

1.3.5 Fotometría de Emisión

Dentro de la fotometría de emisión la más utilizada es la Fotometría de Llama. El principio que sirve de base a esta técnica implica la excitación de los electrones de un átomo por la energía térmica de una llama. Los electrones en estado excitado son inestables y tienden a pasar a un estado de menor energía cediendo su exceso de energía al ambiente, en forma de radiación electromagnética, que puede constar de uno o más niveles de energía y por tanto poseer diferentes longitudes de onda. Estas diferentes longitudes de onda (líneas del espectro) resultan individualmente características para cada elemento. En condiciones constantes y controladas, la intensidad luminosa de la longitud de onda típicamente producida por cada uno de los átomos resulta directamente proporcional al número de átomos que emiten energía, lo cual a su vez es directamente proporcional a la concentración de interés de la muestra.

1.3.6 Espectrometría de Absorción Atómica (EAA)

Básicamente es el reverso de los métodos de emisión. En la EAA el elemento no es excitado en una llama, sino meramente disociado de sus enlaces químicos y colocado en un estado atómico base neutro y no ionizado. Esto implica que el átomo se encuentra en un nivel energético bajo, en el que es capaz de absorber radiación en una estrechísima banda de anchura comprendida entre 0,001 y 0,01 nm. El origen de tal radiación se encuentra en la lámpara de cátodo hueco. La energía de la radiación absorbida es igual a aquella que el elemento en cuestión emitiría si fuese excitado. A diferencia de los métodos de emisión, en los cuales sólo un pequeño porcentaje de los átomos quedan excitados, casi todos ellos se transforman en la forma disociada en la que son capaces de absorber la luz emitida por la lámpara de cátodo hueco. Aunque se trata de una técnica muy selectiva, es posible, en algunos casos, que sustancias acompañantes del analito objeto de medida, afecten a la pendiente de la gráfica de calibrado, y por tanto a la sensibilidad.

1.3.7 Análisis de lones por Electroforesis Capilar

Recientemente ha surgido una nueva técnica de análisis fisico-químico de los iones presentes en una muestra de agua; es el denominado Análisis de Iones por Electroforesis Capilar.

La Electroforesis Capilar es una técnica de separación basada en la diferente movilidad de especies químicas en disolución cuando se someten a un campo eléctrico. El soporte de la separación es un tubo capilar de sílice fundida, tal y como se puede observar en la Figura 2.

Los principales componenetes de un equipo de análisis iónico por electroforesis capilar son los siguientes:

- *Capilar*: Es de sílice fundida recubierta de poliimida. Su diámetro interno varía entre 25 y 200 μm, y su longitud entre 35 y 200 cm.
- Fuente de Alimentación: Es de corriente continua, de 0 a 30 KV. La polaridad depende del signo de los iones a separar.
- *Electrólito*: Su pH y naturaleza afectan a la separación. Puede contener aditivos para controlar efectos secundarios.
- Detector: Los más empleados son los detectores de absorbancia. La celda de detección es una porción de capilar de la que se ha retirado el recubrimiento de poliimida.

La separación depende de la movilidad propia de cada especie química, y ésta a su vez depende de la relación carga/masa. Este método permite la detección y cuantificación de manera rápida (unos 5 minutos, tanto para los cationes como para los aniones) de los aniones y cationes presentes, cambiando la polaridad de la fuente de alimentación y el electrólito. Por otro lado, los capilares son mucho más baratos y fáciles de usar que las columnas cromatográficas.

Para un estudio más detallado, véase el Apéndice 2.



1.3.8 Realización práctica

De todos las técnicas anteriormente citadas, es la última la que se ha empleado en este trabajo, implementada en un equipo *Waters* de última generación, capaz de soportar diferentes métodos analíticos. Nosotros hemos empleado sendos métodos, uno para aniones (N-601a) y otro para cationes (método general N-605). Se trata de métodos validados internacionalmente por *Waters* y que como tales figuran como referencias homologadas. Las características más importantes de cada uno de ellos se dan a continuación.

a) Método de análisis de aniones comunes (N-601a)

Este método emplea un electrólito soporte de alta movilidad, siendo sus condiciones de operación las que se recogen en la Tabla 11. Los iones detectados, en orden creciente de tiempo de migración, son los siguientes: bromuro, cloruro, sulfato, nitrito, nitrato, fluoruro, fosfato y bicarbonato.

· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
Instrumento empleado	Analizador iónico capilar
Electrólito soporte	Cromato sódio 4,6 mM, preparado aniónico
	OFM BT 0,46 mM, pH=8
Capilar	Sílice fundida (60cm×75µm)
Fuente de voltaje	-20 kV
Corriente	18 a 20 μA
Modo de inyección	Hidrostático a 10 cm de altura, durante 30s
Detección	UV a 254 nm (lámpara de mercurio)
Rango	0,002 AU
Detector de polaridad	Invertido
Temperatura	25°C
Manejo de datos	Millennium 2010
Constante de tiempo	0,1 s
Frecuencia de muestro	20 puntos/s
Auto purga	2 min

b) Método general para detección de cationes (N-605)

Los cationes que detecta, en orden creciente de sus tiempos de migración, son: potasio, bario, estroncio, calcio, sodio, magnesio y litio. Las condiciones operativas se reseñan en la Tabla 12.

	Tabla 12			
Instrumento empleado	Analizador iónico capilar			
Electrólito soporte	UV Cat-1 5,0 mM, HIBA 6,5 mM, pH=4,4			
Capilar	Sílice fundida (60cm×75µm)			
Fuente de voltaje	+20 kV			
Corriente	4 μA			
Modo de inyección	Hidrostático a 9,8 cm de altura, durante 30s			
Detección	UV a 185 nm (lámpara de mercurio)			
Rango	0,002 AU			
Detector de polaridad	Negativo			
Temperatura	Ambiente			
Manejo de datos	Millennium 2010			
Constante de tiempo	0,3 s			
Frecuencia de muestro	10 puntos/s			
Auto purga	2 min			

1.4. ÍNDICES PREDICTIVOS DEL "SCALING"

El agua en la naturaleza siempre está inmersa en procesos de disolución o precipitación de sales. Al fenómeno de precipitación cristalina sobre superficies, se le suele denominar como "scaling" siendo debido, en general, a la combinación de iones para dar compuestos de baja solubilidad, como por ejemplo el CaCO₃, que cuando exceden su máxima solubilidad precipitan como sólidos. Este fenómeno se puede producir bien debido a cambios en la composición química del agua, o bien a cambios en algunos de sus parámetros físicos, como puede ser la temperatura.

En los procesos de filtración tiene lugar una concentración de sales, presentes en el agua de alimentación, cuando ésta se va transformando en salmuera. Durante el proceso, se puede exceder el límite de solubilidad de una o varias de las sales presentes, produciéndose su precipitación sobre la superficie de las membranas, disminuyendo así la productividad de las mismas.

En aguas salobres, las sales que con más frecuencia producen "scaling" en las plantas de filtración, son el carbonato cálcico (CaCO₃) y el sulfato cálcico (CaSO₄). En aguas marinas la más frecuente es el carbonato cálcico. Existen otras sustancias cuya concentración es preciso conocer y controlar, tanto en aguas salobres como marinas, ya que podrían causar "scaling" en determinadas circunstancias, tales como: sílice (SiO₂), sulfato bárico (BaSO₄), sulfato de estroncio (SrSO₄) y fluoruro cálcico (CaF₂).

Se utilizan dos métodos para determinar el "scaling" potencial por CaCO₃ de un determinado tipo de agua, que se plasman en dos índices: el Indice de Saturación de Langelier (LSI) para aguas dulces y salobres (hasta 5 g/l de TSD) y el Indice de Saturación de Stiff y Davis (S + DSI) para aguas salinas y marinas (>5 g/l de TSD). En lo que sigue, nos referiremos al primero de ellos.

Indice de Saturación de Langelier (LSI)

Este índice fue desarrollado por Langelier en los años 30, inicialmente para predecir la precipitación de carbonato cálcico en calderas y conducciones de agua. Se puede definir de la siguiente manera: para un agua de composición determinada (TSD conocido) y presión de CO₂ constante, el LSI es la diferencia entre el pH actual del agua (pH_a) y el pH en el que se produce el equilibrio entre el CaCO₃ disuelto y el CaCO₃ precipitado (pH_s) :

$$LSI = pH_a - pH_s \begin{cases} pH_a = pH \text{ actual del agua} \\ pH_s = pH \text{ de equilibrio o saturación} \end{cases}$$

El pH_a se mide directamente, mientras que el valor del pH_s se obtiene de la segunda constante de ionización (K₂) del H₂CO₃ y el producto de solubilidad (K_{SP}) del CaCO₃ mediante la fórmula

$$pH_{s} = \log \frac{K_{sp}}{K_{2}} - \log [Ca^{+2}] - \log [HCO_{3}^{-}]$$
 (1)

y cuya demostración se da a continuación.

Para el carbonato cálcico precipitado, en equilibrio con los iones CO_3^{-2} y Ca^{+2} , el producto de solubilidad es

$$K_{SP} = \left[CO_3^{-2}\left[Ca^{+2}\right] \Rightarrow \left[CO_3^{-2}\right] = \frac{K_{SP}}{\left[Ca^{+2}\right]}$$
(2)

La ionización del H_2CO_3 , se lleva a cabo en dos etapas, plasmadas por los siguientes equilibrios químicos:

$$H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$$
$$HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{-2} + H^+$$

para el segundo de los cuales la constante de equilibrio K2, viene dada por



Jestim perg. 19, 20

Apéndice 2

ELECTROFORESIC CAPILAR

SUMARIO: 2.1. Introducción Histórica. 2.2. Fundamentos de la Electroforesis Capilar. 2.3. Instrumentación en EC. 2.4. Ejemplos de Aplicación de EC Coelectroosmótica.2.5. Validación del Método EC Empleado.

2.1 INTRODUCCION HISTORICA

Actualmente la Electroforesis Capilar representa un cambio de dirección en el avance de las modernas técnicas de separación. Las técnicas de separación electrocinética aparecían como las peores candidatas para un método popular de separaciones de muestras líquidas, especialmente por la limitada aceptación de la Isotacoforesis. La súbita popularidad de otras técnicas electrocinéticas, fue posible por las primeras separaciones de muestras líquidas en capilares de pequeño diámetro, que fueron sorprendentes para la mayoría de los químicos analíticos. El rápido desarrollo de la electroforesis capilar fue posible por la existencia de sus fundamentos, descubiertos por un gran número de investigadores en el curso de los últimos 200 años.

El resumen de la Tabla 1 muestra los hitos mas importantes en el desarrollo de la electroforesis capilar.

Año	Nombres de Autore	s Contribuciones
1.791	Faraday	Leyes de la Electrolisis
1.877	Helmholtz ¹	La capa de disolvente adyacente al interior de una pared y la super- ficie de una partícula cargada tienen carga opuesta
1.856	Hittorf ²	Definición de los números de transporte para iones
1.897	Nernst ³	Propiedades de los iones pequeños
1.897	Kohlrausch ⁴	La función de Kohlrausch describe el orden de la migración electroforética de los iones y sus concentraciones relativas
1.930	Tiselius ^s	Método de estudio de la electroforesis de proteínas
1.923	Kendall y Crittenden ⁶	Separación de metales térreos raros por " <i>ion migration method</i> ". Primera Isotacoforesis
1.939	Svenson	Desarrollo de la zona y desplazamiento en la electroforesis
1.945	Longsworth ⁸	Desarrollo de la zona y desplazamiento en la electroforesis
1.948	Tiselius	Pemio Nobel por el desarrollo del movimiento en la capa límite
1.950	Haglund y Tiselius ⁹	Electroforesis en tubos llenos de polvo de vidrio (cuentas de cristal)
1.955	Smithiers ¹⁰	Electroforesis en Gel
1.958	Hjerten ¹¹	Análisis en disolución por Electroforesis
1.967	Martin y Everaerts ¹²	Desplazamiento electroforético en tubos de vidrio con hidroxietilce- lulosa
1.967	Hjerten ¹³	Eliminación de los efectos de electroósmosis por recubrimiento de tubos
1.969	Giddings ¹⁴	Modelo no difusional de distribución de concentración en electrofo- resis de zona libre
1.969	Virtanen ¹⁵	Empleo de capilares de vidrio de 0,2 a 0,5 mm de diámetro interno
1.970	Everaerts y Hoving- Keulemans ¹⁶	Isotacoforesis capilar, equipamiento ITP
1.970	Arlinger y Routs ¹⁷	Desarrollo de Detectores-UV
1.972	Verheggen y al. ¹⁸	Detector de conductividad
1.979	Mikkers y al. ¹⁹	Alto voltaje en tubos de Teflón de diámetro estrecho
1.981	Jorgenson ²⁰	Uso de capilares tubulares de vidrio de 75 µm de diámetro. "High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE)"
1.984	Terabe y al. ²¹	Combinación de modos Electroforético y Cromatográfico. "Micellar Electrokinetic Chromatography (MECC_MEKC)"

Tabla 1Hitos Históricos de el Desarrollo de la Electroforesis Capilar

2.2 FUNDAMENTOS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

2.2.1 Elementos de los Sistemas de Electroforesis Capilar (EC)

Un aparato típico de Electroforesis Capilar representa un abandono radical de los instrumentos más convencionales usados en otras técnicas de separación electrocinética y cromatográfica, tales como la cromatografia en fase gaseosa o fase líquida, electroforesis en capa fina e isotacoforesis. La eficiencia de la separación se mejora mucho y, en su forma actual, la instrumentación es menos compleja que, por ejemplo, la de un sistema cromatográfico.

Como mínimo un sistema EC debe de contener los módulos ilustrados en la Figura 1, que comentamos a continuación.



a) Capilares de Sílice Fundida

La técnica EC llega a ser viable analíticamente, sólo después de la introducción comercial de los capilares de sílice fundida de diámetro estrecho ($10 - 100 \mu m$), recubiertos de poliimida. El diámetro estrecho facilita la disipación del calor generado por la resistencia eléctrica del electrólito dentro del capilar; además el material de sílice fundida de la pared del capilar es más conductor del calor que otros materiales empleados para la construcción de tubos capilares de diámetro estrecho. El material de poliimida envolvente elimina la considerable fragilidad de los tubos de sílice fundida sin recubrir.

b) Vasos para el Electrólito

Durante las separaciones, el capilar de sílice fundida esta inmerso por ambos extremos en un electrólito conveniente, contenido en sendos vasos. Previamente a la separación, el electrólito se introduce dentro del capilar con la ayuda de un dispositivo adecuado, como una bomba de vacío que lo aspire, y que también se emplea para el lavado del capilar, y para el acondicionamiento de capilares nuevos, primero con una disolución 0,1N de NaOH, y posteriormente con agua pura.

Junto a otras condiciones, la composición empleada del electrólito en EC, también llamado electrólito portador, define un método de EC. En un sistema EC los dos vasos contienen el mismo electrólito.

Un problema que se puede presentar con los electrolitos portadores, es la presencia de burbujas de aire dentro del capilar, que conducen a las fluctuaciones de la línea base de los electroferogramas grabados, obtenidos al realizar las separaciones electroforéticas, y en último extremo a una interrupción del campo eléctrico necesario para una separación EC. Este problema se puede solucionar mediante la desgasificación del electrólito por cualquiera de los métodos conocidos, como por esparcimiento de helio, ultrafiltración a vacío o sonicación.

Otro requerimiento importante, es que la posición de los niveles de llenado de los dos contenedores del electrólito portador, tienen que tener exactamente la misma altura en orden a minimizar algún flujo por desequilibrio hidrostático.

c) Posición de la Muestra

La introducción de la muestra en el sistema, se lleva a cabo mediante la inserción de uno de los extremos del capilar en el contenedor de la muestra, colocado siempre a una altura constante sobre el nivel de la superficie del electrólito de los dos vasos contenedores. Solamente se puede esperar una reproducibilidad exacta de la muestra, si la posición de los vasos es la misma. Los tiempos de inyección de muestra oscilan entre 10 y 30 segundos, aunque se pueden minimizar empleando muestreadores automáticos.

d) Fuente de Potencia

El voltaje requerido para llevar a cabo separaciones EC, está proporcionado por una fuente de potencia de corriente continua regulada, conectada por un par de cables aislados a dos electrodos, usualmente fabricados de platino o de otro material químicamente inerte, inmersos el electrólito portador. Consideraciones de tipo práctico limitan el valor del voltaje a 30 KV (valores superiores provocan descargas en el capilar y pueden deteriorar los instrumentos de forma irreversible²²). El valor máximo de la intensidad de la corriente es de 500 a 1000 μ A, y está establecido atendiendo principalmente a medidas de seguridad²³.

Otra limitación viene impuesta por los grandes niveles de calor que generan las corrientes por encima de los 500 μ A. Aún a pesar de la buena conductividad térmica de la sílice fundida, ésta no permite la buena disipación térmica a niveles de intensidad de corriente tan elevados y puede provocar la ebullición del electrólito portador dentro del capilar. Por esta razón, niveles de intensidad de corriente por encima de 500 μ A no son convenientes.

Una buena fuente de corriente debe tener polaridad reversible. La mayoría operan en modo potenciostático (voltaje constante). Si operasen en modo galvanostático (corriente constante) podrían dar problemas analíticos, como por ejemplo "ratios" excesivas de concentración, como veremos posteriormente. Aplicaciones especializadas²⁴ pueden requerir la superposición de una componente alterna sobre el potencial DC.

e) Detector

El método mas común de detección en EC es la Detección-UV. Para permitir el paso de la luz, una pequeña porción del capilar (0,5 - 1 cm) debe liberarse de la envoltura de poliimida, lo cual puede llevarse a cabo sencillamente con la brasa de un cigarrillo, aunque existen procedimientos más sofisticados. En la mayoría de los casos, es recomendable quitar los pequeños residuos de poliimida quemada de la superficie del capilar, antes de su exposición al detector, con un algodón o un paño empapado en metanol.

En los instrumentos comerciales EC, pueden emplearse tipos de detectores de longitud de onda variable o fija. Estos últimos, más que compensar por el inconveniente de cambios discretos de longitud de onda lo hacen por las interesantes posibilidades de medida a 185 nm y por una energía de salida, generalmente alta, de la lámpara de mercurio en comparación con la luz de las fuentes de deuterio empleadas en los detectores de variación continua. Como la mayoría de los picos en la moderna EC tienen una anchura menor de tres segundos, la constante de tiempo del detector debe ser de 0,3 segundos o menor.

f) Grabador

En principio todo tipo de medios se pueden emplear para grabar los electroferogramas, pero debido a las elevadas velocidades de adquisición de datos se debe de emplear un ordenador provisto de un disco duro de al menos 20 Mb y con una unidad de disquettes. La mayoría de los PCs tienen velocidades de adquisición de datos ajustables entre 1 y 50-60 Hz. No se debe escoger velocidades menores de 10 Hz para un electroferograma con anchuras de pico menores de 3 a 5 segundos. La capacidad de almacenamiento de un disco duro se puede maximizar transfiriendo los archivos de datos a un disquete o retardando el comienzo de la adquisición de datos.

Los PCs tienen además la capacidad de efectuar cálculos rutinarios, como por ejemplo el cálculo de la calibración con un estandar interno que nos dé una mejor precisión de los tiempos de migración y de las áreas de pico, además de eliminar errores corrientes en las rutinas analíticas.

2.2.2 Teoría Básica

Al principio del proceso analítico, en uno de los extremos del capilar, hay una mezcla no resuelta de analitos, contenida en un volumen muy pequeño de muestra diluida (introducción hidrostática de muestra) o de muestra disuelta en un electrólito portador (introducción electromigrativa de muestra). La separación en zonas de todos los analitos se produce durante la migración hacia el detector. Para la detección de los componentes se emplean sus diferentes tiempos de migración desde el comienzo de la separación hasta que son detectados.

El tiempo de migración (t_m) , puede convertirse en velocidad de migración observada o aparente (v_{obs}) mediante la ecuación

$$\mathbf{v}_{obs} = \frac{L_d}{t_m} \tag{1}$$

donde L_d (cm) es la longitud del capilar desde el punto de introducción de la muestra hasta su detección. El término " observada " hace referencia a que la velocidad no sólo es debida a la migración electroforética, sino que puede contener otras contribuciones como las derivadas del flujo electroosmótico. La longitud del capilar L_d (cm) se debe incluir en las condiciones de funcionamiento EC, junto con la longitud total del capilar L_i (cm).

Para comparar los datos de migración, bajo diferentes potenciales eléctricos de separación, $\Psi(V)$, es necesario calcular las movilidades electroforéticas observadas (μ_{obs}), mediante la ecuación

$$\mu_{obs} = \frac{\nu_{o\bar{b}s}}{E} = \frac{L_d L_t}{\Psi t_m} \quad (\text{ cm}^2/\text{V·s})$$
(2)

donde se tuvo presente que el cociente $\Psi(V)/L_i$ (cm) define el campo eléctrico aplicado E (V/cm). Los valores de μ_{obs} son del orden de 10⁻⁴ cm²/V·s, para tiempos de migración de 10²

s, a varios minutos, para capilares de 10 cm y voltajes de 10⁴ V, calculados mediante la ecuación (2).

La movilidad observada μ_{obs} , tal como se muestra en la Figura 2, es al menos suma de dos contribuciones, la movilidad iónica (μ_{ion}) y la movilidad del flujo electroosmótico (μ_{EOF}):





La Figura 2 muestra las diferentes contribuciones a la movilidad observada. El analito de interés es transportado hacia el detector principalmente por el flujo electroosmótico. Su movilidad iónica se utiliza en la separación, para obtener una selectividad por el grado de ralentización diferente de los iones. Un ejemplo de lo dicho anteriormente, se tiene en las separaciones de aniones en capilares de sílice fundida, sin ningún tipo de tratamiento, en donde los aniones muestran una tendencia a migrar hacia el ánodo (parte izquierda de la Figura 2), mientras que el flujo electroosmótico se dirige hacia el cátodo (parte derecha de la Figura 2).

El flujo electroosmótico se origina debido a las interacciones entre los componentes del electrólito portador y las cargas que están sobre la superficie del capilar, cuando se aplica un campo eléctrico. La polaridad de las cargas del capilar puede ser, o positiva o negativa, dando como resultado dos direcciones posibles del flujo electroosmótico.

La velocidad del flujo electroosmótico (v_{EOF}) y la movilidad electroosmótica (μ_{EOF}), se pueden determinar mediante el estudio de la migración de un componente sin carga, bajo condiciones tales como las descritas en la Figura 3, donde los componentes no ionizados de una muestra son transportados por el flujo electroosmótico, siendo su movilidad idéntica a la de ellos: $\mu_{obs} = \mu_{EOF}$, aplicándose después la ecuación para el cálculo de μ_{obs} .

La segunda contribución a la movilidad iónica observada, es la propia movilidad del ion (μ_{ion}) , que se puede calcular por uno de los métodos siguientes

1°) En sistemas EC con μ_{EOF} conocido, la movilidad iónica (μ_{ion}), se obtiene a partir del tiempo de migración de un analito iónico t_m (s), mediante la ecuación



$$\mu_{ion} = \mu_{obs} - \mu_{EOF} = \frac{L_d L_t}{\Psi t_{m_{(ion)}}} - \mu_{EOF}$$
(3)

Una fuente usual de valores numéricos para las movilidades iónicas netas (μ_{ion}) está contenida en las tablas de conductividades equivalentes límite de iones, λ_{equiv} (cm²/equiv.vohm)²⁵, que se pueden convertir en movilidades con la ayuda de la constante de Faraday (1F = 96487 A·s / equiv.)

$$\mu_{ion} = \frac{\lambda_{equiv}}{F} \tag{4}$$

2°) Para los iones que no están incluidos en las tablas de conductividades equivalentes, λ_{equiv} se puede estimar por una simple medida conductimétrica. El único requerimiento para la realización de estas determinaciones es tener un conductivímetro y una sal pura con un contraión conocido. Antes de realizar la medida, la constante de célula del instrumento tiene que ser verificada y ajustada, así como también, el que la temperatura permanezca constante (en un rango de ± 1°C en torno a la media). Los conductivímetros comerciales están equipados con sensores de temperatura, y convierten automáticamente el valor de conductividad dado 2.8

al valor a 20 ó 25 °C. La conductividad equivalente de un ion desconocido se calcula por la ecuación²⁵

$$\lambda_{e\,quiv_{(ion\,desc.)}} = (10^{-3}\,\frac{GK}{M}) - \lambda_{equiv_{(contraion\,con.)}} \tag{5}$$

donde G es la conductancia dada en μS (microsiemens = 10⁻⁶ ohm⁻¹), K, es la constante de célula (cm⁻¹) y, M, es la concentración en equivalentes por litro.

Mientras que los valores de la conductividad calculados por esta ecuación son útiles en la predicción del comportamiento de la migración en EC, debe recordarse que los valores listados en la mayoría de las tablas son los de las conductividades equivalentes límite (a dilución infinita).

Veamos ahora todas las posibilidades prácticas de combinación de los dos vectores μ_{ion} y μ_{EOF} en un Sistema EC. Los términos "lento "y" rápido "aplicados a los iones se emplean en el texto siguiente para describir las magnitudes relativas de μ_{ion} y μ_{EOF} . Con un flujo electroosmótico muy lento como el que se observa por ejemplo en los capilares de teflón a pH entre 3 y 5, la mayoría de los aniones se pueden considerar " rápidos ", de acuerdo con el marco de referencia presente, en principio apto para superar el conflicto entre el flujo electroosmótico y su dirección migracional inherente. Si, por otra parte, el flujo electroosmótico se incrementa, como por ejemplo en capilares de sílice fundida bajo condiciones alcalinas, la mayoría de los aniones se pueden considerar " lentos " y en principio no aptos para superar el flujo electroosmótico, orientado en contra de la dirección de su propio vector de migración.

La parte superior de la Figura 4 (Casos A - E), muestra la misma orientación del vector de flujo electroosmótico con respecto al campo eléctrico (igual que en la Figura 3). El lado de la inyección es positivo y la pared del capilar está cargada negativamente, generándose un flujo electroosmótico hacia el lado del detector. Los aniones "rápidos " migran muy lentamente bajo tales condiciones, con un tiempo de retención que es frecuentemente, superior a 10 ó 20 minutos (Caso B).

La gran mayoría de aniones inorgánicos son " rápidos ", y superan la velocidad del flujo electroosmótico bajo la mayoría de las condiciones, en consecuencia migran lejos del lado de detección del capilar, es decir hacia el lado de introducción de la muestra (Caso C). La configuración con la cara de inyección positiva es más conveniente para cationes que para aniones. Hasta los cationes " lentos " se mueven con tiempos de retención favorables a través del detector (Caso D), y la gran mayoría de cationes inorgánicos, altamente móviles, se pueden detectar con tiempos de retención totales de entre 3 y 5 minutos (Caso E).

Como ya se ha indicado, la dirección del flujo electroosmótico se puede invertir por adición de algunos aditivos electrolíticos o por modificación de la pared del capilar, tales condiciones son contraproducentes para los Casos F, G, H, I de la Figura 4; sólo los cationes de movilidad más alta, son capaces de migrar hacia el detector y producir señal (Caso J).

La Figura 5 muestra las configuraciones más convenientes para aniones rápidos. Se obtiene una señal analítica siempre para especies aniónicas altamente móviles. Es posible escoger entre tiempos de recorrido cortos (Caso E) o largos (Caso J) para cada especie, teniendo así la posibilidad de analizar con éxito un número amplio de distintas especies. Para analizar por ejemplo una traza de un anión rápido en presencia de aniones lentos, se podría escoger el Caso E. Nótese, que bajo estas condiciones, los cationes también pueden ser separados analíticamente; los cationes " rápidos " se moverán en una dirección completamente diferente, hacia el cátodo (Caso C), y los cationes " lentos " llegarán al detector sólo después de un largo período de tiempo (Caso B). Los aniones que migran más lentamente, pueden ser separados relativamente bien, pero las opciones son limitadas. La utilidad de las separaciones aniónicas, bajo estas condiciones, puede apreciarse en el electroferograma de la Figura 6^{26}



Figura 4

Combinaciones de los vectores de movilidad en un sistema EC, con polaridad positiva en la parte de inyección de la muestra y negativa en la de detección. La parte derecha del diagrama indica las posiciones aproximadas de los picos para especies neutras y cargadas. El disolvente de la muestra suele detectarse al mismo tiempo de migración que el de las especies neutras. Sin contribuciones adicionales de movilidad, las especies neutras no son resueltas bajo las condiciones descritas en la Figura. FEO: flujo electroosmótico. CARACTERIZACION, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACION DE UNA PLANTA EDR



Figura 5

Combinaciones de los vectores de movilidad en un sistema EC, con polaridad negativa en la parte de inyección de la muestra y positiva en la de detección. La parte derecha del diagrama indica las posiciones aproximadas de los picos para especies neutras y cargadas. El disolvente de la muestra suele detectarse al mismo tiempo de migración que el de las especies neutras. Sin contribuciones adicionales de movilidad, las especies neutras no son resueltas bajo las condiciones descritas en la Figura. FEO: flujo electroosmótico.



Figura 6

Electroferograma de treinta aniones, con 5 mM de Cromato potásico, 0,5 mM de modificador de flujo electroosmótico (Waters OFM Anion-BT), pH = 8, capilar de sílice fundida de 50 µm de diámetro interno, voltaje de 30 KV (negativo), inyección electromigrativa durante 15 s a 1 KV y detección UV indirecta a 254 nm. Identificación de los picos : 1) *Tiosulfato* (4 ppm), 2) *Bromuro* (4 ppm), 3) *Cloruro* (2 ppm), 4) *Sulfato* (4 ppm), 5) *Nitrito* (4 ppm), 6) *Nitrato* (4 ppm), 7) *Molibdato* (10 ppm), 8) *Acida* (4 ppm), 9) *Wolframato* (10 ppm), 10) *Monofluorofosfato* (4 ppm), 11) *Clorato* (4 ppm), 12) *Citrato* (2 ppm), 13) *Fluoruro* (1 ppm), 14) *Formato* (2 ppm), 15) *Fosfato* (4 ppm), 16) *Fosfito* (4 ppm), 17) *Clorito* (4 ppm), 18) *Galactarato* (5 ppm), 19) *Carbonato* (4 ppm), 20) *Etanosulfonato* (4 ppm), 21) *Acetato* (4 ppm), 22) *Propionato* (5 ppm), 23) *Propanosulfonato* (4 ppm), 24) *Butirato* (5 ppm), 25) *Butanosulfonato* (4 ppm), 26) *Valerato* (5 ppm), 27) *Benzoato* (4 ppm), 28) *L* - *glutarato* (5 ppm), 29) *Pentano sulfonato* (4 ppm), *D* - *gluconato* (5 ppm)²⁶.

CARACTERIZACION, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACION DE UNA PLANTA EDR

Existe una posibilidad de calcular movilidades iónicas a partir de los radios iónicos hidratados r_i (radio de Stokes). Así, cuando una partícula cargada se coloca en un campo eléctrico externo, E, experimenta una fuerza, F_e , que es igual al producto de su carga neta por el campo eléctrico aplicado

$$F_e = qE \tag{6}$$

Además de esta fuerza eléctrica que actúa sobre la partícula, cuando ésta se empieza a mover, experimenta una fuerza fricativa en dirección opuesta a su sentido de movimiento, F_a , que es proporcional a la velocidad de la partícula

$$F_a = f \mathbf{v} \tag{7}$$

donde la constante de proporcionalidad, f, se llama coeficiente de rozamiento traslacional y que para el caso de una partícula esférica viene dado por la fórmula de Stokes $(f = 6 \pi \eta r)^{27}$. De éste modo, la ecuación que describe el movimiento traslacional de una partícula bajo la influencia de un campo eléctrico es

$$m\left(\frac{d\nu}{dt}\right) = qE - f\nu \tag{8}$$

donde, m, es la masa de la partícula.

2.12

Excepto para el instante inicial de aplicación del campo eléctrico, la fuerza electrostática es exactamente igual que la fuerza fricativa, dado el carácter estacionario del movimiento. Así, igualando las ecuaciones (6) y (7), la velocidad en el estado estacionario resultante, v_{ion} , se puede relacionar con el cambio en las propiedades friccionales de la partícula mediante la ecuación

$$\mathbf{v}_{ion} = \frac{qE}{f} \tag{9}$$

Como la movilidad iónica de una partícula, μ_{ion} , en estado estacionario, es su velocidad por unidad de campo eléctrico aplicado, se sigue

$$\mu_{ion} = \frac{\nu_{ion}}{E} = \frac{q}{f} \tag{10}$$

La ecuación (10) pone de manifiesto que las diferencias entre las movilidades iónicas de las partículas son consecuencia de sus propiedades friccionales, es decir, tamaño, forma y de la diferencia en la carga neta de las mismas. La ecuación (10) también se puede expresar, para una partícula esférica, de la siguiente forma

$$\mu_{ion} = \frac{(10^7 z_i e)}{(6\pi \eta r_i)}$$
(11)

donde, z_i , es la carga del ión, determinando con su signo (+ o -) una de las dos direcciones posibles del vector movilidad electroforética, e, es la carga del electrón (1,602 · 10⁻¹⁹ C), η , es la viscosidad del medio electrolítico en poises, y r_i , el radio de Stokes en μm .

Así, las conductividades equivalentes límite son evaluadas siempre bajo condiciones constantes (disoluciones acuosas diluidas, temperatura constante), y es posible mostrar que los valores tabulados de λ_{equiv} son justo valores encubiertos de razones carga - radio de hidratación, como vemos en la siguiente ecuación

$$\lambda_{equiv} = \frac{(10^7 \, z_i \, eF)}{(6 \, \pi \, \eta \, r_i)} = 8,23 \cdot 10^{-7} \times \frac{z_i}{r_i} \tag{12}$$

donde se tuvo en cuenta que η (agua) es aproximadamente 10⁻² poises.

La ecuación (12) es una versión más explícita de la ecuación (4) que relacionaba μ_{ion} con λ_{equiv} . Empleando la ecuación (11) y la ecuación (2) se puede llegar a una relación que conecta las movilidades iónicas aparentes, μ_{obs} , con los radios iónicos hidratados, r_i , que viene dada por la ecuación

$$\mu_{obs} = \frac{(10^7 z_i e)}{(6 \pi \eta r_i)} + \frac{L_d L_t}{\Psi t_{m_{EOF}}} = \mu_{ion} + \mu_{EOF}$$
(13)

Los valores de las movilidades observadas, μ_{obs} , se pueden calcular muy fácilmente a partir de los tiempos de migración obtenidos a partir del electroferograma de la Figura 6 mediante la ecuación (2). El radio iónico hidratado se puede obtener de las referencias bibliográficas²⁵⁻²⁷. Esto es de un considerable interés para evaluar la correlación entre los datos de las movilidades observadas de los iones de la Figura 6 y sus radios iónicos.

Se han intentado hacer correlaciones similares en péptidos y proteínas sin éxito²⁸⁻³¹, ya que se puede esperar que la interrelación entre el comportamiento electroforético de aniones de bajo peso molecular y sus radios iónicos sea más sencilla que en las biomoléculas, que son más complejas. Aún en el caso de iones simples tenemos que hacer las siguientes consideraciones. *Primera* : el comportamiento de disociación de aniones débilmente ácidos puede cambiar las movilidades observadas en un amplio rango. *Segunda* : los radios iónicos están calculados a partir de conductividades iónicas equivalentes límite, asumiendo que la carga nominal de la especie es igual a la carga efectiva del ión en disolución; mientras que esto puede ser cierto a dilución infinita, en el electrólito portador usado para obtener el electroferograma de la Figura 6 (5 mM de Cromato potásico, 0,5 mM de modificador de flujo electroosmótico (Waters OFM Anion-BT), pH = 8), las cargas efectivas probablemente parecen ser diferentes a las cargas nominales. Por estas dos razones (comportamiento en la disociación y cargas diferentes), en la Tabla 2 sólo aparece la correlación entre diecisiete aniones seleccionados de la treintena separados en la Figura 6

Anión	μ_{obs} (cm ² / V·s)	10 ⁸ .r _i (μm)
Bromuro	0,001069	1,0505
Cloruro	0,0010569	1,075
Ioduro	0,001034	1,0679
Nitrito	0,001025	1,1423
Nitrato	0,001001	1,1488
Azida	0,0009683	1,1886
Clorato	0,0009269	1,2656
Fluoruro	0,0008888	1,4806
Formiato	0,000871	1,5021
Clorito	0,0008293	1,5773
Bicarbonato	0,0007669	1,843
Etanosulfonato	0,0007252	2,0711
Acetato	0,0007046	2,0054
Propionato	0,0006744	2,291
Propanosulfonato	0,0006641	2,211
Butirato	0,0006396	2,515
Benzoato	0,0006018	2,5317

Tabla 2Movilidades Observadas (μ_{obs}^{*}) y Radios Iónicos Hidratados (r_i^{b})para algunos de los aniones de la Figura (6)

a : μ_{obs} se obtuvo por la Ecuación (2), ($L_d = 52 \text{ cm}, L_t = 60 \text{ cm y } \Psi = 30000 \text{ V}$), usando los tiempos de migración de la Figura 6.

b : Las conductividades iónicas equivalentes obtenidas de la referencia 25 se convirtieron en radios iónicos hidratados mediante la ecuación (12).

En la Figura 7 aparecen representados estos datos con su correspondiente ajuste, observándose la correlación existente entre, μ_{obs} , y, r_i .

El hecho de que sea posible correlacionar los datos de migración con un parámetro fisico simple, como es el radio iónico, distingue a la electroforesis capilar de iones de bajo peso molecular de todas las otras metodologías de separación llevadas a cabo en fase líquida. Así, no sólo es más simple experimentalmente, sino también es mucho mas sencilla en sus fundamentos teóricos. Esta observación, junto con unos tiempos de análisis mucho mas cortos, incremento de la eficacia de la separación, y añade una considerable ventaja práctica sobre todas las demás técnicas de separación.


2.2.3 Capilares y Flujo Electroosmótico

a) Flujo Electroosmótico

Este tipo de fenómenos son debidos al movimiento relativo de una superficie cargada en un medio líquido. Refiriéndonos a la interfase sólido-líquido, al mover el líquido y dejar fijo el sólido, arrastraremos la parte difusa de la doble capa eléctrica dejando la parte rígida. Esto origina una diferencia de potencial en la interfase. Cabe la posibilidad de que sean las fases sólida o líquida las que se muevan y produzcan una diferencia de potencial, o viceversa, que apliquemos una diferencia de potencial y como resultado se muevan las fases sólida o líquida. Esto da lugar a los tipos de fenómenos electrocinéticos, indicados en la Tabla 3³²

NOMBRE	EFECTO	CAUSA			
Potencial de Flujo	Diferencia de potencial eléctrico producida	Movimiento del líquido electrolítico respecto de las cargas fijas en un diafragma poroso ; movimiento en un tubo capilar cargado			
Electroósmosis	Movimiento del líquido respecto de las cargas fijas en un diafragma poroso ; movimiento en un tubo capilar cargado	Diferencia de potencial eléctrico aplicada			
Corriente de Flujo	Movimiento del líquido con flujo de carga	Gradiente de presión			
Presión Electroosmótica	Gradiente de presión	Diferencia de potencial eléctrico aplicada			
Electroforesis	Movimiento de partículas cargadas de sol respecto del líquido	Diferencia de potencial eléctrico aplicada			
Potencial de Sedimentación	Diferencia de potencial eléctrico producida	Movimiento de partículas cargadas respecto del líquido			

		Tabla -	3	
Tipos	de	Fenómenos	Electrocinét	icos

En el caso que nos ocupa veremos con más detalle la Electroósmosis, que en esencia consiste en el movimiento de un líquido en relación con un sólido fijo cuando se aplica un campo eléctrico. El sólido suele ser un material poroso o un capilar fino. En nuestro caso, como la pared de un capilar de sílice fundida está cargada negativamente en la mayoría de las condiciones de pH de trabajo, hay un recubrimiento positivo de contraiones de la disolución adyacente a la pared del capilar. Cuando se aplica un campo eléctrico, esta capa delgada de cargas positivas es conducida hacia el electrodo negativo, dando como resultado un flujo de la disolución hacia dicho electrodo.

La Electroósmosis está presente, en mayor o menor grado, en todas las formas de electroforesis, pero es particularmente importante en EC. Esto es como consecuencia del elevado valor del cociente entre área superficial y volumen, la baja viscosidad del medio electroforético y los elevados campos eléctricos aplicados en EC. Veremos, en lo que sigue, una breve descripción teórica de la Electroósmosis.

La Doble Capa Eléctrica

La primera etapa en la descripción de la Electroósmosis será describir cuantitativamente la densidad de carga de los contraiones en la disolución próxima a la pared del capilar. Esta región se conoce con el nombre de doble capa eléctrica, y el tratamiento que vamos a desarrollar se ajusta al de Hiemenz (1986). Se han considerado las magnitudes sólo en la dirección del eje x, perpendicular a la pared.

La densidad de carga de los iones en la disolución, $\rho(x)$, a una distancia respecto de la pared del capilar, está relacionada con la concentración iónica por la expresión

$$\rho_{(x)} = \sum_{i} z_{i} e n_{i}(x)$$
(14)

donde, z_i , es la valencia de cada ión, e, es la carga del electrón, $n_i(x)$, es el número de iones del tipo *i* por unidad de volumen, próximos a la pared del capilar y el sumatorio es sobre todos los iones de la disolución. En este análisis se asume que n_i es solamente función de x. Así, para poder obtener, $\rho(x)$, debemos de encontrar una expresión para $n_i(x)$.

Debye y Hückel propusieron que la densidad numérica de iones ún una disolución próxima a una superficie cargada viene determinada por la competencia entre la atracción (o repulsión) electrostática de los iones por la interfase cargada (que tiende a ordenar a los iones), y la influencia aleatoria del movimiento browniano (que tiende a desordenarlos). Esta relación se puede expresar en términos de una distribución de Boltzmann, según la ecuación

$$\frac{n_i(x)}{n_{i_0}} = \exp\left(\frac{-z_i e \Psi(x)}{kT}\right)$$
(15)

donde, n_{i0} , es el número de iones por unidad de volumen en un punto de potencial cero (i. e. lejos de la pared), $\Psi(x)$, es el potencial eléctrico, en el electrólito, a una distancia x de la superficie, k, es la constante de Boltzmann y, T, es la temperatura absoluta. Combinando las ecuaciones (14) y (15) se obtiene $\rho(x)$, como una función de las propiedades de los iones en disolución y de $\Psi(x)$.

$$\rho_{(x)} = \sum_{i} z_{i} e n_{i_{0}} \exp\left(\frac{-z_{i} e \Psi(x)}{kT}\right)$$
(16)

En este punto hay que hacer una aproximación importante en orden a simplificar el análisis posterior, que es la de Debye y Hückel, la cual establece que si $z_i e \Psi(x) < kT$, (lo que quiere decir que la energía potencial interiónica es mucho menor que la energía térmica, o que los iones raramente están juntos), el término exponencial de la ecuación (16) se puede desarrollar en serie de potencias, truncada después del término de primer orden [es decir $e^x \cong (1 - x)$]. Esta aproximación restringe el tratamiento a disoluciones muy diluidas, que son las que cumplen esta condición. Tomando este resultado aproximado para el término exponencial de la ecuación (16), se obtiene

$$\rho_{(x)} = \sum_{i} \left(z_{i} e n_{i_{0}} - \frac{z_{i}^{2} e^{2} n_{i_{0}} \Psi(x)}{kT} \right)$$
(17)

Como n_{i0} se refiere a las concentraciones en la región en que $\Psi(x) = 0$, donde la distribución de los iones es uniforme y la disolución es eléctricamente neutra, el término $\sum z_i e n_{i0} \approx 0$ y se elimina del sumatorio, de manera que la ecuación (17) se reduce a

$$\rho_{(x)} = -\sum_{i} \frac{z_{i}^{2} e^{2} n_{i_{0}}}{kT} \Psi(x)$$
(18)

Para encontrar una expresión explícita para ρ respecto de x, necesitamos otra expresión que relacione a $\Psi(x)$ con $\rho(x)$. Esta es la ecuación de Poisson, que da el potencial eléctrico Ψ en el electrólito a una distancia de la superficie, como una función de la densidad de carga ρ . Como hemos considerado sólo la variación de $\rho(x)$ en la dirección del eje x, la ecuación de Poisson queda como

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = -\frac{\rho_{(x)}}{\varepsilon}$$
(19)

donde, ε , es la constante dieléctrica del disolvente o permitividad eléctrica del medio. El valor de ε viene dado por la expresión : $\varepsilon = \varepsilon_{\sigma} \varepsilon_{r}$, donde, ε_{0} , es la permitividad del vacío (8,854 x $10^{-12} \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$) y, ε_{r} , es la permitividad relativa del medio (78,54 para el agua a 25°C). Sustituyendo (18) en (19), se obtiene

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = \left[\sum_i \frac{z_i^2 e^2 n_{i_0}}{\varepsilon k T}\right] \Psi(x)$$
 (20)

Llegados a este punto, el agrupamiento de constantes en el sumatorio de (20), dentro de una única constante, κ^2 ,

$$\kappa^2 = e^2 \sum_i \frac{z_i^2 n_{i_0}}{\varepsilon k T}$$
(21)

permite escribir la ecuación (20) en la forma

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = \kappa^2 \Psi(x) \tag{22}$$

La ecuación (22) se puede integrar, con las condiciones de contorno :

(1)
$$\Psi = \Psi_0$$
 cuando $x = 0$; y (2) $\Psi = 0$ cuando $x = \infty$

donde, Ψ_0 , es el potencial eléctrico en la interfase capilar / disolución. El resultado de esta integración es

$$\Psi_{(x)} = \Psi_0 \exp(-\kappa x) \tag{23}$$

Así, conforme nos alejamos de la pared del capilar, el potencial eléctrico decrece exponencialmente, lo que se puede apreciar en la Figura 8



Finalmente, podemos encontrar una expresión explícita para $\rho(x)$, sustituyendo la ecuación (23) en la (18), obteniéndose

$$\rho_{(x)} = -\varepsilon \kappa^2 \Psi_0 \exp(-\kappa x) \tag{24}$$

Así, dado el valor de κ (una propiedad de la disolución electrolítica) y el valor de Ψ_0 (una propiedad de la pared del capilar) se puede calcular la densidad de carga, $\rho(x)$, como una función de la distancia a la pared del capilar.

En este punto es importante realizar algunas observaciones sobre la ecuación (24): *Primera*: Con respecto a la aproximación del bajo potencial eléctrico en la interfase disolución/ capilar, hemos considerado en la ecuación (24) que $ze \Psi \le kT$, lo que implica que para especies monovalentes³²

$$\Psi_0 < \frac{kT}{\varepsilon} = 25,7 \, mV \tag{25}$$

considerando una temperatura de 25°C. Así, la ecuación (24) sólo es rigurosamente válida para potenciales superficiales menores de 25 mV aproximadamente.

Segunda: Debemos examinar el significado físico de la constante κ . De la ecuación (23), podemos ver que para que el término del exponente sea adimensional, κ , debe tener las dimensiones de una longitud inversa, con lo que κ^{z^1} tiene las dimensiones de una longitud. Escribiendo la ecuación (23) en términos de κ^{z^1}

$$\Psi_{(x)} = \Psi_0 \exp\left(-\frac{x}{\kappa^{-1}}\right)$$
 (26)

podemos ver que cuando $x = \kappa^{1}$, $\Psi = \Psi_{\theta} / e$ denominándose a κ^{1} "espesor " de la doble capa (ver Figura 8). Como κ^{1} es un parámetro muy importante, es conveniente expresarlo en términos de concentraciones iónicas. Así, si C_{i} es la concentración en moles por litro y dado que n_{i} expresa (n° de iones) / m³, podemos poner

$$n_{i_0} = 1000 N_A C_i \tag{27}$$

donde N_A es el número de Avogadro. Por tanto la ecuación (21) quedará como sigue

$$\kappa = \left[\frac{1000N_{\text{ref}}e^2}{\varepsilon k T} \sum_i z_i^2 C_i\right]^{1/2}$$
(28)

Obsérvese que el sumatorio de la ecuación anterior es igual a dos veces la fuerza iónica de la disolución. Hiemenz (1986) propuso una tabla de valores de κ^{-l} , obtenidos mediante la ecuación (28) para disoluciones electrolíticas acuosas a 25°C, en función de la concentración del electrólito y de la valencia de sus iones (Tabla 4).

	Electrólito	o Simétrico	Electrólito Asimétrico		
Molaridad del Electrólito	Z^+ : Z^-	κ ⁻¹ x 10 ⁹ (m)	Z^+ : Z^-	$\kappa^{-1} \ge 10^9 (m)$	
0,001	1:1	9,61	1:2;2:1	5,56	
	2:2	4,81	1:3;3:1	3,93	
	3:3	3,2	2:3;3:2	2,49	
0,01	1:1	3,04	1:2;2:1	1,76	
	2:2	1,52	1:3;3:1	1,24	
	3:3	1,01	2:3;3:2	0,787	
0,1	1:1	0,96	1:2;2:1	0,556	
	2:2	0,48	1:3;3:1	0,393	
	3:3	0,32	2:3;3:2	0,249	

Tabla 4 Valores de κ^{-1} para disoluciones electrolíticas acuosas a 25°C

Finalmente es útil, a veces, expresar la ecuación (24), en términos de la densidad superficial de carga, σ^* . En base a los requerimientos de electroneutralidad, la carga total sobre la pared del capilar debe ser igual a la carga total en la disolución cambiado de signo, por lo que

$$\sigma^* = -\int_0^\infty \rho_{(x)} dx \tag{29}$$

Combinando las ecuaciones (19) y (29), resulta una expresión que relaciona Ψ y σ^*

$$\sigma^* = \varepsilon \int_0^\infty \frac{d^2 \Psi}{dx^2} dx \tag{30}$$

de cuya integración con las condiciones de contorno :

(1)
$$\Psi = \Psi_0$$
 para $x = 0$; y (2) $(d\Psi/dx) = 0$ para $x = \infty$
obtiene

$$\sigma^* = \varepsilon \kappa \Psi_0 \tag{31}$$

De este modo, la ecuación (31) nos da una relación entre la densidad de superficial de carga y el potencial eléctrico en la superficie del capilar para una disolución electrolítica dada. Si sustituimos la ecuación (31) en la ecuación (24), ésta nos queda en función de la densidad superficial de carga:

$$\rho_{(x)} = \kappa \sigma^* \exp(-\kappa x) \tag{32}$$

Perfil de Velocidad Electroosmótico

Ahora que se dispone de una relación cuantitativa para $\rho(x)$, se puede determinar el perfil de velocidad para el flujo electroosmótico. La naturaleza de este perfil es una de las razones fundamentales de la gran eficacia de la separación (o baja dispersión) que es posible en separaciones EC.

Este problema fue resuelto en un principio por Rice y Whitehead (1965) para el flujo en capilares cilíndricos. El desarrollo que vamos a ver se ajusta al de Rice, aunque lo hacemos en coordenadas rectangulares para mejorar la claridad del tratamiento.

El fenómeno de la electroósmosis surge cuando se aplica un gradiente de potencial a los extremos de un capilar, dando lugar a que el líquido fluya por él. El potencial Zeta, ζ , es el potencial eléctrico en el plano de deslizamiento entre el líquido fijo y el móvil. Con objeto de visualizar este plano de deslizamiento se considererá la Figura 9.



CARACTERIZACION, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACION DE UNA PLANTA EDR

2.22

En la Figura 9 se representa la distribución de los iones en las proximidades de la pared del capilar, existiendo una capa de iones de un signo, en este caso positivos, cerca de la pared, formando una capa rígida. A continuación existe la capa difusa, formada por iones de signo opuesto, formando una nube iónica, de la que sólo se han dibujado los más cercanos a la pared. La distribución alrededor de la pared es análoga a la descrita para el modelo de Stern, y el potencial asociado con dicha distribución es el representado en la parte inferior de la Figura 9. A una distancia cercana a la pared, representada por la línea de trazos, hay una superficie de deslizamiento. La capa de líquido comprendido entre la pared y dicha superficie está tan firmemente adherida al sólido, que no se mueve al aplicar la diferencia de potencial a los extremos del capilar. Sólo el líquido dentro de esta superficie separa la parte del líquido fija de la móvil, es por lo que se le llama superficie de deslizamiento. El potencial que existe en esta superficie de deslizamiento, es el **potencial zeta**, ζ , que como se indica en la Figura 9 es un poco inferior al potencial, Ψ_d , que corresponde al comienzo de la doble capa difusa.

La relación entre la velocidad del líquido y el potencial zeta, ζ , se puede calcular como sigue. Si fijamos el eje del capilar como eje z (Figura 10), al aplicar un gradiente de potencial, E=dV/dz, en los extremos del capilar, cada capa de líquido de espesor, dx, se mueve con velocidad uniforme paralela a la pared, solicitada por una fuerza

$$dF_1 = E \, dq \tag{33}$$



donde, dq, es la carga elemental que hay en el elemento de volumen, $d\tau$, que se indica en la Figura 10, y que viene dado por la expresión

$$dq = \rho \, d\tau \tag{34}$$

donde ρ es la densidad de carga por unidad de volumen. Para, $d\tau$, de acuerdo con la Figura 10, se tiene

$$d\tau = 2\pi (a - x) l dx \tag{35}$$

donde, a, es el radio del capilar, l, es la longitud del capilar, y, x, es la distancia que hay desde la pared del capilar hasta la capa de líquido considerada, de espesor, dx. Sustituyendo las ecuaciones (34) y (35) en la ecuación (33) obtenemos

$$dF_1 = E \rho 2 \pi (a - x) l dx \tag{36}$$

Por otra parte, a este movimiento del líquido se opone una fuerza de fricción debida a la viscosidad, dada por

$$\frac{dF_2}{dS} = \eta\left(\frac{dv}{dx}\right) \tag{37}$$

siendo, η , el coeficente de viscosidad del medio, y donde, ν , es la velocidad del líquido. Sobre toda capa cilíndrica cuyo eje coincida con el eje del capilar, se tiene que : $(d\nu/dx) = cte$. Así, podemos realizar la integración de la ecuación (37) entre, x, y, x+dx,

$$\int dF_2 = \int \eta \left(\frac{dv}{dx}\right) dS \tag{38}$$

con lo que se obtiene

$$F_{2(x)} = \eta \left(\frac{dv}{dx}\right)_{x} 2\pi (a-x)l$$
(39)

$$F_{2_{(x+dx)}} = \eta \left(\frac{dv}{dx}\right)_{x+dx} 2\pi \left(a - x - dx\right)l$$
(40)

en donde podemos despreciar el término, dx, correspondiente al espesor entre capas. Por tanto, la diferencial de la fuerza F_2 , queda como

$$dF_2 = F_{2_{(x+dx)}} - F_{2_{(x)}} = \left[\eta\left(\frac{dv}{dx}\right)_{x+dx} - \eta\left(\frac{dv}{dx}\right)_x\right] 2\pi(a-x)l$$
(41)

de donde

$$dF_2 = \left[\eta \frac{d^2 v}{dx^2}\right] 2\pi (a-x) l dx$$
 (42)

Alcanzado el régimen estacionario $dF_1 + dF_2 = 0$ (utilizando la notación de escalares con signo para las fuerzas) y por tanto, partiendo las ecuaciones (36) y (42) se obtiene

 $-E\rho = \eta \frac{d^2 v}{dx^2} \tag{43}$

Para resolver la ecuación (43) se hará uso de la ecuación (19). Si el capilar es uniforme, E = dV/dz = V/l, donde, V, es el potencial aplicado y, l, la longitud del mismo. Sustituyendo en (43) se sigue

$$\frac{d^2v}{dx^2} = \frac{V\varepsilon}{\eta l} \frac{d^2\Psi}{dx^2}$$
(44)

que, integrada entre x e ∞ , da

$$\left[\frac{dv}{dx}\right]_{x}^{\infty} = \left[\frac{V\varepsilon}{\eta l}\frac{d\Psi}{dx}\right]_{x}^{\infty}$$
(45)

Si el diámetro del tubo es grande comparado con el espesor de la doble capa, κ^{-1} , entonces para $x > \kappa^{-1}$, se tiene que $d\Psi/dx = 0$ y dv/dx = 0, ya que lejos de la superficie de deslizamiento Ψ es constante y v también. Por tanto

$$\frac{dv}{dx} = \frac{V\varepsilon}{\eta l} \frac{d\Psi}{dx}$$
(46)

que nos indica que el gradiente de velocidad es proporcional al gradiente de Ψ Por esto, el perfil de velocidad tiene la forma indicada en la Figura 9, ya que excepto a distancias cercanas a la superficie de deslizamiento, Ψ es prácticamente nulo.

Integrando de nuevo en la ecuación (46) entre 0 y S, donde, S es la distancia a la superficie de deslizamiento

$$\left[\nu\right]_{0}^{S} = \left[\frac{V\varepsilon}{\eta l}\Psi\right]_{0}^{S}$$
(47)

Puesto que a la distancia x = 0 (plano de corte), se tiene que v = 0 y $\Psi = \zeta$, y a la distancia x = S, tenemos que v = v y $\Psi = 0$, queda finalmente que

$$v = -\frac{V\varepsilon\zeta}{\eta l} \tag{48}$$

La característica más notable de la ecuación (48) es que nos dice que la velocidad del fluido *no es una función de la posición radial*, lo que nos conduce a un perfil de velocidad "plano", que es el que hace posible la baja dispersión encontrada en los procesos de separación EC.

La ecuación (48) se puede emplear para calcular la velocidad del flujo electroosmótico en la electroforesis, que es el fenómeno inverso a la electroósmosis en cuanto a la fase móvil se refiere (cuando se aplica un campo eléctrico, en la electroósmosis el líquido se mueve y el sólido está fijo, mientras que en la electroforesis el líquido está en reposo y la fase móvil es la sólida). Así, podemos poner para la velocidad del flujo electroosmótico v_{EOF}

$$v_{EOF} = \frac{V_{\varepsilon}\zeta}{\eta l} = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{\eta}\right)E$$
(49)

2.24

Si dividimos la velocidad del flujo electroosmótico v_{EOF} por el campo eléctrico E, se obtiene la movilidad electroforética (μ_{EOF}), resultando

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \tag{50}$$

que es la llamada *ecuación de Smoluchowski*³⁵. La gran cantidad de datos existente sobre medición y cálculo de potenciales zeta^{27,33-34}, puede utilizarse directamente para medir la magnitud y dirección del flujo electroosmótico v_{EOF} , en electroforesis capilar, de acuerdo con la ecuación anterior.

La Figura 9 muestra esquemáticamente como el signo de las cargas de la pared determina la dirección del flujo electroosmótico. En la zona inmediatamente próxima a la pared del capilar, se transportan cargas negativas, y se observan dos tipos de especies: los dipolos orientados de las moléculas de agua y, los cationes solvatados relativamente grandes. Así, una cantidad de las cargas de la pared está cubierta, sólo relativamente poco, por los dipolos orientados con sus caras positivas hacia ellas; es posible que por agitación térmica u otras causas, se genere un movimiento de las cargas de ida y vuelta hacia la pared. Esto da lugar a un número de cargas negativas, sin sus correspondientes cargas positivas que las contrarresten, en la zona inmediatamente próxima a ella produciéndose un valor negativo del potencial zeta. El exceso de cargas negativas, sin sus correspondientes cargas positivas que las contrarresten es inmediatamente compensado, desde una gran distancia, por el número correspondiente de cationes. Esto permite el reconocimiento de dos regiones de perfil de fluido junto a la interfase sólida : primero la capa de Helmholtz, relativamente rígida y estancada, pegada a la pared, y segundo la capa de Stern, más difusa, menos organizada y más alejada de la interfase sólido - líquido. Si ambas capas se sitúan en un campo eléctrico con una orientación paralela a la superficie sólida, es posible inducir un movimiento hacia el cátodo de los pocos aniones solvatados de la capa de Stern. Estos aniones solvatados en su movimiento, arrastran moléculas de agua a lo largo del capilar, dando como resultado un flujo electroosmótico.



Como se puede observar en la Figura 11, el perfil hidrodinámico correspondiente al flujo electroosmótico (parte B), es diferente del perfil que se observa cuando un líquido fluye debido a una diferencia de presión hidrostática (parte A), entre el interior y el exterior de un capilar. Como veremos, este perfil especial del flujo electroosmótico es una de las causas del incremento de la eficacia de la separación en la electroforesis capilar, comparada con otras técnicas, como por ejemplo la cromatografía líquida en columna.

b) Capilares

Como se ilustra en la parte C de la Figura 11, modernamente se emplean los capilares de sílice fundida envueltos en una capa de poliimida. El que tengan un diámetro interno estrecho es una precondición necesaria para una disipación eficaz del calor provocado por el efecto Joule, a través de la pared del capilar, ya que a diámetros demasiado grandes (superiores a 120 μ m) es prácticamente imposible aplicar el campo eléctrico necesario para el movimiento de las especies iónicas en la dirección del electrodo correspondiente. Por causa de una disipación del calor insuficiente, el electrólito que esta dentro del capilar se sobrecalienta y comienza a hervir, dando como resultado, primeramente unas fuertes fluctuaciones de la corriente eléctrica, y finalmente, su interrupción como consecuencia de las burbujas formadas en las últimas etapas de la ebullición. La capa de poliimida envuelve al material de sílice fundida, que por sí mismo es muy frágil y quebradizo, pero que gracias a la flexibilidad de esta envoltura se puede disponer en arrollamientos pequeños. En la superficie del capilar existen grupos *silanoles* (átomos de silicio unidos a grupos OH) como se indica en la Figura 12.



El valor del *pK* del ácido ortosilícico en su primera disociación :

$$Si(OH)_4 + H_2O \xrightarrow{} SiO(OH)_3^- + H_3O^+$$

es 9,9 . El valor del pK de la superficie de los grupos silanol obtenido por datos de infrarrojos³⁷ es aproximadamente de 7,7. La diferencia con el valor para el ácido ortosilícico en disolución, se explica por las interacciones π (d - p) a lo largo de la cadena de enlaces, Si - O, en la estructura de la sílice, dando como resultado, una carga positiva parcial sobre el átomo de silicio de los grupos silanoles disociados³⁶. Debido a la diferencia en el comportamiento químico de los grupos silanol, es preferible considerar su valor de pK en un rango alrededor del dado anteriormente en disolución. En agua pura o en disoluciones neutras o alcalinas, la sílice fundida exhibe un potencial zeta negativo. El valor absoluto del potencial depende del número de grupos silanoles disociados y se incrementa con el pH. A un pH aproximadamente de 2, la disociación de todos los grupos silanoles de la superficie se suprime completamente y el valor del potencial zeta se aproxima a cero. Por consiguiente el flujo electroosmótico a pH = 2 es aproximadamente cero. Por debajo de pH = 2 la pared de sílice exhibe una carga positiva de acuerdo con la reacción:

$$\equiv Si - OH + XH \quad \rightleftharpoons \quad \equiv Si - OH_2^+ + X^-$$

cuya validez puede ser verificada por medidas electroforéticas directas a pH = $1,2^{36}$.

Esta claro que dependiendo del uso previo de un capilar y de sus condiciones de almacenamiento (humedad, temperatura, duración), el número y la disociación de los grupos silanoles puede variar en un rango amplio, dando grandes cambios del potencial zeta. *Estos cambios del potencial zeta afectan a la reproducibilidad de los tiempos de migración en EC*. La conversión gradual de los grupos siloxano (Si - O - Si) en grupos silanol (Si - O - H) que se produce según la reacción :

$$Si - O - H + Si - O - H \xrightarrow{\sim} Si - O - Si + H_2O$$

es un proceso lento que en medio seco se mide en semanas más que en días. Sin condiciones de limpieza, la conversión hacia grupos silanoles puede ser demasiado lenta, aún si la pared del capilar está expuesta a electrólito líquido. Con el fin de lograr un estado uniforme de los capilares de sílice fundida, al comienzo de su uso en EC, muchos investigadores han adoptado un pretratamiento alcalino del interior de la pared del capilar, por ejemplo forzando el paso de un volumen de 10 a 100µl a través del capilar. Sin este pretratamiento alcalino, los capilares de sílice fundida exhibirán un considerable efecto de histéresis, produciéndose una marcada variación de μ_{EOF} frente al pH³⁸.

Como está determinado por las propiedades ácidas de los grupos silanol, el flujo electroosmótico en capilares de sílice fundida esta dirigido hacia el electrodo negativo, las especies predominantes en la capa fina secundaria de Helmholtz son los cationes solvatados. Como se explicó en la Figura 4, esta dirección del flujo conduce a un análisis rápido de analitos catiónicos, (Figura 13³⁹), pero es totalmente contraproducente para el análisis de analitos aniónicos, que requieren un flujo electroosmótico hacia el electrodo positivo. Por tanto para analizar aniones es necesario invertir el flujo electroosmótico hacia el ánodo, así como también la polaridad de los electrodos⁴⁰⁻⁴³, esto se realiza mediante la adición de aditivos tales como las sales de alquilamonio de cadena larga, como por ejemplo el CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), o también por la adición de modificadores de la pared del capilar⁴¹⁻⁴⁶



electroosmótico. Se emplea un capilar de sílice fundida de 50 cm x 65 cm x 75 μ m, a 20 KV, con detección UV indirecta a 214 nm y electrólito portador de 5 mM UV Cat 1 (Waters), con 0,021 mM de citrato. Identificación de picos: 1) *Potasio*, 2) *Bario*, 3) *Estroncio*, 4) *Sodio*, 5) *Calcio*, 6) *Magnesio*, 7) *Litio*.³⁹

El cambio de signo del potencial zeta en los capilares de sílice fundida, después de la adición de sales de alquilamonio de cadena larga, fue estudiado por primera vez por Everaerts (1983) que evaluó la efectividad de varios modificadores de flujo electroosmótico, midiendo el potencial de corriente para el cálculo del potencial zeta en capilares de teflón (PTFE) y de sílice fundida. De todos los aditivos estudiados sólo el CTAB invierte la polaridad del flujo electroosmótico, es decir, que el flujo va desde el cátodo hacia el ánodo.

En 1989 Zare investigó otro aditivo que tenía mejor solubilidad en agua que el CTAB, el TTAB (bromuro de tetradeciltrimetilamonio), encontrando que producía una respuesta mejor que el anterior en los capilares de sílice fundida.

Bajo condiciones estándar en EC (caso B de la Figura 4), sólo se detectan los aniones lentos, si se invierte la polaridad, pero sin invertir el flujo electroosmótico, sólo se detectarán

2,28

los aniones más rápidos (casos I y J de la Figura 5); las condiciones óptimas para una separación de ambos tipos de aniones, se obtiene invirtiendo a la vez la polaridad y el flujo electroosmótico (casos D y E de la Figura 5).

Recientemente Altria y Simpson realizaron una investigación completa de la inversión del flujo electroosmótico en capilares de sílice fundida, empleando el modificador CTAB, encontrando un intervalo de movilidades electroosmóticas entre 18×10^4 y -12×10^4 cm² / V·s, con lo que se demuestra que la combinación de potencial negativo e inversor de flujo electroosmótico CTAB es útil para llevar a cabo el análisis de aniones.

Se ha visto que el análisis de aniones por EC necesita una inversión de polaridad (negativa) y del flujo electroosmótico (hacia el ánodo) con respecto al análisis EC de cationes. En ambos casos se emplean capilares de sílice fundida, que en principio, como ya vimos, tienen potencial zeta negativo (bien por la propia disociación de los grupos silanoles de la pared, bien por la adsorción de iones negativos sobre su superficie). Para explicar la inversión de carga sobre la interfase sólido - líquido, en el capilar, se postula la formación de **hemimicelas**, cuya formación depende de la concentración del aditivo. Las micelas son agregados de moléculas conocidas como surfactantes o tensoactivos. Un surfactante es una molécula de cadena larga (de 10 a 50 átomos de C) que se caracteriza por tener una parte hidrofóbica (cola) y otra hidrofílica (cabeza). Normalmente las micelas se forman en disolución acuosa, con la parte hidrofóbica dirigida hacia su interior y la hodrofílica hacia el exterior de la misma, como consecuencia del efecto de hidrofobicidad, y se forman para disminuir la energía libre del sistema , y no se producen hasta que no se supera un cierto nivel de concentración denominado *concentración crítica micelar* (CCM). La CCM depende de varios parámetros, tales como la naturaleza del surfactante y su entorno fisico-químico.

Hay cuatro grandes grupos de surfactantes: aniónicos, catiónicos, zewiteriónicos y no iónicos, algunos de los cuales se indican en la Tabla 5. De todos ellos los más empleados son los aniónicos y catiónicos; y dentro de estos últimos, el más empleado es el CTAB.

Surfactante	Estructura	CCM (mM)	N
Aniónicos			
Dodecilsulfato sódico (SDS)	$C_{12}H_{25}OSO_3-Na^+$	8,1	62
Octilsulfato sódico (SOS)	$C_8H_{17}OSO_3-Na^+$	136	20
Catiónicos			
Cloruro de hexadeciltrimetilamonio (CTAC)	C ₁₆ H ₃₃ N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl ⁻	1,3	78
Bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB)	$C_{12}H_{25}N^{+}(CH_{3})_{3}Br^{-}$	15	50
Zewiteriónicos			
(SB - 12)	C ₁₂ H ₂₅ (CH ₃) ₂ N ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻	1,2	44 1
No iónicos			*
Polioxietileno-t-octilfenol (Triton X-100)	(CH ₃) ₃ CCH ₂ C(CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ (OCH ₂ CH ₂) _{9,5} OH	0,2	143

Tabla 5

CCM y número de agregación (N) de algunos surfactantes comúnmente empleados en EC

CARACTERIZACION, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACION DE UNA PLANTA EDR

La concentración necesaria para la formación de hemimicelas se puede calcular a partir de los valores de CCM dados en la bibliografia³⁹. Una vez que se han formado las hemimicelas, es obvio que se ha cubierto toda la pared del capilar y se ha invertido la carga de la misma (Figura 14). En EC, en general, es indeseable cualquier interacción de los analitos con la pared del capilar, lo que es válido en la mayoría de los casos para los capilares de sílice fundida sin tratar, los modificados con hemimicelas y los permanentemente modificados. La adición de modificadores químicos de la pared del capilar tiene, en principio, el único propósito de modificar o influenciar al flujo electroosmótico.



2.2.4 Modos de Separación en Electroforesis Capilar

Como hemos visto las principales contribuciones al movimiento de los iones en EC son:

1^a) La movilidad electroforética del ion analito que depende de la razón, carga / radio iónico.

2^a) El flujo electroosmótico, dependiente de la polaridad y magnitud de la carga sobre la pared del capilar.

Las combinaciones entre los vectores electroforético y electroosmótico ya fueron resumidas en las Figuras 4 y 5.

Como electroforesis y electroósmosis son las principales fuentes de selectividad en EC, es útil definir dos de los modos de separación principales con la ayuda de las dos posibles configuraciones de los vectores, así si los dos llevan la misma dirección hablaremos de EC

2.30

Coelectroosmótica y si los dos llevan direcciones contrarias hablaremos de EC Contraelectroosmótica.

Para la mayoría de los iones, la mera combinación de electroósmosis y electroforesis no debe ofrecer una selectividad suficiente para una separación satisfactoria de unos picos con respecto a otros en la misma mezcla, ya que los analistas se ven forzados frecuentemente a refinar las separaciones EC utilizando interacciones del analito con componentes convenientemente adecuados en los electrolitos, o como en el caso de separaciones de partículas, por interacción inducida entre la partícula que va a ser separada y la pared del capilar. Una visión general de las contribuciones a la movilidad observada resultante μ_{abs} se dió en la Figura 2.

A la vista de todo lo expuesto anteriormente nos podemos preguntar : ¿ Como son las distintas combinaciones de los vectores de movilidad que definen un modo de separación EC realizado bajo condiciones prácticas ?. ¿ Cual es la interrelación entre los modos de separación citados ?. ¿ Es posible combinar más de un modo, para una separación dificultosa ?. Con el fin de obtener algunas respuestas a estas cuestiones, consideramos todas las posibles combinaciones de los vectores electroforético y electroosmótico dadas en la bibliografía.

La Tabla 6 muestra los términos descriptivos más comunes para las separaciones EC.

Nombre	Abreviatura	Descripción
Electroforesis Capilar	EC	Nombre general para todas las separaciones elec- troforéticas en capilares. También llamada Electro- foresis Capilar de Alta Resolución. (HPCE)
Electroforesis Capilar de Zona	CZE	Originalmente sinónima con EC. Usada mayormen- te para separaciones contraelectroosmóticas. Otra versión del nombre es Electroforesis Capilar de Zona de Alto Voltaje. (HVCZE)
Análisis Capilar de Iones	CIA	EC Coelectroosmótica con detección UV indirecta.
Electroforesis Capilar de Gel	CGE	Separación EC en capilares llenos con gel.
Electroforesis Capilar Contramigracional	CMCE	Tamización molecular de macromoléculas bajo condiciones CZE.
Cromatografia Capilar Electrocinética Micelar	MECC	Separaciones CZE combinadas con interacciones de analitos con micelas.Otro término es Cromatografia Micelar Electrocinética. (MEKC)
Cromatografia Electrocinética de Intercambio Iónico	IEEKC	EC Contraelectroosmótica intensificada por adición de intercambiadores iónicos poliméricos a los electrolitos portadores.

Tabla 6									
Glos	ario	de	Términos	para	los	Modos	de	Separ	ación

A continuación enunciaremos todos los modos de separación :

- 1°) Tamización Molecular Electroforética en Capilares de Diámetro Estrecho.
 - Electroforesis Capilar de Gel.
 - Electroforesis Capilar en Electrolitos Portadores Tamizadores.
- 2°Y Electroforesis Capilar Contraelectroosmótica.
- 3°) Electroforesis Capilar Coelectroosmótica.

2.32 CARACTERIZACION, EVALUACIÓN Y OPTIMIZACION DE UNA PLANTA EDR

4°) Modos de Separación Auxiliares.

- Interacciones de Intercambio Iónico.
- Interacciones de Complejación.
- Separaciones EC de Moléculas Neutras Realizada por Asociación de Carga.
- Interacciones Micelares.
- Formación de Complejos de Inclusión.

5°) Separación de Partículas por Electroforesis Capilar.

De todos ellos pasaremos a describir más detalladamente, debido a la importancia que tienen para nuestro trabajo, los siguientes : La Electroforesis Capilar Coelectroosmótica (CIA) y las Interacciones de Complejación.

La Electroforesis Capilar Coelectroosmótica es una aproximación optimizada de las separaciones EC para un grupo de iones del mismo tipo de carga. La aproximación sistemática para los analitos con las mismas cargas fue primero introducida bajo el nombre de CIA (*Capillary Ion Analysis*)⁴⁷. Los aniones son analizados bajo condiciones que son totalmente diferentes a las de los cationes. La principal ventaja de esta aproximación es que tanto los iones "rápidos" como los "lentos", se pueden separar con un solo electroferograma, con un tiempo de análisis mucho más corto que el de algunas técnicas de separación convencionales, como por ejemplo la cromatografia líquida (HPLC). Si se escogen las condiciones coelectroosmóticas adecuadas, se pueden excluir los iones de carga opuesta y las especies neutras del electroferograma, obteniéndose la disminución de las interferencias posibles de la muestra. El ahorro de tiempo de análisis llevado a cabo por esta técnica, proviene de la adición de los vectores de movilidad, como puede verse en la Figura 15.



Los tiempos de análisis relativamente largos del modo contraelectroosmótico, están causados por la sustracción de los vectores de electroforesis y electroósmosis. El decrecimiento de interferencias, es debido a que los vectores de las especies catiónicas llevan dirección opuesta y a la movilidad electroforética nula de los compuestos neutros. Como se puede deducir de los Casos D y E de las Figuras 4 y 5, las especies neutras y con carga opuesta migran después del último pico de interés en la EC Coelectroosmótica. Al contrario que en la cromatografia en columna, en EC no es necesario esperar a que todos los componentes de la muestra estén fuera del sistema; así, un procedimiento estandar en EC, consiste en interrumpir la separación después de que el último pico de interés haya sido detectado, procediéndose después al lavado y llenado con electrólito nuevo del capilar, con lo que el sistema está listo para analizar otra muestra.

Un ejemplo de EC Coelectroosmótica aplicada a una muestra compleja de aniones, se da en la Figura 6, hay que notar que la polaridad del extremo de la inyección es negativa y el flujo electroosmótico esta dirigido hacia el electrodo positivo, que está situado detrás del detector.

Por otra parte, la configuración del dispositivo para cationes es similar al de una CZE (empleada para separaciones contraelectroosmóticas) convencional, es decir con la polaridad del extremo de la inyección positiva, pero los vectores de movilidad de los analitos y el vector de movilidad electroosmótica llevan la misma dirección. Esto se puede ver en la Figura 4 en los Casos F y G.

Las Interacciones de Complejación son las que se dan entre los cationes y aniones de la muestra con un ligando adecuado para, por una parte, disminuir la movilidad de un ion libre, o por otra, inducir selectividad para separar dos o más iones con movilidades similares. Las especies complejadas serán grandes, poseerán una menor carga, y migrarán en general mucho más lentamente que los iones completamente disociados. Como las constantes de estabilidad para metales, aún del mismo período o grupo de la Tabla Periódica, varían en un rango amplio, es posible modular la migración de un gran número de iones. Así, se pueden realizar buenas separaciones en EC de iones con valores muy próximos de movilidades electroforéticas, que de otra forma serían muy difíciles de separar, teniendo en cuenta únicamente sus movilidades electroosmóticas inherentes.

El primer ejemplo de el uso de un ligando orgánico bajo condiciones EC, fue la separación de bismuto y cobre con ácido láctico realizado por Hjerten¹³. Posteriormente en el año 1983 Janak y colaboradores⁴⁸ usaron cadmio añadido al electrólito portador, para ralentizar la migración de los aniones rápidos NO_3^- , SO_4^{-2} y Cl⁻ y hacer posible su separación bajo condiciones EC Coelectroosmóticas con la polaridad positiva en el extremo de la inyección (convirtiendo el Caso C en el B de la Figura 4). En el año 1990, Boeck y col.⁴⁹ introducen una aplicación de ligandos orgánicos para la separación de cationes, con velocidades similares de electromigración.

En la Figura 16 aparece la influencia de la complejación sobre la movilidad electroforética observada.

Por otra parte, la formación de complejos de inclusión se observa en moléculas que tienen una cavidad bien definida en su estructura. Los dos ejemplos más conocidos de moléculas de este tipo son los éteres corona y las ciclodextrinas (Figura 17).

La dimensión de la cavidad de los éteres corona los hace ideales para interacciones selectivas con los cationes alcalinos. Las ciclodextrinas pueden formar complejos de inclusión con un gran número de compuestos orgánicos, neutros o cargados. Sin embargo, parece ser que, en principio, son convenientes para su empleo con compuestos cargados, pero si se quieren emplear con compuestos neutros deben modificarse con un sustituyente ionizable. Los complejos de inclusión dan una selectividad adicional para las separaciones EC de cationes, aniones y moléculas neutras (Figura 18). Así, se puede mejorar la selectividad en la separación de cationes por la adición de éteres corona, también se pueden mejorar las separaciones de mezclas racémicas de aminas mediante la adición de ciclodextrinas, etc.

La mejora de la selectividad en las separaciones EC se debe a que se producen valores diferentes de los equilibrios de complejación entre la molécula secuestrante por una parte, y los iones del analito, o las moléculas neutras por otra. La mejora es considerablemente mayor en la resolución de analitos iónicos que en los neutros, pero aún así, la mejora en la separación es considerable en éste último caso, y por ejemplo se pueden separar isómeros diferentes de las ciclodextrinas.





2.2.5 Eficacia y Resolucion en EC, Separaciones bajo Condiciones Optimas

La eficacia de las separaciones en EC se evalúa por el cálculo de los *platos teóricos*. Este concepto fue inicialmente desarrollado para la extracción por destilación en contracorriente. Después fue aplicado sucesivamente, para evaluar la eficacia de la separación en técnicas de cromatografía de gases y de fase líquida. La evolución gradual del término "*plato* " desde las medidas reales en destilación y extracción, al término abstracto "*plato teórico* " en técnicas de columna cromatográfica, viene en función de la química analítica instrumental⁵⁰. En un artículo publicado en 1967, Giddings⁵¹ justifica la expansión del concepto de plato teórico, como medida de la eficacia en electroforesis, y después para medir la eficacia máxima de separación obtenida por esta técnica.

El concepto fundamental, que hace posible la aplicación de los platos teóricos a un amplio rango de técnicas de separación, es la velocidad de generación de varianza, $d\sigma^2/dL$. El término varianza, σ^2 , tiene su origen en la teoría de la probabilidad. El parámetro σ describe la desviación estandar de una distribución gausiana, relacionándolo con la anchura de las curvas de dicha distribución⁵² a la mitad de la altura máxima. L es la longitud de una separación en cm, en nuestro caso, es la longitud del capilar desde la introducción de muestra hasta el punto de detección, L_d .

La meta de las técnicas electroforéticas y cromatográficas, es obtener zonas separadas tan estrechas como sea posible. Por consiguiente los sistemas con una baja velocidad de generación de la varianza están descritos como los más eficaces.

La Figura 19 nos muestra dos separaciones de idéntica selectividad. La selectividad se mide como la distancia entre los puntos mas altos de los picos (d). La separación en A se describe usualmente como incompleta, pues hay grandes porciones de zonas de analito solapadas. La separación B tiene la misma selectividad, pero los picos son más estrechos, y por tanto están separados más eficazmente



Según Giddings, cuando se tiene unas condiciones óptimas para las separaciones en EC, que asumen que la única causa del ensanchamiento del pico es la difusión molecular, una "varianza" o anchura de una zona de sustancia disuelta en una fase líquida, transcurrido un tiempo t después de su introducción como un segmento estrecho, depende sólo de su coeficiente de difusión molecular D

$$\sigma^2 = 2Dt \tag{51}$$

La velocidad de generación de la varianza, $d\sigma^2/dL$ viene dada por

$$\frac{d\sigma^2}{dL} = 2D\frac{dt}{dL}$$
(52)

y como dt/dL es igual a v⁻¹, y la altura de plato teórico es H = 2D/v, resulta

$$H = \frac{d\sigma^2}{dt}$$
(53)

En cuanto al número adimensional de platos teóricos N, se tiene

$$N = \frac{L_d}{H} = \frac{L_d \nu}{2 D} \tag{54}$$

donde, L_d , es la longitud del capilar hasta el punto de detección, v, es la velocidad de migración y, D, es el coeficiente de difusión de la sustancia en cuestión. La ecuación (54) especifica, que la eficacia de la separación mejora, de la misma forma que lo hace la velocidad de migración electroforética, llegando a ser más significativa que la velocidad de difusión.

Una vez que se tienen desarrolladas las relaciones teóricas fundamentales para la velocidad de migración y para los platos teóricos en EC, se puede obtener una expresión que conecta la eficacia de la separación con parámetros termodinámicos. Si sustituimos D por RT/ξ en la ecuación (54) donde, ξ , es la constante de fricción por mol para un medio dado $(\xi=I/\mu_{obs}), R$, es la constante de los gases y, T, es la temperatura absoluta, se obtiene que

$$N = \frac{L_d \nu \xi}{2 RT} = \frac{L_d \nu}{2 \mu_{obs} RT}$$
(55)

Expresando la movilidad μ_{obs} , con ayuda de la ecuación (2) (o el coeficiente de fricción como $\xi = E/v_{obs}$), se obtiene

$$N = \frac{L_d E}{2RT}$$
(56)

El producto, $L_d E$, representa el potencial electroquímico (- $\Delta \mu_{elec}$) entre el punto de introducción de la muestra en el capilar y el punto de detección

$$L_d E = -\Delta \mu_{elec} = z_i F \Psi \tag{57}$$

donde, z_i , es la valencia del ion, F, es la constante de Faraday, Ψ , es el potencial eléctrico. Podemos escribir ahora la ecuación (54) de una forma alternativa, que predice la eficacia de la separación en función de parámetros termodinámicos

$$N = \frac{z_i F \Psi}{2 R T}$$

(58)

Mediante la aplicación de la ecuación (58) se llegó a un valor para el límite teórico del número de platos teóricos en EC y que era de 10⁵.

Jorgenson y Lukacs⁵³ llegaron a otra forma de la ecuación (58), reintroduciendo μ_{obs} y habida cuenta de que $D = RT\mu_{obs}$, obteniendo la ecuación

$$N = \frac{\mu_{obs} \Psi z_i F}{2D}$$
 (59)

en la que se observa que N es directamente proporcional al potencial de la separación Ψ , pero añadido a esto, la eficacia de la separación también se presenta como una función directa de la movilidad electroosmótica observada. Como hemos visto anteriormente, la movilidad electroosmótica observada, resulta de la adición vectorial de todas las contribuciones electroforéticas y electroosmóticas, al movimiento de los analitos iónicos (o no iónicos) en un campo eléctrico. La ecuación (59) aporta otra predicción importante, y es que *la eficacia máxima de la EC, se lleva a cabo sólo en aquellos casos donde los vectores de electroforesis y electroosmósis tienen el mismo sentido* (EC coelectroosmótica).

Sin embargo la optimización de las separaciones EC es más complicada, debido a una divergencia existente entre las condiciones óptimas para la eficacia de la separación, N, y para la resolución, R. Al igual que en la cromatografía, la Resolución en EC es una medida cuantitativa de la realización de una separación. La resolución, R, se define como la distancia entre los centros de los dos picos, dividido por el promedio de la anchura de cada pico (Figura 20)



2.38

$$R = \frac{x_2 - x_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

donde, x_1 , y, x_2 , son las posiciones de los centros de los picos para las especies 1 y 2 respectivamente, y w_1 , w_2 , son sus anchuras medidas en la base de los picos⁵⁴. Cuando la resolución es igual a 1,5, la separación de los picos es prácticamente completa, y los picos se consideran *resueltos en la línea base*.

La posición de un pico, x_i , viene determinada por su velocidad neta de migración, mientras que la anchura, w_i , viene determinada por la dispersión. El hecho de que EC sea una técnica de baja dispersión, nos da una base de su excepcional capacidad resolutiva.

En orden a describir completamente los picos resultantes de una separación EC, necesitamos una expresión que describa la concentración de un soluto, como una función de su posición dentro del capilar y del tiempo. Esta ecuación se puede obtener partiendo de la ecuación de difusión convectiva, dada por Fahien (1983), y basada en la segunda ley de Fick,

$$\frac{\partial C_i(x,t)}{\partial t} = \frac{D_i \partial^2 C_i(x,t)}{\partial x^2} - v_{z,i} \frac{\partial C_i(x,t)}{\partial x}$$
(61)

donde, C_i , es la concentración, D_i , es el coeficiente de difusión y, $v_{z,i}$, es la velocidad neta de migración de las especies i. La ecuación (61) plasma la conservación de masas, y establece que C_i cambia como resultado de un balance entre las moléculas que entran y las que salen de un volumen de control elemental, por un mecanismo de difusión / convección.

Nótese que en el caso de la electroforésis CZE (de " zona libre "), $v_{z,i} = \mu_{obs}$. *E*, donde μ_{obs} , es la movilidad observada de la especie *i*, ($\mu_{obs} = \mu_{ion} + \mu_{EOF}$) y *E*, es el campo eléctrico. La ecuación (61) asume que el único proceso dispersivo es la difusión molecular, y que el coeficiente de difusión no es una función de la concentración del soluto.

Para resolver la ecuación (61) se puede emplear el método de las transformadas de Fourier con las siguientes condiciones de contorno:

(1)
$$t = 0, x = \infty, C = 0; y(2) t > 0, x = 0, (dC/dx) = 0$$

La primera condición establece, que inmediatamente después de haber sido inyectada la muestra, lejos de la zona ocupada por ella, la concentración de soluto es cero; mientras que la segunda condición plasma que, debido a que la difusión ocurre a la misma velocidad en ambas direcciones, la zona de muestra permanece simétrica desde el principio hasta el fin de la separación. La condición inicial es que a t = 0, $C = (M/S) \delta(x)$, donde, S, es el área transversal del capilar, M, es la masa inicial de soluto y, $\delta(x)$, es la función delta de Dirac. Esto establece que inicialmente la zona de muestra es una zona de espesor infinitesimal. La solución de la ecuación (61) es⁵⁵

$$C_{i}(x,t) = \frac{M}{S\sqrt{4\pi D_{i}t}} \exp\left[-\left(\frac{\left(x-\mu_{obs}Et\right)^{2}}{4D_{i}t}\right)\right]$$
(62)

Obsérvese, que ésta es la expresión que relaciona la concentración de soluto i, con su posición dentro de capilar y con el tiempo. Como puede apreciarse la ecuación (62) corresponde a una distribución normal, o gaussiana

(60)

$$P(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(\frac{-(x-x_p)^2}{2\sigma^2}\right)$$
(63)

donde, P(x), es la densidad de probabilidad, x_p , es el valor promedio de la variable x, y, σ^2 , es la varianza de la distribución⁵⁶. Comparando las ecuaciones (62) y (63), se observa que la posición promedio de la zona que va migrando, viene dada por

$$x_p = \mu_{obs} E t \tag{64}$$

y que la varianza es

$$\sigma_D^2 = 2 D_i t \tag{65}$$

donde el subíndice D, indica que ésta es la varianza resultante solamente de la difusión.

Queda pues demostrado que la posición promedio de un pico, y su anchura, se pueden plasmar en términos de expresiones simples.

De acuerdo con Jorgenson y Lukacs, σ_D se puede escribir en términos del campo eléctrico *E*, sustituyendo en la ecuación (65) el valor de *t*, por el valor de *t_m* que se obtiene de las ecuaciones (1) y (2)

$$t_m = \frac{L_d}{v_{obs}} = \frac{L_d^2}{\mu_{obs} V} = \frac{L_d}{\mu_{obs} E}$$
(66)

de modo que

$$\sigma_D^2 = \frac{2D_i L_d}{\mu_{obs} E} \tag{67}$$

Si ahora se llevan las ecuaciones (64) y (65) a la ecuación (60), se obtiene una expresión para la resolución suponiendo que $w_i = 4\sigma_i$

$$R = \frac{\Delta \mu_{obs} E \sqrt{t}}{2 \sqrt{2} \left(\sqrt{D_1} + \sqrt{D_2}\right)} \tag{68}$$

donde $\Delta \mu_{obs} = \mu_{obs,1} - \mu_{obs,2}$, y, D_1 y D_2 son sus coeficientes de difusión respectivos. La ecuación anterior se puede generalizar, si se combina con la ecuación siguiente.

$$N = \frac{L_d^2}{\sigma_T^2} \tag{69}$$

resultante de sustituir en la ecuación (54) la ecuación (51), donde ahora, σ_r^2 , es la varianza total de la zona de muestra, que incluye las contribuciones de todos los fenómenos dispersivos.

Para nuestro caso particular, donde sólo se considera la difusión, combinando las ecuaciones (66), (67) y (69) resulta

$$N = \frac{\mu_{obs,p}^2 E^2 t}{2D_p}$$
(70)

donde, D_p , es el coeficiente de difusión promedio, y, $\mu_{obs,p} = [(\mu_{obs,l} + \mu_{obs,2})/2]$ es la movilidad electoforética observada promedio. Si se expresa la ecuación (68), en términos del coeficiente de difusión promedio, se llega a

$$R = \frac{\Delta \mu_{obs} E \sqrt{t}}{4 \sqrt{2} \sqrt{D_p}} \tag{71}$$

Despejando ($E[t]^{1/2}$) en (70) y llevando el resultado a (71) queda finalmente

$$R = \frac{1}{4} \frac{\Delta \mu_{obs}}{\mu_{obs,p}} N^{1/2}$$
 (72)

La ecuación anterior muestra que la resolución total viene dada en función de un término de selectividad, $\Delta \mu_{obs,p} / \mu_{obs,p}$, y de un término de eficacia, N. El término de selectividad viene determinado por las propiedades de los analitos y de la disolución reguladora, mientras que el término de eficacia viene dictado, principalmente, por las propiedades de la instrumentación.

De acuerdo con Giddings⁷⁸ y Jogenson⁸¹ la Resolución viene determinada por la siguiente ecuación

$$R = \left(\frac{N^{1/2}}{4}\right) \left(\frac{\Delta v}{v}\right) \tag{73}$$

donde, $(\Delta v/v)$, es la velocidad de migración relativa de dos zonas de analito que van a ser resueltas

$$\left(\frac{\Delta v}{v}\right) = \frac{\Delta \mu_{obs}}{\mu_{obs,p}} \tag{74}$$

recordando que $\mu_{obs} = \mu_{ion} + \mu_{EOF}$, la ecuación anterior queda en la forma

$$\left(\frac{\Delta v}{v}\right) = \frac{(\mu_{ion,1} - \mu_{ion,2})}{(\mu_{ion,p} + \mu_{EOF})}$$
(75)

de donde se deduce, que un incremento de μ_{ion} y μ_{EOF} hará decrecer el valor de la velocidad relativa para una pareja de picos dada. Con una disminución de la velocidad relativa, la resolución, también se verá disminuida. En aquellos casos donde la movilidad iónica inherente y la movilidad electroosmótica son las únicas contribuciones a la movilidad observada, se debe minimizar el término μ_{obs} . Un buen ejemplo de ello son la CZE o EC Contraelectroosmótica, en donde la movilidad electroforética y el flujo electroosmótico llevan direcciones opuestas y por consiguiente el resultado es valores muy pequeños de μ_{obs} .

Como se ha mencionado anteriormente, durante los últimos años, se han descrito múltiples vías para modificar las movilidades observadas de los analitos en un rango amplio; ello ha traído como consecuencia un aumento del ajuste de la selectividad por los modos auxiliares de separación. Así, la selectividad se puede modificar de manera que una disminución de las velocidades relativas no tiene porque llevar asociado una pérdida de resolución. La ventaja del uso de modos de separación auxiliares, bajo condiciones coelectroosmóticas es la considerable reducción de los tiempos de análisis y un aumento de la facilidad para analizar mezclas complicadas, con un gran número de componentes.

Como se puede observar en la Figura 21, la mejora de la eficacia de la separación ocurre simultáneamente con un deterioro de la resolución (A): maximizando, μ_{obs} , y, N, para una separación con una selectividad limitada; debido a que los picos están muy próximos, se produce una pérdida de selectividad, los picos aparecen solapados. Ajustando la selectividad para hacer posible una buena resolución, bajo condiciones en las que, N, también es maximizado. Los picos están más separados que en al caso anterior, apareciendo posteriormente más próximos pero totalmente resueltos (B).

Con la disponibilidad de los modos de separación auxiliares se puede considerar un cambio en la estrategia general para la optimización en EC. La electroforesis contraelectroosmótica, es un método a escoger en todos aquellos casos donde la estrecha migración de los analitos no pueda ser mejorada por métodos de separación auxiliares (como por ejemplo: complejación, equilibrios de disociación, etc.), este sería el caso de la mayoría de todas las macromoléculas biológicas. En todos los otros casos, con valores bastante diferentes de μ_{obs} , podemos esperar que las condiciones de la electroforesis coelectroosmótica den mejores resultados. Este sería el caso de la mayoría de los compuestos iónicos de bajo peso molecular.



2.2.6 Ensanchamiento de Pico y Pérdida de Resolución bajo Condiciones No Optimas en EC

El ensanchamiento y deformación de las zonas de pico pueden ser causados por numerosos parámetros experimentales. La optimización de las separaciones, se facilita por el hecho de que el fenómeno causante del ensanchamiento de pico se puede reconocer por las formas de los picos resultantes. Así, se han descrito en la bibliografia las siguientes causas de deformación y ensanchamiento de pico : artefactos de inyección⁵⁸, flujo hidrostático superpuesto al movimiento electrocinético de los analitos⁵⁸, gradientes radiales de temperatura^{57,59}, adsorción de analito sobre las paredes del capilar⁵⁹, y diferencias de conductividad y/o pH entre las zonas del analito y el electrólito portador^{19,59}. Además de estas causas primarias de deformación, es posible reconocer varias contribuciones secundarias, tales como por ejemplo, la influencia del diámetro del capilar. Con diámetros grandes, la eficacia de la separación generalmente decrece, debido a los gradientes radiales de temperatura elevados. No todas las contribuciones son igualmente importantes; así, el flujo hidrostático se reduce fácilmente al mínimo, manteniendo las superficies del electrólito al mismo nivel en ambos lados del sistema EC ; los iones de bajo peso molecular, el tema central de este trabajo, exhiben usualmente interacciones débiles con las paredes del capilar, bajo condiciones estandar EC (las interacciones grandes tienen lugar con las biomoléculas de gran tamaño).

Las contribuciones al decrecimiento de la eficacia de la separación que vamos a considerar, están limitadas a aquellos factores que influyen en la forma de los picos en compuestos iónicos de bajo peso molecular.

a) Artefactos de Inyección

Grunshka y MacCormick⁵⁸ obtuvieron una ecuación que relaciona la altura de plato teórico H, (deterioro de la eficacia de la separación) y la longitud de la zona de muestra ("pastilla") L_m . De acuerdo con los autores se puede esperar que la zona de muestra tenga una forma idealmente rectangular, después de una introducción electromigrativa de la muestra. Lo dicho anteriormente puede ser cierto, en menor grado, si la introducción de la muestra se hace de forma hidrostática. Así, se tiene

$$L_m = (24 DHt)^{1/2}$$
 (76)

donde, D, es el coeficiente de difusión (cm/s) y, t, es el tiempo de migración (s). Para una molécula pequeña que tiene un coeficiente de difusión de aproximadamente 10^{-5} cm/s, se puede calcular que la longitud máxima admisible del segmento inyectado es de aproximadamente 0,12 cm. Este cálculo esta basado en una pérdida admitida de la eficacia de la separación del 10% (H = 0,01) y un tiempo de migración de 600 s.

Los mismos autores también describen que puede ocurrir una inadvertida introducción de muestra dentro del capilar, aún antes de que se aplique el potencial electromigrativo de muestreo o la presión hidrostática, proponiendo tres mecanismos para estas introducciones atípicas de muestra :

- 1°) Desplazamientos de pequeños segmentos de muestra dentro del capilar causados por turbulencia durante la inserción del capilar dentro de la disolución.
- 2°) Salida (" outflow ") del electrólito portador desde el capilar y subsecuentemente entrada (" inflow ") de un volumen de muestra causado por viscosidad, tensión superficial y diferencias de densidad.

3°) Difusión de analitos dentro del capilar debido, a una elección incorrecta de los tiempos de espera entre inyecciones.

La inyección de muestra no detectada, causa longitudes del segmento de muestra introducido mayores que las esperadas, y en casos extremos conduce a un deterioro de la eficacia de la separación.

b) Calentamiento Joule como una Causa del Ensanchamiento de Pico

Ya se ha indicado, que son necesarios diámetros de capilar menores de 100 μ m para prevenir la ebullición de los electrolitos portadores, debido a las intensidades de corriente observadas a los valores de potenciales empleados para la separación. Los gradientes de temperatura entre el centro del capilar y el entorno próximo a las paredes exteriores del mismo, tienen gran interés, porque si se hacen suficientemente grandes, pueden conducir a un excesivo ensanchamiento de pico. Si la temperatura en el centro del capilar es más alta que la de la capa de líquido que está pegada a la pared del capilar, es posible que se observe una diferencia de viscosidad entre estos dos puntos (centro y pared del capilar). Las ecuaciones (11) y (50) describen las respectivas dependencias de la movilidad electroforética y electroosmótica con la viscosidad. Cuanto mayor es la temperatura menor es la viscosidad, y un decrecimiento de la viscosidad conduce a su vez a un incremento de la velocidad de migración en EC. En la Figura 22(a) podemos ver la distorsión de una zona de pico causada por una mayor velocidad migracional en el centro del capilar, en comparación con la región pegada a la pared.

Hjerten¹³ describió una relación cuantitativa, que permite predicciones de la magnitud de la distorsión de pico para un valor dado de intensidad de corriente, que viene dada por la ecuación

$$\left(\frac{\nu_r - \nu_R}{\nu_R}\right) = \frac{[BI^2 (R^2 - r^2)]}{\left(4 \kappa_e \pi^2 R^4 \lambda T_0^2\right)}$$
(77)

donde, v_r , y, v_R , son las respectivas velocidades a una distancia r del centro y en la pared R, I, es la intensidad de corriente, B, un parámetro que tiene un valor de 2400 K, κ_c , es la conductividad eléctrica, λ , es la conductividad térmica y, T_o , la temperatura exterior a la pared del capilar.

Para r = 0 y haciendo $\theta = [I / (\kappa_e \pi R^2)]$, la Ecuación (77) se simplifica en la forma

$$\left(\frac{\nu_0 - \nu_R}{\nu_R}\right) = \left(\frac{B\kappa_e}{\lambda}\right) \left(\frac{\Theta R}{2T_0}\right)^2 \tag{78}$$

donde v_0 es la velocidad de un analito en el centro del capilar. Esta ecuación se empleó para obtener una representación gráfica de dependencia de la zona de distorsión ($v_0 - v_R$) / v_R con el campo eléctrico, Figura 22(b). El gráfico de esta Figura, puede servir como punto de referencia rápida, para minimizar el ensanchamiento de pico debido a los gradientes de temperatura. Vemos que, por ejemplo, a 20 KV y a una longitud total del capilar de 60 cm, correspondiente a 333 V/cm, la zona de deformación térmica es despreciable para un diámetro interno del capilar de 75 µm. Por otra parte, para 30 KV y el mismo conjunto de parámetros (con 500 V/cm), la distorsión de pico se aproxima al 5%.

Es obvio que los capilares de mas de $100 \ \mu m$ de diámetro interno, exhibirán una considerable distorsión térmica de pico para la mayoría de las combinaciones usuales de los parámetros experimentales.

2.44



Figura 22

Distorsión de zona por gradientes de temperatura. a) La longitud de las flechas indica la velocidad, y se observa que es mayor en el centro del capilar. La anchura inicial de la zona de muestra, ΔX_0 a tiempo cero, crece durante la separación hasta $\Delta X_0 + \Delta X_1$. ΔX_1 es el ensanchamiento producido en la base del pico por el calentamiento. b) Representación gráfica de la ecuación (78) para varios valores paramétricos del diámetro del capilar, los otros parámetros tienen los valores: B = 2400 K, κ_e = 367 µS/cm, λ = 5,73 x 10⁻³ (J/s·cm·K) y T₀ = 274 K.⁶⁰

c) Deformaciones de Pico Causadas por Diferencias de Conductividad entre la Zona de los Analitos y el Electrólito Portador

En electroforesis de zona (CZE), la concentración de los iones del analito se mantiene relativamente baja con respecto a la del electrólito portador, en orden a mantener la diferencia de conductividad entre la zona de muestra y la del mismo tan pequeña como sea posible. Esto es así, para asegurar que el campo eléctrico a través del capilar sea constante y que cada ion de la muestra migre de forma independiente a una velocidad que es controlada por la movilidad electroforética. De forma alternativa, si los iones del analito contribuyen significativamente a la conductividad de la zona muestra, la migración del analito llegará a acoplarse con la de los iones del electrólito portador. Esta forma de electroforesis se conoce con el nombre de isotacoforesis. Considerando la CZE, si el ion del analito contribuye sólo ligeramente a la conductividad de la zona de muestra, aun así, se puede obtener como resultado un ensanchamiento significativo del pico.

Considerando la separación de alquilsulfonatos mostrada en la Figura 23, distinguimos claramente tres tipos de picos. Los picos 1 a 3 presentan un tipo de asimetría que podríamos llamar frontal, el pico 4 es simétrico y los picos de 5 a 7 muestran un fuerte colamiento.

Como explicaron Mikkers, Everaerts y Verheggen¹⁹ en 1979, estas asimetrías de pico pueden predecirse con la ayuda de valores relativos de movilidades electroforéticas o conductividades iónicas equivalentes (recuérdese que μ_{ion} = conductividad equivalente / constante de Faraday). Para los analitos que tienen movilidades electroforéticas más altas que la del similión principal del electrólito portador, se puede esperar que den picos frontales. Los picos con colamiento se producen cuando los iones analito tienen movilidades electroforéticas más bajas que la del similión principal del electrólito portador. Sólo para aquellos componentes de la muestra con movilidades electroforéticas muy similares a la del similión de un electrólito portador dado, puede esperarse que produzcan picos gaussianos completamente simétricos.

Hjerten⁵⁹ desarrolló una explicación cuantitativa de la asimetría de pico causada por las diferencias de conductividad / movilidad. La expresión aproximada para describir el ensanchamiento del pico es:

$$\sigma_{\Delta\kappa_e}^2 = \frac{\left(\mu_{obs}Et\right)^2}{16} \left(\frac{\Delta\kappa_e}{\kappa_e}\right)^2$$

Donde $\sigma_{\Delta\kappa e}^{2}$, es la varianza causada por diferencias de conductividad (m²), μ_{obs} , es la movilidad electroforética observada (m²·s⁻¹·V⁻¹), E, es el campo eléctrico (V/m), t, es el tiempo (s), $\Delta\kappa_{e}$, es la diferencia de conductividades entre la zona de muestra y el electrólito portador ($\Omega^{-1}\cdot m^{-1}$), κ_{e} , es la conductividad del electrólito portador ($\Omega^{-1}\cdot m^{-1}$). Así, para obtener el menor ensanchamiento de pico posible, se debe lograr que $\Delta\kappa_{e}$ sea lo más pequeño posible, en la práctica se tiende a que ($\Delta\kappa_{e}/\kappa_{e}$) < 0,5%.

La diferencia de conductividad entre una zona de muestra y el electrólito portador se describe por la ecuación

$$\Delta \kappa_e = \left(\frac{C_B}{\mu_B}\right) \cdot (\mu_A - \mu_B) \cdot (\mu_R - \mu_B)$$
(79)

donde los subíndices *B*, *A* y *R* corresponden respectivamente al ion de la muestra, similión del electrólito y contraión del electrólito, μ , representa la movilidad electroforética para cada especie y C_B la cantidad de carga, en C / cm³, transportada por el ion del analito [$C_B =$ (valencia x concentración molar de B x constante de Faraday) / 1000]. De acuerdo con la convención ampliamente aceptada, las movilidades de cationes tienen signo positivo, mientras que las de los aniones tienen signo negativo.

Para explicar el mecanismo de la distorsión de pico, consideraremos primero un caso donde la conductividad de la zona de muestra es más baja que la de la disolución del electrólito portador. Esto se debe frecuentemente a una movilidad mayor de los iones del electrólito portador ($\mu_A > \mu_B$). Vamos a asumir también, que la velocidad de difusión es menor que la velocidad de migración electroforética : $v^B > v_{dif}$ (velocidad de difusión). Esto se puede observar en la Figura 24, donde vemos la zona de ensanchamiento causada por una diferencia de conductividad entre las zonas de muestra (α) y del electrólito portador (β).



Figura 23

Separación de alquilsulfonatos homólogos. El electrólito portador es 5 mM de benzoato, a pH = 6, que contiene 0,5 mM de reactivo OFM BT de Waters como inversor del flujo electroosmótico; el voltaje de separación es de - 20 KV, la detección es UV indirecta a 254 nm, v las dimensiones del capilar son 52 cm x 60 cm x 75 μ m. Identificación de los picos: 1) Metanosulfonato, 2) Etanosulfonato, 3) Propanosulfonato, 4) Butanosulfo- nato, 5) Pentanosulfonato, 6) Hexanosulfonato, 7) Heptanosulfonato.⁶¹

La parte superior de la Figura 24 representa dos situaciones para una misma zona de muestra, dentro del capilar. En la parte de la izquierda vemos la zona de muestra antes de la aplicación del potencial de separación. En ausencia de una inyección de muestra no detectada, la zona de muestra tendrá una forma rectangular y una anchura de ΔX_0 . El movimiento de iones por difusión es independiente de la aplicación del voltaje de separación, y la difusión ocurre, por consiguiente, antes de que de comienzo la separación. Esto se representa por tres tipos diferentes de iones del analito, M, en la Figura: M₃ son los iones difundidos dentro del segmento de electrólito que está a la izquierda de la zona de muestra, M₂ son los iones que no pueden escapar de la zona de muestra y M1 son los iones que se han difundido dentro del electrólito portador hacia el interior del capilar.

2.47



En la parte de la derecha de la Figura 24, vemos la zona de muestra pasado un tiempo después de la aplicación del potencial de separación. Los tres tipos de iones están siendo sometidos ahora a valores diferentes del campo eléctrico, como consecuencia de las diferencias de conductividad entre la zona de muestra y la del electrólito portador. Bajo las condiciones de este experimento, la zona de muestra α , tiene menor conductividad y por consiguiente experimentará un campo eléctrico mayor que las zonas que llenan el resto del capilar con electrólito portador β . Los iones que tengan movilidades electroforéticas idénticas podrán migrar con mayor rapidez cuando se expongan a campos eléctricos más altos. La velocidad de los iones del analito en la zona de muestra, v^{α} , es, por consiguiente, mayor que la de los iones del analito que están dentro del electrólito portador, v^{β} . Los iones M_1 serán, por consiguiente, sobrepasados por los iones M_2 que migran a la misma velocidad que la zona de muestra. Esta situación conduce a la creación de una zona límite (I) bien definida. En la representación de la parte inferior de la Figura 24 viene indicado por una línea perpendicular. Los iones M_3 , como migraron desde la zona de muestra α hacia dentro del segmento del electrólito β , que sigue a la zona de muestra, experimentarán un campo eléctrico menor y su velocidad de migración será

2.48

también, por consiguiente, más baja que la de los iones del analito que permanecen dentro de la zona de muestra. Sin embargo debido a su posición relativa con respecto a la zona que esta migrando, los iones M₃ se quedarán detrás, a una distancia ΔX_c , que viene dada por la ecuación

$$\Delta X_C = L\left(\frac{\Delta \kappa_e}{\kappa_e^{\beta}}\right) \tag{80}$$

donde, $\Delta \kappa_e$, es la diferencia de conductividad calculada por la Ecuación (79), κ_e^{β} , es la conductividad del electrólito portador y, L, es la distancia a la que un ion M₃ va viajando en el electrólito, detrás de la zona de muestra. Los iones se difunden no sólo antes del comienzo del análisis, sino también, a través de la zona límite (II) que separa la zona de muestra del electrólito portador. Los valores diferentes de L, causados por la difusión de los iones M₃, explican la pendiente de la línea en la zona límite (II). En la representación de la parte inferior de la Figura, está indicado por una línea inclinada.

Los electroferogramas están representados frente al tiempo de migración. En este marco de referencia, la zona límite (I) podría registrarse primero (iones que viajan una mayor distancia durante un tiempo determinado se detectarán primero), y el pico detectado tendría una forma característica de colamiento, esto lo podemos observar en los picos de baja movilidad (5 a 7) de la Figura 23. Una explicación análoga se puede desarrollar, bajo el mismo supuesto simplemente invirtiendo los valores relativos de v^{α} y v^{β} , para explicar los picos frontales.

En la misma publicación, Hjerten discute el caso en que la velocidad de difusión es mayor que la velocidad de electromigración, $v^{B} < v_{diff}$, mostrando que la asimetría resultante puede ser mucho menos pronunciada que la vista anteriormente.

También es interesante notar, que las asimetrías producidas por el pH se pueden explicar usando un marco de referencia similar al anterior. Estas se presentan para ácidos débiles, como por ejemplo el ácido bórico, donde se observan acortamientos de los tiempos de migración, y tipos cambiantes de asimetrías para el pico del borato dependiendo del pH del electrólito.

d) Resolución de los Picos bajo Condiciones No Optimas en EC

Una deformación de un pico tiene usualmente más de una causa. Empleando una aproximación similar a la de Jorgenson⁵³, Hjerten⁵⁹ llegó al establecimiento de una ecuación, en donde se resumen todos los parámetros que afectan a la resolución bajo condiciones no óptimas. Como vimos anteriormente, bajo condiciones óptimas, la única causa de ensanchamiento de pico en EC es la difusión molecular; la existencia de causas adicionales de ensanchamiento de pico convierten un sistema EC de las condiciones óptimas a las no óptimas. Como podemos ver en la siguiente expresión dada para la Resolución (R)

$$R = \left(\frac{\Delta\mu}{\mu}\right) \left[\left(\frac{\Delta X_0^2}{12L^2}\right) + \left(\frac{2D}{\mu\theta L}\right) + \left(\frac{1}{12}\right) \left(\frac{B\kappa_e}{\lambda}\right)^2 \left(\frac{R\theta}{2T_0^2}\right)^4 + \left(\frac{A\theta}{L_t}\right) \right]^{-1/2}$$
(81)

De esta ecuación se deduce que bajo condiciones no óptimas, la resolución se incrementa con el decrecimiento de la movilidad observada, μ , anchura de la zona de muestra, ΔX_o , coeficiente de difusión, D, y conductividad del electrólito portador, κ_e . Por otra parte la resolución se deteriora con el aumento de la longitud del capilar, L_t , y de la conductividad térmica del

electrolito portador. El término, A, es una constante de proporcionalidad entre la altura de un plato teórico y el campo eléctrico.

La ecuación (81) se puede simplificar a una forma similar a la que da la resolución de la ecuación ideal que resulta de la combinación de las ecuaciones (59) y (73). El término ΔX_0 se puede minimizar reduciendo el volumen de muestra o utilizando un tratamiento por isotacoforesis del segmento de muestra, previamente a la separación. La influencia de los efectos de conductividad eléctrica y térmica se eliminan, en gran medida, igualando las conductividades equivalentes del analito con las del electrolito portador; las distorsiones térmicas también se reducen escogiendo pequeños diámetros de capilar.

2.3 INSTRUMENTACION EN EC

Una vez que hemos visto una descripción introductoria de los módulos de EC, en las siguientes secciones veremos la operación de los Sistemas EC con mas detalle.

2.3.1 Introducción de Muestra

El volumen de muestra viene determinado por el tiempo (s) que dura el procedimiento de introducción de la misma. En consecuencia, la mayoría de los operadores de EC desconocen el volumen de muestra introducido, para una determinada separación. Si se realiza correctamente la separación de muestra sobre la zona positiva, se puede incrementar la detectabilidad en uno o dos ordenes de magnitud. El efecto responsable de la preconcentración de la muestra bajo condiciones optimizadas se conoce como electroapilamiento ("*electrostacking*").

Las técnicas de introducción de muestra son :

- 1ª) Introducción Hidrodinámica de Muestra.
- 2^a) Introducción Electromigrativa de Muestra.
- 3^a) Aproximaciones Alternativas al Muestreo ("split flow injection", "sample loops injectors", "sample gating", "electric sample splitting", etc.).

Antes de discutir las técnicas de muestreo, estudiaremos que es esta característica única de EC que es el **Electroapilamiento**, que de una forma u otra se puede observar con todos los métodos de inyección de la muestra en EC.

a) Electroapilamiento

El fenómeno fue descrito en 1979 por Mikkers, Everaerts y Veheggen¹⁹. Sin conocimiento previo del fenómeno del electroapilamiento, un operador con experiencia en CL, disolverá las muestras de forma automática en el electrolito portador. En EC, los resultados serán en la mayoría de los casos (excepto para pequeños volúmenes de muestra) no muy buenos : se obtendrían electroferogramas con picos poco resueltos (anchos, redondos,...).

Los picos agudos y la mejora de la sensibilidad se pueden explicar en el marco teórico de la sección 2.2.2. De acuerdo con la ecuación (2), la velocidad electroforética y también la velocidad de migración bajo condiciones EC, aumentan en proporción directa al campo eléctrico aplicado. Observando la Figura 25, que representa el papel del Electroapilamiento en EC, apreciamos que, antes de la aplicación del voltaje de separación, los componentes de la muestra están distribuidos en un segmento relativamente ancho, lleno predominantemente, por muestra disuelta y por disolvente, (Figura 25-A). Dentro del capilar, la resistencia eléctrica de una muestra diluida es más alta que la del electrolito portador. Después de la aplicación del voltaje de separación, el campo eléctrico actuante sobre el segmento de muestra es mucho más elevado que el correspondiente al electrolito portador [V = IR (Ley de Ohm)], resultando una velocidad considerablemente más alta para los iones de la muestra que están dentro del segmento de muestra. Por tanto, los iones se mueven rápidamente, dirigiéndose hacia el limite
entre el segmento de muestra y el electrolito; de esta forma, es como los iones de la muestra de esa zona límite, comienzan su migración hacia el detector (Figura 25-B).

Una vez dentro de la zona del electrolito, los iones llevan una velocidad menor, determinada por un campo eléctrico más bajo y compartida por todos los iones de la misma identidad química (Figura 25-C).



En la mayoría de las separaciones EC, el ancho del pico del disolvente es indicativo de la longitud original del segmento de muestra. En la Figura (C) el segmento de muestra se representa moviéndose detrás de la zona de migración, mas rápida, del analito iónico. La movilidad de la zona del disolvente está determinada usualmente por el flujo electroosmótico.

Bajo condiciones ideales, la zona de componentes iónicos de muestra durante su migración a través del capilar, retiene su carácter estrecho rindiendo altas eficacias de separación. Sin embargo, también es posible que haya zonas de analito que sean deformadas y / o ensanchadas durante su migración (condiciones no ideales).

El tratamiento cuantitativo de la sensibilidad ganada por electroapilamiento, implica algo más que la representación presentada en la Figura 25. El campo es un factor relevante. El cociente entre los respectivos campos eléctricos que atraviesan la zona de muestra (E_i) y la zona de electrolito (E_o) , viene dada por la ecuación⁶²

$$\frac{E_1}{E_0} = \frac{\gamma}{[\gamma x + (L_t - x)]}$$
(82)

donde, L_t (cm), es la longitud del capilar, x, es el cociente entre la longitud de la zona de muestra y L_t y, γ , es la razón de conductividades del electrolito con la zona de muestra. La complejidad del fenómeno de electroapilamiento proviene del hecho de que E_1/E_0 no permanece constante; cambia constantemente, debido a los cambios de concentraciones iónicas causados por electromigración y electroósmosis.

b) Introducción de Muestra por una Presión Diferencial

Es el método mas usado en EC, y es el que vamos a tratar, por ser el empleado en este trabajo. Hay tres formas de obtener presión diferencial, las cuales se esquematizan en la Figura 26.



El Método hidrodinámico, sifonante o método hidrostático, (Figura 26-A): Para la introducción de la muestra se enrasa un vial a un nivel definido (Δh), sobre el nivel del otro vaso con electrolito que está en el otro extremo del capilar. Como el capilar contiene una columna ininterrumpida de electrolito líquido, el volumen de electrolito líquido introducido en la unidad de tiempo, Q_v (cm³/s), viene dado por la Ley de Poiseuille

$$Q_{\nu} = \frac{dV_a}{dt_i} = \frac{\pi r^4}{8 \eta L_t} \Delta P$$
(83)

donde, V_a , es el volumen de electrolito introducido, t_i , es el tiempo que el contenedor de la muestra está elevado una altura Δh , r, es el radio interno del capilar, η , que es la viscosidad del agua (0,01 poise a 20 °C), L_t , es la longitud total del capilar, ΔP , es la presión hidrostática derivada del peso de líquido asociado a la altura de columna Δh ($\Delta P = \rho g \Delta h$, ρ , es la densidad del electrolito, y, g, es la aceleración de la gravedad), lo cual conduce a una velocidad de muestreo, $v_{(\Delta h)}$ (cm/s), que viene dada por la ecuación.

$$v_{(\Delta h)} = \frac{Q_v}{S} = \frac{\rho g r^2 \Delta h}{8 \eta L_t}$$
(84)

El volumen de muestra introducido viene determinado por el intervalo de tiempo que el contenedor de la muestra esta elevado una altura Δh . La ecuación (84) es una relación clásica que describe el flujo de un fluido a través de un tubo y está reproducida en la misma forma que lo hicieron Rose y Jorgenson⁶³ en su artículo de 1988. Estos mismos autores discuten otra relación estandar que permite la predicción de la cantidad, en moles, introducida por una presión hidrostática conocida dentro de un capilar con una geometría definida. Dado que [nº de moles de muestra introducida = volumen de muestra x concentración de muestra], podemos poner

$$\frac{dn}{dt} = \frac{dV_a}{dt}C$$
(85)

siendo, C, la concentración molar, y que de acuerdo con (83) se transforma en

$$\frac{dn}{dt} = \left[\frac{\rho g \pi r^4 \Delta h}{8 \eta L_t}\right] C \tag{86}$$

Integrando a lo largo del tiempo de introducción de la muestra, t_i (s), resulta

$$n = \left[\frac{\rho g \pi r^4 \Delta h t_i}{8 \eta L_t}\right] C \tag{87}$$

Antes de discutir los otros métodos de presión diferencial, debemos hacer una salvedad sobre otro uso importante de la ecuación (84). Durante una separación EC los niveles de líquido dentro de los vasos de electrolito deberán estar a un mismo nivel. Si los dos niveles no están debidamente ajustados, el resultado puede ser un flujo hidrodinámico que afecte a la eficacia de la separación, y también a la reproducibilidad de los tiempos de migración, ya que como vimos en el apartado anterior la alta eficacia de las separaciones EC se basa en el perfil plano del flujo electroosmótico.

Si la contribución de flujo hidrodinámico llega a ser significativa, el perfil del flujo será marcadamente parabólico, contribuyendo al ensanchamiento de las zonas separadas de analito. El uso combinado de las ecuaciones (2) y (84) hace posible comparar velocidades relativas de flujo electroosmótico e hidrodinámico en las mismas unidades (cm / s). Otro cálculo fácil permite evaluar la máxima diferencia de altura que puede tolerarse entre dos niveles de electrolito.

Las otras dos vías de generación de flujo hidrodinámico de muestra dentro del capilar son, por *presurización del vial de muestra*, (Figura 26-B), o por *aplicación de vacío al vaso del electrolito del extremo final del capilar*, (Figura 26-C). El vial de muestra al que se aplica directamente Δp , debe estar sellado herméticamente. La velocidad de muestreo $v_{(\Delta p)}$, viene expresada por la ecuación

$$v_{(\Delta p)} = \frac{\pi \cdot \Delta p \cdot r^2}{8 \cdot \eta \cdot L_t}$$
(88)

donde, Δp , es la presión diferencial aplicada.

En la mayoría de los instrumentos comerciales de EC, la presión diferencial no sólo se aplica al muestreo, sino también para purgar los capilares y llenarlos con una nueva porción de electrolito portador. En EC es posible interrumpir la separación después de haber detectado los picos de interés; como el purgado se puede dar a velocidades de flujo que superan en gran medida a la de migración electroforética y electroosmótica, se puede obtener un considerable ahorro de tiempo de análisis. La ecuación (83) se puede emplear para el cálculo de velocidades de flujo de purga y volúmenes de lavado en los instrumentos EC, equipados con mecanismo de purga a vacío.

Si no hay electroapilamiento, (como por ejemplo, en el caso en que la muestra se disuelve primero en el electrolito portador), la longitud de los segmentos de muestra introducidos, está severamente restringida⁶⁴. Una gran mayoría de trabajos en EC utilizan tiempos de inyección de 30 s con $\Delta h = 10$ cm, como nuestro caso. En un capilar de 60 cm / 75 µm esto genera zonas de muestra de aproximadamente 5 mm de longitud (ecuación (82)). Sin embargo, aún con longitudes de segmentos de muestra que exceden mucho de los valores máximos admisibles para condiciones de no electroapilamiento, las eficacias de la separación están dentro del máximo rango teórico de entre 100.000 hasta 500.000 platos teóricos. El electroapilamiento se emplea ampliamente para posibilitar volúmenes de muestreo, que de otra manera no serían posibles debido a las restricciones impuestas por las eficacias de separación esperadas.

El único pico que no se estrecha por electroapilamiento es el perteneciente al disolvente de muestra (ej., el pico del agua). Los picos de disolvente no se registran con frecuencia bajo condiciones de EC Coelectroosmótica; estos picos marcan la movilidad electroosmótica y se encuentran migrando bastante detrás de los picos pertenecientes a los analitos de interés. En EC Coelectroosmótica, la separación se interrumpe normalmente antes de que el pico del disolvente alcance el detector. Las zonas que contienen el disolvente son subsecuentemente eliminadas por el purgamiento a vacío en el procedimiento de reemplazo del electrolito gastado por uno nuevo.

La longitud efectiva de la zona de muestra está determinada, no sólo por el tiempo de muestreo (introducción), sino también por la difusión y flujo hidrodinámico inadvertido como consecuencia del desajuste de los niveles de electrolito entre las dos partes del capilar⁶⁶. Inmediatamente después de que se haya establecido la concentración límite entre la zona de muestra y la columna de electrolito dentro del capilar, la muestra comienza a difundirse dentro del capilar. La introducción de la muestra por difusión puede tener proporciones significativas aún en ausencia de flujo hidrodinámico no detectado. Los capilares largos reducen este problema, ya que el flujo hidrodinámico decrece linealmente con el aumento de la longitud del capilar. Otro factor que hace que los problemas de difusión sean menos importantes, es la longitud típica de los segmentos de muestra (entre 5 y 10 mm), que posiblilitan un electroapilamiento de la zona del analito.

c) Preconcentración de Muestra en EC

Recientes descubrimientos han revisado los conceptos preestablecidos que consideraban la sensibilidad de EC obsoleta. Hasta alrededor de 1990, la EC se consideraba inherentemente menos sensitiva que la HPLC, mientras que le fue reconocida la sensibilidad absoluta (μ g o μ moles inyectados), la sensibilidad de concentración (mol / litro, ppm, ppb) le fue juzgada pobre. Solo para compuestos fluorescentes (fluorescencia inducida por láser) o activos eléctricamente (detección amperométrica) se creía que podía llevarse a cabo con una sensibilidad significativa.

En la actualidad la sensibilidad de EC se puede aumentar considerablemente. Mejoras de la sensibilidad por electroapilamiento ya fueron estudiadas en uno de los primeros trabajos de CE¹⁹, Burgi y Chien⁶¹ citan siete artículos entre 1964 y 1990 sobre el electroapilamiento, sin embargo, éste es sólo uno de los distintos métodos de concentración empleados por los usuarios de EC, y que son :

- 1°) Electroapilamiento.
- 2°) Isotacoforesis (" off line " u " on line ")^{4,26,68-72}
- 3°) Capilares de Concentración (capilares que incorporan un segmento de paquete retentivo)^{73,74}.

En la introducción de la muestra por electroapilamiento, como vimos anteriormente, los componentes de la muestra pueden ser " comprimidos " desde una zona relativamente ancha de segmento de muestra hacia una zona verdaderamente estrecha, antes de que de comienzo la separación (Figura 25). Las separaciones EC realizadas bajo condiciones óptimas generan zonas de ensanchamiento mucho menores que la HPLC convencional. Es interesante notar que, en la mayoría de los casos la eficacia de la separación mejorada, aumenta la

2.54

detección. Bajo condiciones óptimas, la eficacia de la separación en EC es aproximadamente de 10⁶ platos teóricos aún en aplicaciones rutinarias. Asumiendo que los picos sin electroapilamiento exhiben eficacias de separación de sólo 10³ platos teóricos y que estos picos tienen formas gausianas, se puede mostrar⁶⁶ que la eficacia de la separación mejorada conduce a una altura de pico de aproximadamente 30 veces la anterior :

(altura de pico con electroapilamiento / altura de pico sin electroapilamiento) = $(10^6 / 10^3)^{1/2} = 31,6$

La elevación de la altura de pico así calculada, se aplica al muestreo hidrodinámico. Para las introducciones de muestra electromigrativa la mejora de la sensibilidad está acompañada por un mantenimiento de un alto campo eléctrico relativo entre las zonas de muestra y el electrolito portador, de acuerdo con la ecuación (82)⁶⁷.

2.3.2 Selección y Manipulación de Capilares

En el apartado anterior, discutimos las propiedades químicas de los capilares y los orígenes del flujo electroosmótico, así como que, por causa de el calentamiento Joule, el diámetro de los capilares debía de ser estrecho.

Ahora comentaremos brevemente la geometría de los capilares. Los capilares cilíndricos ya se usaron en las primeras aplicaciones CE¹⁹, y los capilares cilíndricos de sílice fundida envueltos en poliimida, se emplean actualmente por la mayoría de los usuarios de EC. Ahora bien, también se emplean capilares con geometría cuadrada y rectangular, que disipan mejor el calor y por tanto admiten campos eléctricos más intensos a la vez que acortan en 10 veces el tiempo de análisis⁷⁵ y mejoran la sensibilidad⁷⁶, respecto de los anteriores de geometría cilíndrica. Con el fin de incrementar la sensibilidad en los capilares cilíndricos, se puede extender la longitud del camino óptico, haciendo que una cierta porción de la longitud del capilar cilíndrico sea una parte del camino óptico⁷⁷ (tal y como se hace en este trabajo).

Para acondicionar una parte del capilar como camino óptico es necesario quitar una parte del envoltorio de poliimida, esto de puede hacer por tres métodos: a) Térmico, b) Químico y c) Mecánico.

El método empleado en este trabajo es el térmico, donde para quitar el envoltorio le aplicamos una fuente de calor (ej. brasa de un cigarrillo, llama, etc.) durante 10 s; una vez que se ha descompuesto la funda de poliimida, se inspecciona el capilar con lupa y si se observan residuos negros pegados a la superficie de vidrio se eliminan con un paño empapado en metanol. De esta forma se obtiene una ventana de 5 mm aproximadamente. Se pueden emplear métodos más sofisticados para obtener estos resultados⁷⁸.

2.3.3 Detección en EC

En un primer vistazo, la detección en EC parece tener una gran cantidad de problemas, con volúmenes de muestra que no exceden de 100 nanolitros y caminos ópticos extremadamente cortos (del orden de 100µm o menores). Ahora bien, debido a la casi completa deficiencia de difusión longitudinal en EC optimizada, las zonas de analito llegan al detector esencialmente en el mismo volumen que al comienzo de la separación. Además, debido al electroapilamiento, un volumen inicial puede ser del orden de diez a cien veces más pequeño que el volumen original de muestra, y con la introducción de detectores de células de camino óptico extendido, se puede poner a la EC en ventaja con respecto a otras técnicas de detección.

Basándonos en estos factores vamos a enunciar las técnicas de detección en EC :

1^a) Detección óptica a Longitudes de Onda del UV y Visible.

- 2^a) Detección UV Indirecta.
- 3^a) Detección de Fluorescencia Directa.
- 4ª) Detección de Fluorescencia Indirecta.

5ª) Detección Conductimétrica.

6^a) Detección Amperométrica.

7^a) Detección por Espectrometría de Masas.

Como el aparato empleado en nuestro trabajo emplea el método de Detección UV Indirecta, será esta técnica la que veremos con detalle.

La detección indirecta mide la disminución de un nivel relativamente alto de señal de fondo, en un medio de separación, causado por zonas de analito que tienen sólo una respuesta despreciable, o que no la tienen. La detección UV indirecta emplea, para el medio de separación, compuestos que tienen un nivel de absorción relativamente alto de la luz UV. Bajo las condiciones mas favorables, la concentración de la sustancia absorbente UV en el medio de separación (ej. eluente en HPLC o electrolito portador en EC) y la longitud de onda de la detección están escogidos para maximizar la absorvancia UV y minimizar el ruido. La absorvancia puede incrementarse simplemente aumentando la concentración del compuesto que provee el fondo UV. Sin embargo a concentraciones demasiado altas de este compuesto, la señal del ruido aumenta sobrepasando un nivel aceptable. En casos extremos, el cambio de la señal del detector no es una función lineal de la concentración de la sustancia proveedora del fondo, o incluso puede llegar a ser independiente de tal concentración.

En ausencia de analito, como se ilustra en la (Figura 27-A), la absorvancia del medio de separación es grande, ya que sólo una pequeña porción de la luz proveniente de la fuente penetra a través del fluido, y llega al elemento fotodiodico de detección. Si una zona de muestra pasa a través de la zona del detector, el nivel original de absorvancia alto decrece, debido a la dilución del compuesto, que absorbe mucho la luz UV, y a las moléculas más translúcidas del analito, (Figura 27-B). La gran cantidad de luz que, en el caso anterior pasaba a través del medio que fluye, ahora contiene las moléculas de muestra, y llega al detector. La transmisión de luz a través del fluido es de un alto nivel. Después de que la zona de muestra pase a la parte izquierda del detector, el camino de la luz es menos translúcido otra vez, y la absorvancia del fondo ha vuelto a su nivel original, que era el que tenía antes de que pasara la zona de muestra a través de la célula del detector, (Figura 27-C). Como antes del paso de la zona de muestra, sólo una pequeña cantidad de luz incidente, atraviesa todo el camino entre la fuente de luz y el elemento sensor.

La detección UV indirecta se aplica en EC desde hace algún tiempo^{80,81} y vamos a exponerla aquí con un poco mas de detalle. En un diseño adecuado de detección UV indirecta en EC, el analito no absorbente reemplaza al similión del electrolito que provee el fondo UV sobre una base de equivalente por equivalente. El componente que absorbe en UV empieza a ser remplazado por el analito dentro de la zona de muestra disuelta. El operador, en EC, tiene la opción de, escogiendo condiciones coelectroosmóticas, permitir que la zona del disolvente de la muestra migre siempre lejos de las zonas de los analitos de interés. En EC Coelectroosmótica la zona del disolvente de la muestra migra a la velocidad del flujo electroosmótico, mientras que la velocidad de migración de los analitos viene dada por el vector suma de las respectivas movilidades electroforética y electroosmótica. El cambio de equivalente por equivalente en EC, viene forzado por una corriente constante y opuesta de contraiones y por la condición de electroneutralidad. Después de la aplicación de un voltaje de separación a través del capilar, que está lleno con electrolito portador y que contiene un volumen de muestra, los cationes y los aniones son obligados a migrar en direcciones opuestas. Aún durante la migración resultante, la concentración de contraión permanece constante, y predeterminada por la concentración original de electrolito. Los contraiones de la muestra se eliminan de los alrededores del capilar por electroapilamiento y no juegan ningún papel durante la separación. Una vez que la migración opuesta comienza después de la aplicación del voltaje de separación, cada segmento de electrolito contiene un número de contraiones constante. Por esta causa la suma de equivalentes de similiones e iones analito, también tiene que permanecer constante (electroneutralidad).

El hueco creado por un ion del analito que se mueve hacia delante tiene que llenarse por un similión del electrolito del mismo segmento, dentro del que el ion del analito se está moviendo. La representación esquemática de este proceso viene dada en la Figura 28, (y el mismo no debe comenzar con la muestra todavía disuelta en su disolvente original (ej. el agua)).



Detección UV- Indirecta en un medio separador. L, fuente de luz; circulos grandes, compuesto proveedor del fondo; cuadrados, analito; f, fotodiodo; I_0 , intensidad de la luz incidente; I, intensidad de la luz después de atravesar el medio; T, transmitancia; A, absorvancia.



Figura 28

Movimiento de la zona de los iones del analito no cromóforo a través del electrolito portador que contiene similiones absorventes UV. Las cruces representan al disolvente de la muestra. Los cuadrados y los círculos son respectivamente los componentes del analito y

La primera etapa representa la situación después del electroapilamiento; todos los constituyentes de la muestra, han sido llevados desde la zona de alto campo eléctrico hacia dentro de la zona de bajo campo eléctrico, más allá del límite de concentración, hacia el interior del electrolito portador. Solamente se puede discernir en esta etapa el movimiento del analito muy móvil (cuadrados). Durante la separación, la zona del disolvente de la muestra (cruces), no solamente tiene moléculas del disolvente no iónicas, sino que también contiene una pequeña porción de similiones del electrolito que se mueven allí para compensar a los iones del analito, que se transfieren al interior del electrolito durante el electroapilamiento. En suma, el flujo constante de contraiones en EC, cumple una función similar a la capacidad de intercambio iónico constante en cromatografía iónica; éste mantiene constante un número de cargas opuestas por segmento de volumen de electrolito portador, dentro del capilar de sílice fundida. La distancia entre el analito y las zonas de disolvente va incrementándose gradualmente con cada una de las etapas de la Figura 28. Debemos destacar, sin embargo, que sólo con flujo electroosmótico cero, podemos esperar que la zona de disolvente permanezca en su posición actual. Bajo condiciones coelectroosmóticas el movimiento electroforético, inherente de la zona del analito, se incrementa por la velocidad de electroósmosis; en este caso, la zona de disolvente podrá moverse también, pero la distancia relativa entre las zonas de muestra y disolvente permanecerá igual que en ausencia de electroosmósis.

Los principios básicos, empleados para predecir y discutir la realización de las técnicas indirectas de detección, fueron introducidos por Yeung⁸². La concentración mínima detectable, c_{lim} , puede expresarse como una función de la concentración de las especies que proveen el fondo UV, c_m , la relación de transferencia, RT, y la reserva dinámica, RD, según la ecuación.

$$c_{\lim} = \frac{c_m}{(RT) \cdot (RD)}$$
(89)

La relación de transferencia es el número de equivalentes de los iones que proveen el fondo UV, y que van siendo desplazados por cada equivalente de iones del analito. Por ejemplo, en el electrolito portador Cromato: RT = 1 para sulfato (misma carga que cromato) y RT = 0,5 para cloruro (mitad de carga que cromato). La relación de transferencia predice que, a igualdad de factores, la sensibilidad molar para iones divalentes, viene a ser dos veces la de iones monovalentes. Además, también podemos sacar la conclusión de que, a igualdad de otros factores, la sensibilidad de detección en electrolitos con similiones monovalentes, puede esperarse que sea dos veces más alta que en electrolitos con similiones divalentes. De acuerdo con la teoría⁸³ el término RT de la ecuación (89), es el mismo para todos los iones del analito, si y sólo si la muestra se introduce por electromigración, y en este caso se puede hablar de la " calibración universal " (calibración usando un solo estandar para cuantificar varios compuestos diferentes) para todos los iones de la muestra. Si la muestra se introduce de forma hidrostática, la calibración en detección UV indirecta no esta afectada, salvo porque es necesario calibrar con un estandar para cada analito, con el fin de llevar a cabo una mayor precisión y eliminar la tendencia a valores altos de RT para iones de baja movilidad.

La *reserva dinámica* es la razón entre la intensidad de la señal y el ruido de la señal del fondo. Para detección fotométrica indirecta, la reserva dinámica se puede definir por la ecuación³⁹

$$RD = \frac{(\varepsilon_m L c_m)}{AR}$$
(90)

donde, ε_m , es la absortividad molar (unidades de absorvancia / mol.cm), L, es el camino óptico (cm), c_m , es la concentración del compuesto que genera el fondo UV en el electrolito portador (M) y, AR, es la absorvancia del ruido (unidades de absorvancia). La ecuación (90) describe la reserva dinámica, como una combinación de la calidad del diseño del detector y una elección adecuada del compuesto que provee el fondo UV. Se intenta optimizar la reserva dinámica eligiendo un compuesto conveniente (la movilidad electroforética tiene que ser optimizada con la de los analitos), con un valor máximo de absortividad molar y preparado a la mayor concentración posible (el electrolito tiene que ser de baja conductividad para minimizar el calentamiento Joule), para su empleo en el electrolito. La opciones están limitadas por el tope impuesto por las características del detector fotométrico. El ruido de fondo podrá ser sólo independiente del valor de la absorvancia del fondo dentro de un rango determinado de c_m . El valor máximo del producto ($\varepsilon_m L c_m$) a que el ruido es aún constante y sin cambios, comparado con los valores bajos de absorvancia del fondo, se puede usar para evaluar la idoneidad de los detectores para detección fotométrica.

Como en todos los detectores, el camino óptico y el nivel de ruido definen el límite de detección del sistema óptico. El límite de detección viene expresado, como aquel nivel de señal que es doble de la señal del ruido. El *rango dinámico* lineal de un detector puede definirse como su rango lineal de respuesta desde el límite de detección hasta el punto donde la respuesta ta comienza a ser una meseta ("*plateau*"), debido a la saturación del detector o al exceso de masa de soluto en el sistema. Este hecho se pone de manifiesto, en EC, por la aparición de una

perturbación en el pico o de picos con frontal ("*fronting* "). El rango dinámico en EC es único, debido al hecho de que la sobrecarga de masa del sistema, ocurre antes de que la respuesta por absorvancia comience a saturarse.

Si se sustituye el término reserva dinámica (RD) de la ecuación (89) por RD en la ecuación (90) y si asumimos que RT = 1, obtenemos la ecuación

$$c_{\rm lim} = \frac{AR}{\varepsilon_m L} \tag{91}$$

En la relación de la ecuación anterior, la concentración mínima detectable se puede calcular independientemente de la concentración del componente del electrolito que provee el fon do. Además, en contraste con otras técnicas indirectas, no es necesario usar concentraciones muy bajas de iones del fondo, lo que da como resultado un rango dinámico amplio por absorvancia indirecta. Nótese que las relaciones, discutidas sólo emplean la versión lineal estandar de la Ley de Beer⁵⁰. Los resultados obtenidos así, no son transferibles entre las diferentes geometrías de células ópticas.

El mejor de los detectores UV que se puede obtener de forma corriente, lleva a cabo niveles de ruido de alrededor de 10⁻⁵ unidades de absorvancia, con un compuesto de fondo que tenga $\varepsilon_m = 10^3$ (anión cromato⁷⁹) y con un capilar de diámetro interno de 75µm, podemos calcular una concentración límite de detección de : $c_{lim} = 10^{-5}$ ($10^3 \times 75 \times 10^{-4}$) = 1,33 x 10^{-6} M.

Este cálculo aproximado, está subordinado a varios supuestos que no es necesario tener en cuenta en todas las instancias, pero como podemos ver en la Figura 29, se predice más bien correctamente el orden de magnitud de sensibilidad, llevada a cabo por detección indirecta bajo condiciones optimizadas. Así, encontramos que los valores para sulfato y carbonato están de acuerdo con los calculados teóricamente.

Para los aniones monovalentes la razón de transferencia RT = 0.5 y de acuerdo con las ecuaciones (89) y (91) la concentración mínima teórica es de 2,66 μ M.

Los valores observados están en el rango entre 4 a 7 μ M, que por consiguiente difieren de los teóricos, lo que nos indica que éstos son válidos para un cálculo estimado dando meramente un orden de magnitud; esto sugiere el hecho de que hay factores adicionales que influyen en los límites de detección, tales como el electroapilamiento, el grado de incremento de la asimetría de pico con tiempos de migración grandes y la variación de las velocidades de migración de zonas del analito a través del detector.

Por último destacar que las ecuaciones (89) y (91) son válidas sólo para casos en los que los analitos no absorven de una forma medible la luz, a la longitud de onda seleccionada para la detección UV indirecta. Si esto no fuese así, decrece la reserva dinámica y nos encontramos con una detectabilidad peor que la esperada; además, se vería afectado el rango de linealidad de la calibración.

La utilidad del cromato para detección fotométrica indirecta en EC, se puede observar viendo la Figura 30. El anión tiene un amplio espectro de absorción a través del rango entero del UV. El cromato, en comparación con otros aniones, puede ofrecer una longitud de onda conveniente para muchos iones, incluyendo aquellos muy absorbentes. Además, la movilidad del cromato iguala a la movilidad de un gran número de aniones de bajo peso molecular, lo que proporciona un bajo grado de asimetría de pico.



Figura 29

Electroferograma de ocho aniones inorgánicos obtenido con detección UV indirecta a 254 nm. El electrolito portador es 5 mM de Cromato potásico, 0,5 mM de modificador de flujo electroosmótico (Waters OFM Anion-BT), añadido para invertir la dirección del mismo, pH = 8,1, capilar de sílice fundida de 75 μ m de diámetro interno y 52 cm x 60 cm, voltaje de - 20 KV (negativo), inyección hidrostática durante 30 s a 10 cm de altura sobre el nivel normal. Identificación de los picos y los límites de detección (tres veces el ruido en μ M), son: 1) *Bromuro* (2 ppm y 4,8 μ M), 2) *Cloruro* (2 ppm y 4,2 μ M), 3) *Sulfato* (2 ppm y 1,8 μ M), 4) *Nitrito* (2 ppm y 7,2 μ M), 5) *Nitrato* (2 ppm y 5,6 μ M), 6) *Fluoruro* (1 ppm y 5,2 μ M), 7) *Fosfato* (4 ppm y 4,0 μ M), 8) *Carbonato* (2 ppm y

En resumen, podemos decir que un método de detección UV indirecta, diseñado óptimamente, posibilita una mayor sensibilidad de análisis de un gran número de iones de bajo peso molecular. La sensibilidad de detección se optimiza escogiendo iones de fondo con grandes valores de absortividad molar. El rango dinámico y la linealidad de la calibración, se ven incrementados con el número de los iones que proveen el fondo que absorben UV; el límite a este incremento, viene impuesto por el aumento serio de los problemas de calentamiento Joule a fuerzas iónicas altas y por la linealidad del detector.



yectado un volumen de 100 μ l tomado de una disolución acuosa de 1 mM de cada uno. El espectro se ha obtenido entre 200 y 400 nm. El rango de sensibilidad está entre 0 y 1,1 unidades de absorvancia⁷⁰.

2.3.4 Métodos Cualitativos y Cuantitativos en EC

Las técnicas de análisis cualitativo y cuantitativo en EC implican la interpretación de los datos en dos vertientes: por un lado la información cualitativa, que corresponde al el tiempo de migración, contado desde el origen de coordenadas sobre el eje de tiempos (eje X); y por otro la información cuantitativa, es decir, altura y área de pico, que vienen representadas por una forma de pico gaussiano, perpendicular al eje de tiempos y dadas en función del voltaje de salida del detector. La razón de éstos métodos es la identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla, que se lleva a cabo mediante el emparejamiento de los tiempos de migración con los de unos estándares químicos y posterior comparación de la respuesta relativa del detector (p.e., área de pico) de un pico desconocido, con la de los estándares anteriores.

a) Métodos Cualitativos en EC

Aún cuando, en algún caso particular, los tiempos de migración sean parejos, todavía es significativa la probabilidad de que el tiempo de migración para la sustancia desconocida esté dentro del mismo intervalo de tiempo con el que aparecen otras especies. Para aumentar la fiabilidad estadística de la identificación de una sustancia desconocida son necesarios varios análisis bajo condiciones diferentes, es decir, temperatura, composición de la disolución reguladora y pH. Si la identificación de substancias, en la muestra, se limita solamente a unas pocas

2.62

especies (por ejemplo en un número menor de 10) entonces aumenta la fiabilidad de la identificación de cada uno de los componentes de la misma⁸⁴

Precisión y Exactitud del Análisis Cualitativo

Los elementos más importantes en un análisis tanto cualitativo como cuantitativo, son la precisión y la exactitud de los aparatos de medida. Los términos precisión y exactitud son una medida respectivamente, de la aleatoriedad y de los errores sistemáticos del sistema. Los errores aleatorios en EC son el resultado de imprecisiones en el sistema de inyección, regulación de temperatura del sistema y los debidos al ruido del detector, etc., mientras que los errores sistemáticos son el resultado de una calibración e integración del sistema inexactos.

La optimización de la reproducibilidad puede ser perfecta para un análisis de la forma del pico en un amplio rango de concentraciones de muestra. Un valor típico para la eficiencia de un pico en EC para moléculas pequeñas (masa molecular < 2000) es de 250000 platos teóricos / m. Esto corresponde a una anchura de pico en la base de 0.085 minutos para un pico con un tiempo de migración de 10 minutos. Si visualizamos el pico como una distribución gaussiana de la concentración de soluto con respecto al tiempo, en donde 20 representa a un intervalo alrededor del valor medio de dicha distribución, coincidente con el tiempo de migración y donde el 66% del soluto debería eluirse bajo condiciones ideales⁸⁵, entonces, asumiendo que la anchura en la base es de 4 σ , el valor de 2 σ es igual a 0.043 minutos, que representa un valor relativo del 0,4% del tiempo de migración anterior del pico. Si queremos utilizar éste valor como intervalo de tiempo de migración (es decir, que si el tiempo de migración del pico cae dentro del intervalo ($10,00 \pm 0,04$ min.) se identificaría el mismo), entonces un instrumento preciso debería ser capaz de colocar el tiempo de elución del soluto dentro del 95% de dicho intervalo de tiempo. O sea, que si un instrumento da una reproducibilidad de las medidas de tiempo de migración en términos de la desviación estándar relativa [% DER = (desviación estándar (σ) del tiempo de migración) / (promedio de tiempo de migración) x 100], menor del 0,1%, entonces por definición estadística, (es decir, 4 σ , representa el 95% del área bajo una distribución gaussiana de probabilidad), se ajustaría a éste criterio. Empleando éste razonamiento, la instrumentación en EC (integrador o sistema de datos incluido), debería de dar una medida cualitativa menor del 0,1% de DER.

El flujo electroosmótico del capilar es un factor predominante que afecta a la variabilidad de los tiempos de migración^{86,87}. Si normalizamos la variación del flujo electroosmótico con un estándar interno y calculamos una movilidad electroforética, entonces la precisión analítica mejora en algún orden de magnitud.

Salida de Datos

La salida de datos analíticos en EC, emplea el mismo formato que es común a HPLC y CG. Es decir interesa que aparezca la información referente a los tiempos de migración, o de retención, de las especies presentes. Sin embargo hay que hacer una distinción concerniente a tiempo de retención y tiempo de migración, estrictamente hablando. El tiempo de migración describe mejor la posición en el dominio de tiempos para los solutos en electroforesis en " disolución libre ", y tiempo de retención es una descripción mejor del tiempo de separación en cromatografia electroforética micelar (MECC). Como la reproducibilidad de los tiempos de migración, o tiempos de retención en el último caso, está enormemente influenciada por las variaciones de flujo electroosmótico, una expresión más precisa de los datos cualitativos viene dada respectivamente, en términos de la movilidad electroforética o tiempo de retención relativo. En orden a que uno u otro de los métodos sea útil, la muestra se debe mezclar o coinyectar con un marcador "neutro", que dé una respuesta que no venga afectada por el campo eléctrico o el fraccionamiento cromatográfico. Para la electroforesis en " disolución libre ", de la expresión de la movilidad dada por la ecuación (2), se obtiene la expresión siguiente

$$\mu_{obs} = \frac{L_d L_t}{\Psi} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_n} \right) \quad (\,\mathrm{cm}^2/\mathrm{V.s}\,) \tag{92}$$

donde, L_d (cm) es la longitud del capilar, L_t (cm) es la longitud total del capilar, $\Psi(V)$ es el potencial de separación, t_m (s) es el tiempo de migración del analito y t_n (s) es el tiempo de migración del marcador neutro, en donde se asume que la dirección de la migración electroforética se opone a la del flujo electroosmótico. Esta expresión se puede ampliar para incluir la movilidad de un estándar interno, bajo condiciones en las que el flujo electroosmótico es pequeño o no existe. En éste caso se sustituye t_n (s) por t_s (s) y μ_s se añade al término principal de la ecuación anterior⁸⁷. Para MECC, el tiempo de retención relativo se puede expresar como la relación entre el tiempo de retención del soluto t_m , y el del estándar interno t_s , (t_m / t_s).

b) Métodos Cuantitativos

2.64

La tarea de la determinación cualitativa y cuantitativa requiere la calibración del instrumento con una serie de estándares de concentración conocida. La calibración requiere la preparación de los estándares en un disolvente y disolución reguladora compatibles con el método de separación, y además su concentración debe ser exactamente medida. El sistema electroforético debe estar suficientemente estabilizado para permitir la reproducibilidad de los análisis. Primeramente se requiere que la superficie interior del capilar, la concentración de la disolución reguladora y el pH estén en un estado de equilibrio para permitir una velocidad del flujo electroosmótico consistente. Una corriente eléctrica constante es un buen indicador del equilibrio. Después de que se haya realizado la calibración con los estándares y se hayan obtenido los datos de los tiempos de migración y las áreas de pico, entonces podemos determinar los intervalos de tiempo de migración y los factores de respuesta. Esto se lleva a cabo con un ordenador y el "*software* " adecuado.

La calibración del tiempo de migración se realiza estableciendo un intervalo de tiempo en donde se espera detectar el pico calibrado. Esto se lleva a cabo tomando un incremento de tiempo antes y después del tiempo al que aparece el vértice del pico. El incremento se puede basar en un porcentaje del tiempo de migración del pico, o en una cantidad absoluta de tiempo. Si un pico detectado en un análisis posterior, cae dentro del intervalo definido por la calibración, entonces el pico se identifica como del mismo elemento químico (o la misma sustancia molecular) que el estándar, y si cae fuera se considera como desconocido.

El desplazamiento del tiempo de retención (migración) es un fenómeno característico de todos los sistemas de separación, y no sólo de EC. Una forma de compensar este fenómeno, es el empleo de componentes de referencia o de estándares, que se definen como una o más sustancias que están siempre presentes en la muestra que va a ser analizada. El objeto de su presencia es asegurar un ajuste proporcional de los tiempos de migración de todos los componentes de la separación. Por ejemplo, si el pico del componente de referencia se desplaza desde el centro del intervalo de calibración aproximadamente un 0,5%, entonces el algoritmo de identificación del pico del " *software* " varía proporcionalmente el intervalo de tiempo para todos los picos que no son de referencia. Como la identificación del pico de referencia es crucial, el intervalo para el reconocimiento de dicho pico es generalmente un 50% mayor que el de los picos que no son de referencia. La necesidad de compensar el desplazamiento del tiempo de migración con el uso de un pico de referencia, es esencial para la realización de un método cuantitativo y se debería usar siempre (ver Figura 31).



La calibración de la respuesta de un pico es el proceso de determinación del cociente de respuesta del área o altura del pico, con respecto a la masa de muestra inyectada, o a su concentración para un volumen inyectado. Esta cantidad se define como *factor de respuesta FR*

$$FR = \frac{Cantidad}{Area \, \delta \, Altura} \tag{93}$$

El FR representa la pendiente de la respuesta, presuntamente lineal, del sistema de detección. En el caso de una respuesta no lineal, representa la pendiente con respecto a un punto dado de la curva de respuesta resultante.

Se emplean cuatro métodos para la determinación cuantitativa de un componente en una muestra, basados en el área o en la altura de pico.

1°) El método de porcentaje de normalización, requiere que todos los componentes que resulten de una separación dada sean calibrados, y sus factores de respuesta generados. Este método sólo tiene significación cuando todos los componentes de una muestra estén representados en el sistema de calibración. Si una sustancia no identificada aparece como resultado de la separación, entonces los datos obtenidos tienen poco valor.

Con este método se emplea la fórmula siguiente para el cálculo del porcentaje de normalización de un componente," *i* ".

$$\%Norm = \frac{Area_i \times FR_i \times 100}{\sum\limits_{i=1,n} (Area_i \times FR_i)}$$
(94)

Este método se emplea para el análisis de mezclas bien caracterizadas en las que una parte de los componentes están ya calibrados y se pueden analizar.

2°) El método del estándar externo, requiere la calibración de sólo los constituyentes de la muestra de interés, se emplea cuando sólo es interesante la determinación de algunos de los componentes de la muestra. La fórmula siguiente se emplea para los cálculos del método del estándar externo.

$$Cantidad = Area_i \times FR_i \tag{95}$$

Este método requiere, sin embargo, una medida precisa del volumen de inyección de la muestra.

3°) El método del estándar interno, es parecido al método del estándar externo, en que sólo los constituyentes de interés de la muestra necesitan ser calibrados; sin embargo, en este caso, el volumen no es un parámetro muy crítico porque el uso de un estándar interno normaliza el cambio en la respuesta debido a variaciones en el volumen de muestra inyectado. El criterio para la elección de un estándar interno incluye la necesidad de un estándar comercial que sea químicamente similar (es decir, similar coeficiente de extinción y solubilidad) que los componentes presentes en la muestra y que sea químicamente estable en las condiciones de la disolución reguladora empleada para la separación. Un estándar interno nunca debe estar presente de forma natural en la muestra; debe estar presente en el mismo rango de concentración que la muestra y debe de eluirse lejos de los picos de interés. Finalmente, el estándar interno debe ser calibrado como cualquier otro estándar y debe ser exactamente añadido a cada muestra. La fórmula empleada para los cálculos del método del estándar interno es .

$$Cantidad = \frac{Area_i \times FR_i \times Cantidad_{(EINT)_i}}{Area_{(EINT)_i} \times FR_{(EINT)_i}}$$
(96)

3°) El método de adición del estándar, es una variante de los métodos del estándar externo e interno, y se emplea cuando la muestra contiene una cantidad relativamente alta de material interferente. Frecuentemente, la muestra matriz puede influenciar la respuesta del detector causando el fenómeno de extinción, particularmente en el caso de detección por fluorescencia. El uso del método, involucra para el análisis de una muestra dada, primero la adición de una cantidad conocida de estándar de calibración, seguida del análisis de la muestra original. El factor de respuesta para el estándar de calibración esta determinado por el cálculo de la diferencia de áreas de la muestra con el estándar añadido y de la muestra original. La cuantificación final se lleva a cabo usando los cálculos de los métodos del estándar externo o interno.

El empleo de uno u otro de estos métodos, puede variar de un integrador o de un sistema de computadoras a otro; sin embargo, es recomendable que al principio del empleo de esta metodología, se consulte el manual de instrumentación para detalles concretos.

2.66

c) Integración y Medios de salida de datos

Fundamentos

Sea cual sea el caso (integradores, ordenadores, etc.), una señal analógica que viene desde detector del instrumento analítico se convierte en una señal digital antes de que sea extraída alguna información cualitativa o cuantitativa.

La velocidad a la que la señal analógica es digitalizada depende totalmente del tipo de señal electroforética que va a ser procesada. Una regla general empleada por muchos fabricantes de desarrollo de "*software* " cromatográfico es, que un pico debe de estar representado por un mínimo de 10 puntos de datos en orden a representar el área con una precisión del $\pm 0,5\%$ ⁸⁸ (Figura 32). Para un pico típico de HPLC, que tiene una anchura en la base de entre 10 y 60 s, la velocidad de muestreo de datos mínima es del orden de 1 a 0,2 puntos de datos por



Representación gráfica del error promedio de muestreo en función del número de puntos por pico (ciclos). La línea continua representa el cálculo basado sobre picos gaussianos, mientras que la línea discontinua representa a un pico típico con colamiento ("*tailing*")⁸⁸.

segundo (1 a 0,2 Hz). La elevada eficacia de las separaciones EC, en donde el rango de la anchura de pico está entre 0,2 y 5 s, requiere una velocidad de muestreo de datos de 50 a 2 puntos por segundo. El algoritmo computacional procesa estos datos por el análisis de la variación de la respuesta con respecto a un cierto valor de umbral, o como una velocidad de cambio en la respuesta del detector.

En nuestro caso la salida del pico se determina, en principio, cuando el algoritmo de detección la busca realizando un test de umbral sobre la señal recibida. Compara la elevación de la señal con el umbral especificado por el usuario para localizar el punto de despegue del pico. El parámetro relativo al umbral define la velocidad de cambio (pendiente) de la señal en $\mu V / s$. La pendiente de la señal se promedia considerando dos intervalos de datos agrupados, comparándose con el umbral para determinar el punto de salida del pico. Así (Figura 33), un punto de salida posible, se determina cuando la pendiente promedio de la señal entre los datos agrupados B₁ y B₃ es mayor o igual que el valor umbral; cuando esto ocurre el algoritmo de detección señala B₁ como el posible punto de salida. Los puntos individuales que contiene el agrupamiento se examinan por el algoritmo de detección, para encontrar el punto de despegue.



<u>2.68</u>

Posteriormente, el algoritmo de detección busca el vértice del pico (máximo), después de que se ha confirmado la salida del mismo, y va comparando la señal hasta que la pendiente cambia de signo; en ese instante, asigna al primer punto correspondiente a ese agrupamiento el valor del vértice, pero el valor real del mismo lo asigna cuando ha terminado el proceso de integración y se ha determinado la línea base (Figura 34).



Una vez que se ha determinado el vértice del pico, el algoritmo de detección busca el final del pico, comparando la pendiente de la señal con el umbral especificado por el usuario y cuando dos pendientes consecutivas son menores que dicho valor, señala el último punto del último agrupamiento como el posible punto final. Examina los puntos del siguiente agrupamiento para encontrar el punto final del pico (Figura 35).



La segunda parte del procedimiento en la determinación de picos es su integración, que emplea los valores del principio y del final identificados para obtener la línea base de los picos aislados y de los que están solapados. En éste último caso, el algoritmo de integración, para distinguir entre los picos adyacentes (muy próximos) y los que están solapados, compara la anchura que hay entre el punto final y el de salida de dos picos muy próximos (W_3), con la anchura de cualquiera de ellos ($W_1 \circ W_2$) (Figura 36). Para determinar si estos picos están solapados o no, computa la anchura de cada pico respecto del espacio existente entre los dos. Si el cociente es menor o igual a 3,0 los picos se consideran solapados y si no, totalmente resueltos, ya que 3,0 = [6σ (anchura de pico en la base)] / [2σ (distancia entre los picos)].



Una vez que el algoritmo de integración determina que picos adyacentes están solapados, dibuja una línea base proyectada desde el punto de salida del primer pico al punto final del último de ellos, y del punto inicial al final de cada pico individual, en todos los picos del electroferograma.

Cuando se ha construido la línea base, el algoritmo de integración asigna el tiempo correspondiente al dato más elevado tomado desde la línea base, (tiempo de retención (TR)). La altura del pico se calcula como la distancia (en μV) desde la línea base al vértice del pico (H_v). El área total del pico (A_t) se calcula por la adición de las áreas de los intervalos alrededor de cada dato entre la salida y el final del pico. La región que hay por debajo de la línea base (A_b) se resta del área total (A_t = A_p + A_b) para obtener el área de pico propiamente dicha (A_p) (Figura 37).



Figura 37

Datos empleados para el cálculo del área de pico: t_{b1} es el tiempo de salida de pico, h_1 es el incremento de altura a la salida de pico, H_v es la altura de pico, tb₂ es el tiempo de final de pico, h_2 es el incremento de altura al final de pico y T_R es el tiempo del vértice del pico. El área de pico da una mejor información cuantitativa que la altura de pico. La peor linealidad exhibida por el empleo de la altura de pico se atribuye a la sobrecarga del soluto, que da como resultado un ensanchamiento del pico y un achatamiento concomitante de la altura del mismo. Si todos los componentes en una muestra dada están completamente resueltos, entonces es relativamente fácil dar una extrapolación cuantitativa a partir de una curva obtenida con unos estándares dados. Sin embargo, cuando los picos están mezclados o existe sobre todo una línea base inestable y cambiante , entonces la determinación con precisión del área o la altura pueden ser muy dificiles. Los distintos métodos que se emplean para asignar líneas base en estos casos fueron discutidos por Dyson⁸⁵ y Katz⁸⁹.

Optimización de la Integración

La optimización de la señal de integración en EC contempla el elevado ruido que es característico del detector de absorvancia empleado. El incremento del ruido es una consecuencia de la corta longitud del camino óptico que viene dictado por los diámetros internos ($50 a 100 \mu m$), típicos de los capilares empleados en EC. La supresión del ruido puede maximizar mucho la exactitud del área de integración. La Figura 38 ilustra la relación entre exactitud de la integración y nivel de ruido⁹⁰. Este efecto se observa con más frecuencia cuando se mide la reproducibilidad del área con análisis repetitivos. Para concentraciones de muestra que dan valores elevados del cociente señal / ruido, se experimentan pequeñas ambiguedades con la asignación de líneas base durante la integración. Conforme decrece la razón señal / ruido, la altura relativa de la línea base va cambiando comparada con el incremento de la altura de pico, obteniéndose diferentes asignaciones de línea base de un análisis a otro.



Figura 38

Precisión de la medida del área de pico en función de la relación señal (S)/ ruido (R). La anchura de pico en la base es de 10 s con un intervalo de muestreo de 1 s. La curva EMG se obtiene según el modelo matemático conocido como función gaussiana modificada exponencialmente ⁹⁰.

2.72

La precisión de un análisis dado se puede optimizar con el conjunto de filtros detectores de la señal (" constante de tiempo " (TC) o " tiempo de elevación " (RT)) y factores de agrupamiento (parámetro " anchura de pico " (PW)). Los filtros detectores de la señal proveen un medio de amortiguamiento del ruido del detector, por ralentización de la velocidad a la que la señal cambia mediante la manipulación de un tiempo electrónico constante. Si se emplea una velocidad filtrante demasiado alta, la sensibilidad (señal / ruido), se mejora significativamente, pero a expensas de la eficacia y la resolución, debido a la distorsión del pico. El error cuantitativo de muestreo debido al excesivo ruido, puede manejarse mejor mediante el uso de filtros electrónicos de señal del detector. En el primer caso, el tiempo de elevación se define como el tiempo en el cual el detector responde a un cambio en la señal en un intervalo comprendido entre el 10% y el 90% del máximo de la misma. Los tiempos de elevación normales están en el rango de 0,02 a 5 s. Si se emplea un valor de 0,1 ó menor, entonces el detector está posibilitado para responder muy rápidamente a los cambios en la concentración de la zona de muestra. Este tiempo de elevación será el apropiado para formas electroforéticas de picos con un tiempo de elución promedio de 0,6 s, desde inflexión a inflexión de la línea base. La elución de picos de esta velocidad es el resultado de una elevada eficacia de la separación, del orden de un millón o más platos teóricos, o de separaciones que tienen lugar en capilares muy cortos (< 50 cm) y a altos voltajes (> 20 kV). Bajo estas condiciones, los niveles de ruido resultantes observados serán altos y así esto se convierte en una demarcación entre sensibilidad y eficacia⁸⁴. En EC, la eficacia típica es menor de 500.000 platos / metro, con anchuras de pico (en la base) en el rango de 2 a 5 o más segundos. En el caso de una anchura de pico de 5 s., el valor óptimo de tiempo de elevación ($RT_{opt} = PW_{base} / 6$), será de 1 s. La selección de este valor reduce en efecto el ruido del detector en un factor de tres o cuatro veces, respecto a cuando se emplea el valor de tiempo de elevación de 0,1 s. El empleo de tiempos de elevación que excedan la mitad de la anchura de pico dan como resultado picos distorsionados, pérdidas de resolución y pérdida de precisión analítica.

El factor de agrupamiento en la integración es una función que promedia datos digitalizados en orden a suprimir ruido de la línea base. Similarmente, la consecuencia de una elección de un excesivo agrupamiento es la distorsión de la forma del pico, que da como resultado un decrecimiento de la resolución. Como regla general, el factor de agrupamiento empleado no deberá incrementar la anchura de pico más de un 10 % del que resulta de una velocidad de muestreo de datos correspondiente a 10 puntos a través de la base de un pico. Una vez que los filtros de la señal del detector y los factores de agrupamiento están optimizados la exactitud dependerá de la calidad del integrador comercial o del algoritmo de datos utilizado. En términos generales, la calidad del integrador o del sistema de datos está determinada por su capacidad para detectar rápidamente picos muy estrechos, y por la sofisticación del algoritmo empleado, lo que mide su capacidad para determinar con precisión los puntos extremos de los picos.

2.3.5 Instrumentación y Representación del Sistema

En todos los instrumentos comerciales, las partes en contacto con alto voltaje están colocadas en un recinto detrás de una puerta. El operador puede acceder a las mismas solamente si interrumpe el circuito de alto voltaje entre los electrodos y la fuente de potencia, lo cual se lleva a cabo por una variedad de medios que usualmente involucran a un interruptor de contacto entre la puerta que conduce al interior del compartimento por una parte, y al cuerpo del instrumento por otra. La Figura 39 muestra una vista del interior del compartimento de un electroferógrafo capilar comercial. Los viales llenos con electrolito portador se alternan con los viales de la muestra en el carrusel de la parte izquierda de la Figura 39(A). Durante una separación y en el tiempo entre análisis, el capilar se coloca en uno de los viales del electrolito. Un



2.74

cambio de la posición del capilar entre los viales se lleva a cabo por elevación de la parte final del capilar sobre la cara superior de la bandeja, colocación de la bandeja en la nueva posición y bajada de el extremo del capilar a esa posición. El brazo que eleva el capilar es discernible como un dispositivo blanco que reposa sobre la mitad posterior de la bandeja de muestra. Todos los movimientos de la bandeja de muestras y de subida del brazo, están completamente automatizados. Desde la bandeja de muestra el capilar alcanza, atravesando la célula del detector colocada en la mitad superior derecha del compartimento, el interior de un contenedor de electrolito colocado en otro carrusel. Este también posee movimientos automáticos. El cable de alto voltaje, convenientemente aislado, se conecta, por una parte, al electrodo de alto voltaje unido al brazo elevador, y por otra a la fuente de alto voltaje, que está encerrada en una caja colocada en la pared derecha del compartimento.

El muestreo hidrostático se inicia por elevación del carrusel a la posición mostrada en la Figura 39(A). El carrusel se mantiene en esta posición elevada durante un tiempo programado por el operador. Al final del tiempo de muestreo, el carrusel se baja completamente otra vez a la posición mostrada en la Figura 39(B). Las subidas y bajadas del carrusel se llevan a cabo por un mecanismo que funciona suavemente conducido por un motor con etapas programables, y en consecuencia con una precisión que no puede ser igualada en una actuación manual. La precisión típica de las áreas de pico medidas directamente se sitúa entre un 1 - 2 % de RSD. Con procedimientos de normalización que eliminan los efectos de conductividad de la muestra, fluctuaciones de temperatura, etc., es posible llevar a cabo una reproducibilidad por debajo del 1 % RSD.

Con el carrusel en la posición más baja y el capilar dentro del electrolito, el instrumento comienza a elevar el potencial hacia el valor programado para la separación. Los tiempos están controlados por el software con una precisión medida en milisegundos. La precisión resultante de los tiempos de migración medidos directamente están, en general por debajo del 1 % RSD y puede mejorarse por normalización, a valores por debajo de 0,1 % RSD.

Los diseños completamente automatizados de los instrumentos comerciales eliminan cualquier razón para dudar de la competencia para la determinación cuantitativa de la muestra. La buena precisión de los tiempos de migración y las áreas de pico, sin embargo, se deriva no solamente de la ejecución controlada por microprocesador de la introducción de la muestra y de los ajustes de voltaje, sino también de otras contribuciones, como el ajuste y control de la temperatura, el cambio programado de corriente y voltaje durante las separaciones, que mejoran notablemente la precisión de los resultados. También son importantes, entre otras cosas, la elección de la velocidad de adquisición de datos y los diversos procedimientos de normalización. En los apartados siguientes trataremos con más detalle algunas de estas funciones.

a) Efecto de las Fluctuaciones de la Temperatura

En un experimento ilustrativo³⁹, se midieron los cambios producidos en la temperatura ambiente en la proximidad inmediata a la pared de un capilar de sílice fundida de 75µm de diámetro interno, observándose que los picos tenían un cambio considerable en los tiempos de migración (entre un 2 - 3%) y que la secuencia de migración de los picos permanecía invariable en el rango de temperatura considerado.

Ambas observaciones están de acuerdo con la ecuación (2), que relaciona los tiempos de migración con las movilidades electroforéticas y con la ecuación (6), que expresa la movilidad electroforética como una función de la viscosidad. El primer efecto de la temperatura es a través de la viscosidad y sus variaciones afectan a todos los iones de la misma forma. La temperatura induce cambios notables en la viscosidad que se aproximan a un 2 % por grado celsius. En el experimento sólo se observa un cambio en el traslado de los tiempos de migración

de aproximadamente un 0,5 % por grado, permitiéndonos concluir que la temperatura del electrolito está cambiando en menor grado que la del agua del medio.

Fluctuaciones de temperatura entre 25 y 32 °C se observan frecuentemente en laboratorios sin regulación con aire acondicionado. Un cambio de los tiempos de migración mayor de aproximadamente un 3 % conduce a la no identificación de picos con migración emparejada, y esto no es aceptable en una rutina de uso. Así, se tienen dos caminos diferentes para la eliminación del efecto de la temperatura sobre el tiempo de migración: el primero consiste en la aplicación de procedimientos de normalización, y el segundo involucra la termostatación de los capilares de separación. Sobre éste último aspecto, veamos ahora como se controla la temperatura en los aparatos comerciales de EC.

La corriente eléctrica necesaria para conducir la electromigración de los iones en capilares puede causar un incremento considerable en la temperatura de los electrolitos portadores. En la sección anterior va vimos las razones de porqué una disipación del calor adecuada sólo es posible en capilares con diámetros internos pequeños (< 100 µm). Aún con este tipo de capilares, la temperatura de un electrolito portador durante un análisis rara vez es idéntica a la temperatura ambiente. En un instrumento que depende sólo de la convección natural de calor entre la pared del capilar y el aire estancado, la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura promedio en el capilar durante el análisis puede ser mayor de 45 °C⁹¹. Los cambios de temperatura no afectan sólo a la precisión de las áreas de pico y tiempos de migración, sino que también pueden degradar a los compuestos lábiles térmicamente. Por tanto, el objetivo del control de temperatura en sistemas EC es estabilizar las fluctuaciones de temperatura, y llevar a cabo la mayor reducción posible de la diferencia entre la temperatura ambiente y la del electrolito portador. En nuestro caso, para el control de temperatura, se utiliza circulación rápida de aire dentro del compartimento cerrado, que contiene no sólo el capilar, sino también el electrolito portador, los vasos y la célula del detector. Este diseño permite a un gran número de elementos del sistema estar incluidos en un entorno controlado. Los viales de muestra están expuestos a las mismas temperaturas que el electrolito portador fuera del capilar. El operador puede fácilmente adaptar los capilares para su uso con el instrumento. Como el intercambio de aire con el entorno está minimizado, el instrumento exhibe suficiente capacidad térmica para que no le afecten las fluctuaciones rápidas de temperatura ambiente.

Por último comentar que mientras la disipación del calor y estabilización de temperatura son completamente suficientes, cuando en el laboratorio se pueden experimentar cambios de temperatura importantes, será necesario utilizar uno de los procedimientos de normalización que veremos posteriormente.

b) Efecto de la Diferente Conductividad de la Muestra

El problema de la cuantificación siguiendo la introducción electromigrativa de la muestra con diferentes conductividades está reconocido y discutido en la bibliografia⁶³. Un problema similar al de electromigración se observa también para algunas muestras introducidas por una presión diferencial (hidrostática, presión y vacío). Para ilustrar este hecho consideramos las muestras de la Tabla 7.

Esta Tabla contiene cinco muestras con idénticos niveles de cloruro y sulfato en presencia de fluoruro, cuya concentración se incrementa de muestra en muestra en razón de 1 : 75 (ppm Cl⁻ a ppm de F^-). Si se analizan las cinco muestras con el Sistema EC se obtienen los cinco electroferogramas de la Figura 40. Como vemos se observa un significativo traslado de los tiempos de migración que hace imposible la identificación de los picos. Por otra parte los tiempos de migración parecen tener un cambio regular dependiente de la concentración de fluoruro, hecho que sugiere que pueden ser causados por cambios en la conductividad de la muestra debido al aumento de la concentración de fluoruro. Es de notar que la conductividad

2.76

del electrolito portador, que es 5 mM de Cromato, a pH 8, que también contenía una sal de alquilamonio (Waters OFM BT Anion) para la inversión del flujo electroosmótico, es de 1131 μ S / cm³⁹, valor que es superado por la quinta muestra, y que explica las diferencias entre su electroferograma y los demás (el pico que antecede al Cl⁻ es el del Br⁻ que se emplea como anión del Waters OFM BT Anion).

Tabla 7

Cinco Muestras Diferentes para Evaluar la Influencia de la Conductividad de la Muestra sobre los Tiempos de Migración³⁹. Cloruro (ppm) Sulfato (ppm) Fluoruro (ppm) $A (\mu S / cm)$ Muestra 55 1 4 4 4 2 4 4 30 203

4

4

60 100

3

4

4

4



Figura 40

Modo de potencial constante. Desplazamiento de los tiempos de migración debido a los cambios en la concentración de un componente mayoritario. Electrolito portador : 5 mM de cromato sódico, 0,5 mM OFM BT (modificador de flujo electroosmótico de Waters), pH 8. Muestreo: hidrostático durante 30 s a 9,8 cm de elevación. Capilar: 52 cm x 60 cm x 75 μ m. Voltaje de separación: -20 KV. Detección: UV indirecta a 254 nm, costante de tiempo 0,1 s y 20 Hz de velocidad de adquisición de datos. Las concentraciones son las indicadas en la Tabla 7¹³⁹.

356

574

De acuerdo con Fuch³⁹ el capilar empleado anteriormente ($75\mu m x 52 cm x 60cm$) se puede tratar como una disposición en serie de dos resistencias eléctricas: R_s = resistencia de la zona de muestra y R_{el} = resistencia de la columna de electrolito portador dentro del capilar. Una vez que la migración comienza, ocurre que los iones analito marchan de la zona de muestra y son recolocados con los iones del electrolito de fondo (portador), lo que significa que la resistencia de la zona de muestra cambia en cierta cantidad, por causa de la diferencia de conductividad de los iones analito y del fondo. También la difusión puede difuminar los bordes de la zona de muestra. Todavía la zona de muestra podrá mantener su identidad como una región de conductividad que es diferente de la conductividad del resto del capilar; esta región podrá migrar con la velocidad del flujo electroosmótico detrás de los analitos de interés. Al principio de una separación, la resistencia total del capilar R_{tot} se puede calcular a partir de las resistencias de dos zonas principales en el interior del mismo

$$R_{t ot} = R_S + R_{el} \tag{97}$$

La longitud requerida de una zona de muestra, para cálculos posteriores de R_s y R_{el}, se obtiene a partir de la ecuación (84) para velocidades de muestreo (Δv), tomando para Δh = = 9,8 cm y para L_t = 60 cm. De la velocidad de muestreo resultante de 2,82 x 10⁻² cm / s, se obtiene la longitud de zona de muestra L_s = Δv x tiempo de introducción de la muestra (muestreo) = 2,82 x 10⁻² cm / s x 30 s = 0,842 cm. Las dos resistencias en serie se pueden calcular, a partir de la conductividad específica listada en la Tabla 7 y habida cuenta de que L_s = 0,842 cm, L_t = 60 - 0,842 = 59,158 cm

$$R_s = \frac{L_s}{(G\pi r^2)} = \frac{0,842}{(G\pi 0,00375^2)}$$
(98)

y

$$R_{el} = \frac{L_{el}}{(G\pi r^2)} = \frac{59,158}{(G\pi 0,00375^2)}$$
(99)

Con estas expresiones y para las distintas muestras consideradas, se pueden calcular los valores de resistencias en el sistema EC mostrados en la Tabla 8.

Resistencias de Zonas en el Capilar Durante las Separaciones Mostradas en la Figura $(40)^{39}$. Muestra $R \ge 10^{-7} (\Omega)$ $R \ge 10^{-9} (\Omega)$ $R \ge 10^{-9} (\Omega)$

Tabla 8

Muestra	$R_{s} \ge 10^{-7} (\Omega)$	$R_{el} \ge 10^{-9} (\Omega)$	$R_{tot} \ge 10^{-9} (\Omega)$
- 1	34,71	1,18	1,53
2	9,39	1,18	1,27
3	5,37	1,18	1,23
4	1,33	1,18	1,21
5	1,26	1,18	1,19

Mediante la Ley de Ohm se puede determinar la caída de tensión para cada una de las dos zonas, a partir del voltaje de separación total Ψ_{tot} de 20000 V, habida cuenta de que dicho voltaje es la suma de los voltajes parciales (Ψ_s y Ψ_{el}), correspondientes a las dos zonas del

capilar, lo que permite determinar la corriente eléctrica a través del mismo, y por tanto esos voltajes parciales. A partir de ellos se obtiene la intensidad del campo eléctrico en cada zona $(E_s = = \Psi_s / L_s; E_{el} = \Psi_{el} / L_{el})$ resultando, para cada muestra, los valores indicados en la Tabla 9.

Tabla 9Distribución de Campo Eléctrico en el Capilar Durante las Separaciones Mostradas en la
Figura (40)³⁹.

Muestra	$E_s [V/cm]$	E _{et} [V / cm]
1	5390	260
2	1756	313
3	1037	323
4	654	329
5	250	335

Como se puede apreciar en la Tabla 9 y a tenor de la ecuación (2), el cambio del tiempo de migración en la Figura 40 se actualiza como consecuencia de dos tendencias contradictorias. El campo en una zona de muestra decrece con el incremento de la conductividad de la muestra, lo que sólo contribuirá a alargar los tiempos de migración; sin embargo la zona de muestra es mucho más corta que la zona del capilar que está llena con electrolito portador, y la dirección del cambio de fuerza eléctrica con el electrolito es así decisiva. La fuerza del campo dentro del electrolito portador aumenta al ir desde muestras de más baja conductividad a muestras de más alta conductividad, causando altas movilidades y cortos tiempos de análisis.

c) Efecto de las Velocidades de Migración sobre las Areas de Pico

En las dos secciones anteriores hemos visto como la temperatura y la conductividad de la muestra pueden influenciar a los tiempos de migración en EC. En esta sección analizaremos el efecto de los cambios en los tiempos de migración sobre las áreas de pico. Por motivos de simplificación, asumimos que la zona electroforética tiene una anchura constante y una concentración de analito constante, esto es razonable porque el ensanchamiento de la zona por difusión longitudinal es mínimo. Evaluaremos la magnitud de la variación de las áreas de pico para la misma cantidad de analito, registrado a diferentes velocidades de migración; en la mayoría de los casos estos cambios en los tiempos de migración ocurren por cuatro mecanismos diferentes:

Primero, por cambio de la intensidad del campo eléctrico (diferentes voltajes de separación, diferentes conductividades de la muestra, diferentes diámetros de capilar, diferente temperaturas, etc.).

Segundo, por cambios de viscosidad (debido a cambios de temperatura, composición del disolvente orgánico, etc.).

Tercero, por cambios en el flujo electroosmótico (ej: pH, viscosidad, cambio del nú mero de cargas de la pared del capilar, etc.).

Cuarto, por cambios en las movilidades electroforéticas de los analitos debido a cam bios en los equilibrios de disociación, paridad iónica, interacciones con la pared, etc.

Obviamente los picos en EC se pueden aproximar a curvas gausianas. Una curva d distribución gausiana muestra los efectos de una difusión longitudinal. Las zonas de analito n sólo se ensanchan en la dirección de migración sino también, como vimos anteriormente e

dirección opuesta. En consecuencia, el problema es registrar la misma distribución de concentración sobre diferentes longitudes de tiempo. Una zona de analito de distribución longitudinal de concentración, produce los mismos valores, sin cambios de máximas y mínimas deflecciones de la señal del detector, independientemente de la rapidez con que se mueva. Estos cambios son de anchura de zona. En términos de parámetros caracterizadores de las curvas gausianas, podemos llamarla una distribución de altura constante, h y con cambios en la varianza σ^2 .

d) Efecto de las Velocidades de Adquisición de Datos

La resolución a lo largo de la coordenada del tiempo se determina por la frecuencia de muestreo de un convertidor A/D. En orden a preservar la integridad de una señal analógica, el operador se inclina naturalmente a escoger la frecuencia más alta posible que es de 50 a 60 puntos por segundo en la mayoría de los instrumentos. Esta aproximación crea una gran demanda de almacenamiento de datos en un laboratorio computerizado, por ello y para evitar el traslado de datos en exceso, por ejemplo de disco duro a un disco flexible, muchos operadores trabajan a bajas velocidades de muestreo. Según la fórmula deducida por Rosi⁹⁰, las velocidades de muestreo apropiadas se pueden estimar a partir de anchuras de pico

$$\%E = \frac{33,3}{(n^2h\Delta t)}$$
(100)

donde %E es el porcentaje de error cometido en la medida de un área de pico gaussiana, n es el número de puntos de datos que describen un pico a lo largo del eje x (velocidad de muestreo), h es la altura de una curva gausiana, e Δt es el intervalo de tiempo del pico.

Para un pico gaussiano de altura unidad y anchura un segundo, se puede probar por ejemplo, primero una velocidad de muestreo de 5 puntos / s; el error generado por el muestreo es 1,33 %. Si se incrementa la velocidad de muestreo a 10 puntos / s, el error en el área medida por el muestreo viene a ser solo de 0,33 %. En sentido estricto la ecuación (100) es admisible sólo para picos gaussianos, y sólo bajo condiciones óptimas los picos en EC son gaussianos. Un modelo útil de la función gaussiana modificada exponencialmente (EMG) se desarrolló por modelización matemática de picos cromatográficos distorsionados, en este trabajo Rosi⁹⁰ estableció el "*software* " para la integración numérica de curvas EMG (ver Figura 38).

e) Procedimientos de Normalización en EC

Los parámetros experimentales fluctuantes pueden causar variaciones en los tiempos de migración y en las áreas de pico. Dentro de un margen estrecho de tiempos de migración, podemos esperar que las áreas de pico sean función lineal de los tiempos de migración. En la mayoría de los casos las áreas de pico pueden ser así normalizadas, simplemente por división con los tiempos de migración correspondientes. Según Grossman y colaboradores⁹² para fluctuaciones más complejas de los tiempos de migración, se tienen que emplear las correcciones más apropiadas desarrolladas por Ackermans, Everaerts y Beckers^{93,94}.

Inicialmente los cálculos de las movilidades iónicas efectivas (3) fueron sugeridos como una buena aproximación a la normalización de los datos de migración.

Lee y Yeung⁹⁵ apuntaron que la movilidad electroforética también está afectada por los cambios en la viscosidad de un electrolito portador (10), y además estos cambios de viscosidad con la temperatura son las causas más frecuentes de imprecisión en los tiempos de migración. Por otra parte mostraron que un cálculo del cociente de movilidades o de tiempos de migración de los picos en una misma separación, es un camino efectivo para eliminar la influencia de la viscosidad sobre los datos de migración. Así por ejemplo, se puede dar lugar a un

cociente de movilidades efectivas para un analito y un pico de referencia de especies monovalentes pertenecientes a un mismo electroferograma. Si empleamos la ecuación (6), obtenemos

$$\frac{\mu_{i} \text{ or}(1)}{\mu_{ion}(referencia)} = \frac{r \text{ ion}(referencia)}{r \text{ ion}(1)}$$
(101)

Si por simplicidad se asume que el término μ_{EOF} de la ecuación (3) es despreciable, podemos extender la validez de la ecuación (101) a los tiempos de migración observados

$$\frac{t_{ion(referencia)}}{t_{ion(1)}} = \frac{\mu_{ion(1)}}{\mu_{ion(referencia)}} = \frac{r_{ion(referencia)}}{r_{ion(1)}}$$
(102)

donde los tiempos de migración para el pico analito y el pico de referencia corresponden a los valores obtenidos a flujo electroosmótico cero. Las ecuaciones (101) y (102) no incluyen un término dependiente de la viscosidad. Aún en los casos donde la magnitud del flujo electroosmótico no puede considerarse despreciable, los cálculos numéricos muestran que una normalización de los tiempos de migración, por el uso de un pico de referencia, eliminan efectivamente alguna influencia de la viscosidad.

Considerando la influencia de la temperatura para un sistema de separación empleado, que exhibe una contribución significativa del flujo electroosmótico sobre la movilidad aparente de los iones analitos, se obtienen los datos de la Tabla 10.³⁹

			*			•		
Temp. (°C)	Br	Cl	SO ₄ -2	NO ₂	NO ₃	F -	HPO ₄ ⁻²	HCO ₃
60	1,984	,913	1,944	1,974	2,015	2,305	2,353	2,595
55	1,918	,938	1,971	1,998	2,041	2,331	2,373	2,618
50	1,951	,971	2,003	2,031	2,073	2,368	2,418	2,661
45	1,976	,997	2,033	2,058	2,101	2,403	2,448	2,701
32	2,031 2	2,053	2,094	2,117	2,158	2,485	2,538	2,793
29	2,057	2,081	2,121	2,143	2,184	2,515	2,568	2,823
25	2,096 2	2,116	2,162	2,184	2,224	2,568	2,623	2,881

Tabla 10Tiempos de Migración (min) de Aniones a Diferentes Temperaturas.39

Ahora si se calculan las razones de los tiempos de retención, en este caso, prueban ser un método efectivo de eliminación de los desajustes inducidos por la temperatura. Si se toma como referencia el pico del Br⁻ se obtienen los datos de la Tabla 11³⁹. También se incluyen los % RSD para cada uno de los aniones

Temp. (°C)	Br	Cl.	SO ₄ -2	NO ₂ -	NO ₃ .	F	HPO ₄ -2	HCO ₃ -
60	1	1,01	1,026	1,042	1,064	1,217	1,242	1,37
55	1	1,01	1,027	1,042	1,064	1,215	1,237	1,365
50	1	1,01	1,027	1,041	1,063	1,214	1,239	1,363
45	1	1,011	1,029	1,042	1,063	1,216	1,239	1,366
32	1	1,011	1,031	1,042	1,063	1,224	1,25	1,375
29	1	1,011	1,031	1,042	1,063	1,223	1,248	1,372
25	1	1,01	1,031	1,042	1,061	1,225	1,251	1,372
% RSD		0,053	0,213	0,036	0,101	0,383	0,468	0,342

Tabla 11Normalización por Razones de Tiempos de Migración (min) de Aniones a DiferentesTemperaturas.39

Los datos de migración normalizada que se obtienen fluctúan alrededor de un 0,5 % para las temperaturas ambientes investigadas. Así la normalización por razones de tiempos de migración mejora la precisión de los resultados para un gran número de situaciones. Además este tipo de cálculo se puede realizar automáticamente por la mayoría de los integradores como parte de su rutina estandar interna.

2.4 EJEMPLOS DE APLICACION DE EC COELECTROOSMOTICA

La EC Coelectroosmótica depende de las diferencias de movilidad de los iones de bajo peso molecular, que normalmente son mayores, o se pueden hacer más grandes que las de las moléculas biológicas más importantes. Las separaciones coelectroosmóticas hacen uso de el flujo electroosmótico para aumentar la movilidad electroforética.

La aproximación coelectroosmótica a las separaciones electroforéticas de iones se ha desarrollado recientemente en el marco de una metodología comprensible, que también incluye la detección UV indirecta. Para esta técnica se propuso un nombre nuevo: *Electrophoretic Capillary Ion Analysis* : CIA⁴⁷. El método CIA viene definido por una realización óptima de las condiciones siguientes:

- 1^a) La Condición del Flujo Electroosmótico : Para satisfacer esta condición, el analito debe ser obligado a migrar en la dirección del flujo electroosmótico. Para el análisis de cationes, esto se realiza mediante la asignación de polaridad positiva a la zona de inyección de la muestra, y utilizando la dirección natural de la electroósmosis en los capilares de sílice fundida, que es hacia la zona negativa del sistema. Para el análisis de aniones, la zona de inyección de la muestra tiene polaridad negativa, y la dirección natural del flujo electroosmótico en el capilar de sílice fundida se invierte hacia la zona positiva del sistema, mediante adición de un aditivo conveniente o por la modificación química de la pared del capilar.
- 2^a) La Primera Condición del Similión : La movilidad de los iones del analito debe ser lo más parecida posible a la de los similiones del electrolito portador. La desigualdad de movilidades da como resultado picos con deformaciones, y deterioro de la resolución de los picos, que migran estrechamente.

2.82

- 3^a) La Segunda Condición del Similión : La longitud de onda de máxima absorción UV de los similiones del electrolito debe ser lo suficientemente mayor o menor que la de los iones del analito. La sensibilidad estará comprometida a menos que los similiones del electrolito portador generen una absorción UV de fondo a una longitud de onda a la que la absorción de los similiones del analito sea mínima o inexistente.
- 4^a) La Condición del Electroapilamiento : La sensibilidad de la detección se optimiza y se eliminan los picos del sistema, si hacemos que la fuerza iónica total de la muestra sea menor que la del electrolito portador.



Figura 41

Separación de 36 aniones por CIA. La concentración de todos los componentes está dentro del rango entre 0,3 y 3,3 ppm. La muestra fue introducida por electromigración durante 15 s a 1 KV. Electrolito portador : 5 mM de cromato, 0,4 mM de OFM BT (modificador de flujo electroosmótico de Waters), pH 8. Capilar: 52 cm x 60 cm x 50 μ m, de sílice fundida. Voltaje de separación: - 30 KV. Detección: UV indirecta a 254 nm.⁷⁰

5^a) La Condición de Kholrausch : La introducción de muestra electromigrativa se puede optimizar más allá de las mejoras llevadas a cabo por electroapilamiento, si las condiciones analíticas se aproximan a un estado estacionario isotacoforético.

A causa de que los detectores UV predominan en los instrumentos comerciales de EC, la CIA tiene una muy frecuente utilización en metodología coelectroosmótica. A continuación veremos algunas reglas adicionales de optimización y algunos ejemplos de aplicación de este método.Las capacidades generales de CIA quedan ilustradas en la Figura 41 y en la Tabla 12.

1	tiosulfato	19	o-ftalato
2	bromuro, cromato	20	galactarato, perclorato
3	cloruro	21	carbonato, metanosulfonato, glicolato, selenito
4	sulfato, <u>sulfuro</u>	22	acetato, oxalacetato, piruvato
5	nitito, ioduro	23	<u>cloroacetato</u>
6	nitrato, seleniato, <u>oxalato</u>	24	etanosulfonato, trifluoroacetato, propionato, dicloroacetato, lactato
7	molibdato, ortovanadato	25	propanosulfonato, glicerato
8	azida	26	DL-aspartato
9	wolframato	27	crotonato
10	monofluorofosfato	28	butirato, a-hidroxibutirato
11	clorato	29	butanosulfonato
12	citrato, isocitrato, transaconitrato, metavanadato, <u>sulfito</u>	30	valerato, 2-hidroxivalerato
13	fluoruro, maleato, malonato, fumarato	31	benzoato
14	formiato, <u>cianuro</u> , bromato	32	L-glutamato, sorbato
15	fosfato, a-cetoglutarato, succinato, tartrato, arseniato, trimesato	33	pentanosulfonato
16	fosfito	34	pentanosulfonato
17	clorito	35	D-gluconato, shikimato
18	glutarato, tiocianato	36	D-galactouronato, glucouronato, hexano, heptanosulfonato

Tabla 12							
Orden de	Migración	de los	Aniones	en	CIAª		

- ^a Los aniones referidos en letra normal corresponden a los picos de la Figura 36.
 - Los aniones referidos en negrita tienen comportamiento migracional sensible a los cambios del modificador del flujo electroosmótico.
- Los aniones referidos en itálica son aniones no incluidos en el electroferograma de la Figura 36 per ro que tienen una migración aproximada a ellos.
- Los aniones subrayados son separados mejor a pH distinto de 8,0.70
- Los datos de migración para los aniones referidos en negrita y en cursiva son sólo aproximados y están fuertemente influenciados por el pH y/o cambios en las condiciones analíticas. La mayoría de los picos vecinos están resueltos solamente en capilares de 50 μ m y no en capilares de 75 μ m (ej. glicolato y cloroacetato).

2.4.1 Ajuste de la Selectividad de Separaciones Aniónicas

Las diferencias mínimas entre las movilidades electroforéticas de los iones, fue un argumento que se dió para no permitir la separación de mezclas complejas. Esta percepción preliminar se ha ido reemplazando gradualmente por la realización de numerosos mecanismos de separación auxiliares, enumerados anteriormente, que se pueden emplear para aumentar la selectividad, más allá del grado permitido por la mera adición de los vectores electroforético y electroosmótico.

La influencia del pH del electrolito portador sobre el comportamiento de migración de los iones de los ácidos débiles es uno de los primeros mecanismos utilizados para el ajuste de la selectividad. La Figura 42 representa la dependencia de los tiempos de migración de los aniones de ácidos débiles y fuertes con el pH. Como es de esperar sólo los aniones de los ácidos débiles, borato y carbonato, exhiben grandes cambios de los tiempos de migración con la variación del pH. La disminución uniforme que se observa en los tiempos de migración más allá del pH= 11,5 está causada por el incremento de la contribución del flujo electroosmótico a las movilidades observadas para los distintos iones analitos (ecuación (8)). La velocidad del flujo electroosmótico se incrementa con el pH porque hay un mayor grado de disociación de los grupos silanol sobre la pared del capilar. Este incremento en el número de grupos silanol disociados conduce a la vez a un correspondiente incremento de la densidad hemimicelar y a valores de potencial zeta más altamente positivos.



Algo inesperados son los cambios ocasionales en la selectividad debido a la variación de concentración de los electrolitos portadores. Así en la Figura 43 vemos que a bajas concentraciones de electrolito, el ion sulfato migra junto al cloruro y conforme va aumentando la concentración de cromato, gradualmente se va separando del cloruro hasta que se mezcla con el nitrito. Este cambio de la movilidad del sulfato esta causado probablemente por el cambio de la carga efectiva debido al incremento de la fuerza iónica. La tendencia general al alargamiento de los tiempos de migración con el incremento de las concentraciones de cromato se puede explicar por un incremento en las corrientes de separación y el correspondiente incremento del campo eléctrico en el capilar lleno con electrolito portador.



Se pueden inducir cambios pronunciados en la selectividad mediante la variación de las concentraciones de los modificadores de flujo electroosmótico, que usualmente es una sal de alquilamonio. Esto se puede apreciar en la Figura 44, donde se han empleado valores normalizados de los tiempos de migración (los respectivos tiempos de migración fueron divididos por el tiempo de migración del cloruro obtenido a la misma concentración del modificador), para
separar el prolongamiento gradual de todos los tiempos de migración con el incremento de la conductividad del electrolito, de los efectos específicos observados para Br⁻, SO₄⁻² y NO₃⁻. Estos iones se comportan gradualmente como un grupo y muestran una variación distinta hacia tiempos de migración mayores conforme aumenta la concentración del modificador. La diferencia entre los datos de migración de estos tres iones por un lado y el resto por otro, se debe probablemente a las diferentes tendencias que pasan a través de la paridad iónica con el modificador de flujo electroosmótico²⁶.



La adición de disolventes orgánicos a los electrolitos portadores puede conducir a cambios pronunciados en el orden de migración. Este hecho fue estudiado por Buchberger y Haddad⁹⁶ y la tendencia general hacia un alargamiento de los tiempos de migración con el incremento de un disolvente parece justificar una explicación basada en la influencia de la paridad iónica. Así, las variaciones llevadas a cabo por los disolventes orgánicos, representan una herramienta muy útil para la adaptación de las condiciones analíticas, de acuerdo con las necesidades de los diferentes tipos de muestras. Un cambio en el componente principal del electrolito portador raramente cambia el orden de migración, sin embargo las separaciones pueden verse influenciadas por una mejora o un deterioro de la resolución entre picos vecinos. De gran valor práctico es la posibilidad de ajustar el orden de migración con la ayuda de las interacciones metal - ligando.

La selectividad de los aniones de baja movilidad (como carbonato, fluoruro, carboxilato, sulfonatos, etc.) se puede modificar invirtiendo completamente el orden de migración, cambiando del modo coelectroosmótico al modo contraelectroosmótico.

En resumen, un usuario de EC Coelectroosmótica tiene a su disposición una gran variedad de herramientas para el ajuste de selectividad. La resolución de picos vecinos se optimiza escogiendo diferentes electrolitos o empleando la complejación, como modo auxiliar de separación. Una inversión del orden de migración de picos emparejados, se resuelve completamente por el cambio de la concentración del modificador de flujo electroosmótico, o por adición de disolventes orgánicos al electrolito portador. Un cambio acompasado del orden de migración se puede completar para analitos de baja movilidad por un cambio del modo coelectroosmótico al modo contraelectroosmótico.

2.4.2 Modulación de la Selectividad para Separaciones EC Catiónicas

El primer trabajo de separación electroforética capilar de cationes data del año 1967 y fue realizado por Hjerten, que describió la separación de Bi y Cu bajo condiciones coelectroosmóticas, empleando ácido láctico como componente principal del electrolito portador. Contrariamente al caso anterior, el número de trabajos que discuten separaciones EC de cationes inorgánicos^{41,42,97-100} ha sido relativamente bajo. La razón de ello puede ser la dificultad considerable encontrada en el desarrollo inicial de las separaciones de cationes. La estrecha correlación del orden de los tiempos de migración de pequeños iones con valores de movilidades electroforéticas (μ_i), que a su vez son directamente proporcionales a las conductividades iónicas equivalentes (λ_i) disponibles en la bibliografía, se ha discutido anteriormente. Esta correlación indica que algunas parejas de iones, de idénticas o similares conductividades pueden ser difíciles de resolver dependiendo sólo de su comportamiento de migración cuando están libres, o cuando están en forma incompleta. Esto se puede ver en la Figura 45.

Las conductividades iónicas equivalentes del amonio y el potasio son idénticas y los picos para los dos cationes comigran en una separación basada únicamente en las movilidades electroforéticas (Figura 45(a)). Como se muestra en la Figura 45(b) este problema de separación se mejora variando el pH a un nivel donde la protonación del amonio, que es una base débil (pK=4,75), sea parcialmente suprimida. Así se resuelve el problema cambiando el pH de 6,15 a 8,5 , con lo que la velocidad de migración aparente de este catión se reduce, mientras que la de el potasio permanece invariable ya que el comportamiento migracional de los cationes más fuertemente básicos permanece sin cambios. Además, este cambio de pH hace que los tiempos de migración de todos los cationes sean más cortos, debido a que la velocidad del flujo electroosmótico se ve incrementada a pH alto.

El gráfico de la Figura 46 representa los valores tabulados de las conductividades iónicas equivalentes límite, frente a los números secuenciales de los metales, asignados dentro de grupos arbitrarios de acuerdo con los valores de las conductividades iónicas equivalentes³⁹. Vemos que hay dos parejas de iones : Sr - Ca, que tienen valores muy próximos de conductividad equivalente y Na - Mg, que difieren sólo muy ligeramente en sus respectivos valores de conductividad equivalente, por tanto podemos predecir, de acuerdo con lo dicho anteriormente, que Sr comigra con Ca y que Na no podrá ser resuelto completamente de Mg, en una separación coelectroosmótica, como se puede ver en la Figura 47(a). Si, de acuerdo con lo dicho anteriormente, intentamos cambiar el pH para mejorar la falta de resolución, podemos causar la precipitación de los cationes del analito, con lo que se evitaría su separación electroforética. Sin embargo si se añade el ácido cítrico al electrolito, los cationes alcalinotérreos podrán participar en grado diferente, de acuerdo con sus respectivas constantes de estabilidad, en un equilibrio de complejación con el ligando citrato. El efecto neto de tales interacciones es una disminución de la concentración de catión libre y un correspondiente ralentizamiento de la velocidad de migración aparente. Así Ca^{+2} y Sr^{+2} son ralentizados de forma diferente y resueltos, y la resolución de Na⁺ y Mg⁺² se realiza por la ralentización del Mg⁺² sin afectar al Na⁺, como se muestra en la Figura 47(b).



a) separación de cationes alcalinos en presencia de amonio. Se emplea un capilar de sílice fundida de 52 cm x 60 cm x 75 μ m, a + 25 KV, con detección UV indirecta a 214 nm y electrolito portador de 5 mM de morfolinoetanosulfonato (MES), ajustado a pH=6,15, e introducción hidrostática de muestra durante 30 s a una altura de 9,8 cm; b) todos los parámetros se mantienen excepto el pH que se ajusta a 8,5. La concentración de los cationes en ambos casos es de 0,4 ppm. Identificación de picos: 1) *Potasio*, 2) *Amonio*, 3) *Sodio*, 4) *Litio*.³⁹



El alargamiento de los tiempos de análisis por la deceleración introducida por la complejación de los cationes del analito, se puede prevenir incrementando un poco el pH del electrolito, lo que conduce a un incremento compensatorio del flujo electroosmótico. El efecto de el equilibrio de complejación sobre las velocidades de migración, junto con los correspondientes vectores electroforético y electroosmótico, se muestra en la Figura 48, donde se observa la modificación de la movilidad iónica μ por complejación. La movilidad del catión M se reduce por la complejación con el ligando A⁴⁷.

Llegado a este punto haremos un breve comentario sobre el papel del similión del electrolito portador. El reactivo UV CAT1(Waters) es un catión que absorbe en el UV, haciendo posible la detección indirecta de los cationes del analito. Su absortividad molar es alta a 214 nm, pero su movilidad electroforética es demasiado lenta para efectuar una separación como la de la Figura_45(a), que es demasiado rápida para él; pero después de la adición de un agente complejante que ralentize la velocidad de migración de los iones del analito, se produce un emparejamiento mejor de las movilidades electroforéticas y como consecuencia de ello, una mejora de la forma de los picos que antes poseían una asimetría frontal.

Por último en las Figuras 49 y 50 vemos los electroferogramas obtenidos para una mezcla de metales alcalinos, alcalinotérreos y de transición que fueron generados con un electrolito que contenía ácido hidroxibutírico (HIBA) como agente complejante.



Figura 47

Dos electroferogramas que representan la separación de una mezcla de cationes de los grupos I A y II A; a) se emplea un capilar de sílice fundida de 52 cm x 60 cm x 75 μ m, a + 25 KV, con detección UV indirecta a 214 nm y electrolito portador de 5 mM de UV CAT 1 (Waters), a pH = 5,2 e introducción hidrostática de muestra durante 30 s a una altura de 9,8 cm; b) todos los parámetros se mantienen excepto la composición (5 mM de UV CAT 1,0,021 mM de ácido cítrico) y el pH (5,5) del electrolito portador. Las concentraciones e identidades de los picos son: 1) *Potasio (0,5 ppm)*, 2) *Bario (1,0 ppm)*, 3) *Estroncio (0,6 ppm)*, 4) *Sodio (0,5 ppm)*, 5) *Calcio (0,4 ppm)*, 6) *Magnesio (0,2 ppm)*, 7) *Litio (0,5 ppm)*.^{99, 39}

2.91



Separación de una mezcla de amonio con cationes de los grupos I A y II A. Se emplea un capilar de sílice fundida de 52 cm x 60 cm x 75 μ m, a + 20 KV, con detección UV indirecta a 185 nm y electrolito portador de 5 mM de UV CAT 1 (Waters), 6,5 mM de ácido α - hidroxiisobutírico (HIBA) y 2,0 mM de eter 18 - corona - 6, e introducción hidrostática de muestra durante 30 s a una altura de 9,8 cm. Las concentraciones e identidades de los picos son: 1) Amonio (1,0 ppm), 2) Potasio (1,0 ppm), 3) Calcio (0,7 ppm), 4) Sodio (0,6 ppm), 5) Magnesio (0,4 ppm), 6) Estroncio (1,5 ppm), 7) Bario (2,0 ppm), 8) Litio (0,2 ppm).³⁹

2.92



Figura 50

Separación simultánea de una mezcla de metales alcalinos, alcalinotérreos y de transición por electroforesis capilar. Se emplea un capilar de sílice fundida de 32 cm x 37 cm x 75 μ m, a + 20 KV, con detección UV indirecta a 214 nm y electrolito portador de 5 mM de UV CAT 1 (Waters), 6,5 mM de HIBA a pH = 4,4, e introducción hidrostática de muestra durante 30 s a una altura de 9,8 cm. Las concentraciones e identidades de los picos son: 1) Potasio (0,8 ppm), 2) Bario (1,5 ppm), 3) Estroncio (1,5 ppm), 4) Calcio (0,7 ppm), 5) Sodio (0,6 ppm), 6) Magnesio (0,4 ppm), 7) Manganeso (0,8 ppm), 8) Cadmio (0,8 ppm), 9) Hierro(II) (1,0 ppm), 10) Cobalto (0,8 ppm), 11) Plomo (1,0 ppm), 12) Níquel (0,6 ppm), 13) Litio (0,2 ppm), 14) Zinc (0,4 ppm), 15) Cobre (0,6 ppm).⁹⁹

2.5 VALIDACION DEL METODO EC EMPLEADO

Cuando se trata de analizar una muestra determinada, se debe validar el método empleado. Para ello, partiendo de la base de que todas las muestras se hayan preparado de la misma forma, se incluyen tres parámetros en el test de viabilidad de resultados del sistema, para una muestra analizada por un método EC determinado (CZE, MECC, etc.), y que corresponden a la reproducibilidad *del tiempo de migración, de la respuesta del pico* y *de la resolución*.

Así, se inyecta una disolución de un estándar determinado seis veces, para el conjunto de estas inyecciones se calcula la desviación estándar (DE), la desviación estándar relativa (%DER) para cada área de pico (V·min), la altura de pico (V) y el tiempo de migración (min), de cada inyección. Se considera el método validado si %DER < 2 para éste análisis en continuo.

Adicionalmente, se debe verificar la preparación del estándar que se emplea, preparando un duplicado del mismo con las mismas concentaciones. Uno de ellos se emplea como el estándar analítico (estándar externo) y el otro se emplea para validarlo (como si fuese muestra desconocida). Se comparan las respuestas promediadas de área de pico de los dos estándares y su resultado se convierte en tanto por ciento. Los resultados de las seis inyecciones (de cada uno de los seis estándares) deben estar en el rango de 98 a 102%.

Además, se debe comprobar la linealidad de respuesta del detección del sistema empleado (UV indirecta). Para ello se construye una curva de calibración, empleando cuatro o más concentraciones de soluto en el estándar (p. e., 4 estándares iguales (con los mismos iones) a 4 concentraciones distintas). Se calcula la regresión lineal y se determina la pendiente correspondiente a cada estándar, obteniéndose también su varianza, su ordenada en el origen, sus intervalos de confianza y su coeficiente de correlación. 1. Helmholtz, H. V., Wiedemanns Ann. 7, 337 (1877).

2. Hittorf, J., Pogg. Ann. 98, 1.

3. Nernst, W. Z., *Electrochem*. 3, 308 (1897).

4. Kholrausch, F., Wiedemanns Ann. 62, 209 (1897).

5. Tiselius, A., Nova Acta Regiae Goc. Sci. Ups. Ser. iV4, 1 (1930).

6. Kendall, J., and Crittenden, E. D., Proc. Natl. Acad. Sci. 9, 75 (1923).

7. Svenson, H., Kolloid. Z. 87, 180 (1939).

8. Longsworth, L. G., J. Am. Chem. Soc. 67, 1109 (1945).

9. Haglund, H., and Tiselius, A., Acta Chem. Scand. 4, 957 (1950).

10. Smithies, O., Biochem. J. 61, 629 (1955).

11. Hjerten, S., Arkiv Kemi 13, 151 (1958).

12. Martin, A. J. P., and Everaerts, F. M., Anal. Chim. Acta 38, 233 (1967).

13. Hjerten, S., Chromatogr. Rev. 9, 122 (1967).

14. Giddings, J. C., Sep. Sci. 4, 181 (1969).

15. Virtanen, R., and Kivalo, P., Suomen Kemistilehti B, 182 (1969).

16. Everaerts, F. M., and Horing - Keulemans, W., Sci. Tools 1, 25 (1970).

17. Arlinger, L., and Routs, R. J., Sci. Tools 17, 21 (1970).

18. Verheggen, Th. P. E. M., van Ballegooijen, E. C., Massen, C. H., and Everaerts, F. M., J. Cromatogr. 64, 185 (1972).

19. Mikkers, F. P. Everaerts, F. M., and Verheggen, Th. P. E. M., *J. Chromatogr* **169**, 11 (1979).

20. Jorgenson, J. W., and Lukcas, K. D., Anal. Chem. 53, 1298 (1981).

21. Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya A., and Ando, T., Anal. Chem. 56, 111 (1984).

22. Browlee, R. G., and Compton, S. W., American Biotechnology 6, 10 (1988).

23. Handbook of Laboratory Safety, 2nd Edition, p. 521, Norman e. Steere ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1971.

24.US Patent 4,909,919.

25. Handbook of Chemistry and Physics, 66th Edition, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, (1985).

26. Jones, W. R., and Jandik, P., J. Chromatogr. 546, 445 (1991).

27. Adamson, A. W., A Texbook of Physical Chemistry, Academic Press, New York, NY, (1973).

28. Pennino, D. J., BioPharm September (1989), p. 41.

29. Grossman, P. D., Colburn, J. C., and Lauer, H. H., Analytical Biochemistry 179, 28 (1989).

30. Daignault, L. G., Rillema, D. P., and Jackman, D. C., HRC 14, 293 (1990).

31. Grossman, P. D., Colburn, J. C., Lauer, H. H., Nielsen, R. G., Riggin, R. M., Sittampalam, G. S., and Rickard, E. C., *Anal. Chem.* 61, 1186 (1990).

32.Ibáñez Mengual, J. A., *Fundamentos de los Procesos de Transporte y Separación en Membranas*, en Cap. 2 de la serie Procesos de Separación y Transporte en Membranas (Vol. I), Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia (1989).

33. Hunter, R. J., Zeta Potential in Colloid Science, Academic Press, New York, (1973).

34. Shaw, D. J., Electrophoresis, Academic Press. New York, (1969).

35. Smoluchowski, M. v., Physik. Z. 6, 530 (1905).

36. Unger, K. K., Porous Silica, J. Chromatogr. Library, Vol. 16, Elsevier Co. Amnsterdam, (1979).

37. Hair, M. L., and Hertl, W., J. Phys. Chem. 74, 91 (1970).

38. Lambert, W. J., and Middleton, D. L., Anal. Chem. 62, 1585 (1990).

39. Jandik, P., and Bonn, G., *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*, VCH Publishers, Inc., New York (1993).

40. Reijenga, J. C., Aben, G. V. A., Verheggen, Th. P. E. M., and Everaerts, F. M., J. Chromatogr. 260, 241 (1983).

41. Tsuda, T., Nomura, K., and Nakagawa, G., J. Chromatogr. 264, 385 (1983).

42.Huang, X., Luckey, J. A., Gordon, M. J., and Zare, R. N., Anal. Chem. 61, 766 (1989).

43. Altria, K. D., and Simpson, C. F., Chromatographia 24, 527 (1987).

44. Mukerjee, P., and Mysels, K. J., Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems, National Bureau of Standards (U.S.), Washington D.C., (1971).

45. Chen, M., and Cassidy, R. M., J. Chromatogr. 602, 227 (1992).

46. Hjerten, S., J. Chromatogr. 347, 191 (1985).

47. Jandik, P., Jones, W. R., Weston, A., and Brown, P. R., LC GC 9, 634 (1991).

2.98 CARACTERIZACION, EVALUACION Y OPTIMIZACION DE UNA PLANTA EDR

48. Gebauer, P., Demi, M., Bocek, P., and Janak, J., J. Chromatogr. 267, 455 (1983).

49. Foret, F., Fanali, S., Nardi, A., and Bocek, P., Electrophoresis 11, 780 (1990).

50. Skoog, D. A., and West, D. M., *Principles of Instrumental Analysis*, Holt, Rinehart and Winston, New York, (1971).

51. Giddings, J. C., Separation Science 4, 181 (1969).

52. Wadsworth, H. M., Statistical Methods for Engineers and Scientists, McGraw - Hill Publishing Company, New York, (1990).

53. Jorgenson, J. W., and Lukacs, K. D., Anal. Chem. 53, 1298 (1981).

54.Littlewood, A. B., Gas Chromatography, Academic Press, New York (1970).

55. Fahien, R. W., Fundamental of Transport Phenomena, McGraw Hill, New York (1983).

56.Maisel, L., Probability, Statistics, and Random Processes, Simon and Schuster, New York (1971).

57. Knox, J. H., Chromatographia, 26, 329 (1989).

58. Grushka, E., and McCormick, R. M., J. Chromatogr. 471, 421 (1989).

59. Hjerten, S., *Electrophoresis*, 11, 655 (1990).

60. Jones, W. R., and Jandik, P., Amer. Lab. 22, 51 (1990).

61. Burgi, D. S., and Chien, R. L., J. Microcol, Sep. 3, 199 (1991).

62. Chien, R. L., Anal. Chem. 63, 2866 (1991).

63. Rose, D. J. and Jorgenson, J. W., Anal. Chem. 60, 624 (1988).

64. Otsuka, K., and Terabe, S., J. Chromatog. 480, 91 (1989).

65. Dose, E. V., and Guichon, G., Anal. Chem. 64, 123 (1992).

66. Jandik, P., Haddad, P. R., and Sturrock, P., CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 20, 13 (1988).

67. Chien, R. L., and Burgi, D. S., J. Chromatogr, 559, 141 (1991).

68. Everaerts, F. M., Beckers, J. L., and Verheggen, Th. P. E. M., *Isotachophoresis*. Elsevier, Amsterdam (1976).

69. Bocek, P., Top. Curr. Chem. 95, 131 (1981).

70. Jandik, P., and Jones, W. R., J. Chromatogr. 546, 431 (1991).

71. Dolnick, V., Delm, M., and Bocek, P., J. Chromatogr. 320, 89 (1985).

72.CS ITP Analyzer, VVZ PJT, Spisska Nova Ves, Czechoslovakia (1988).

73. Kanianski, D., and Marak, J., J. Chromatogr. 498, 191 (1990).

74. Merion, M., Aebersold, R. H., and Fuch, M., Poster Presentation, HPCE '91, San Diego (1991).

75. Swartz, M., and Merion, M., Poster Presentation, HPCE '92, Amsterdam (1992).

76. Jansson, M., Emmer, A., and Roeraade, J., HRC 12, 797 (1989).

77. Tsuda, T., Sweedler, J. W., and Zare, R. N., Anal. Chem. 62, 2149 (1990).

78. Lux J. A., Haeusig, U., and Schomburg, G., HRC 13, 374 (1990).

79. Burgess, C. and Knowles A., eds., Standards in Absorbance Spectroscopy, Chapman and Hall, London (1991).

80. Foret, F., Delm M., Kahle, V., and Bocek, P., Electrophoresis 7, 430 (1986).

81. Hjerten S., Elenbring K., Kilar F., Liao J. L., Chen, A. J. C., Siebert, C., and Zhu, M.D., J. Chromatogr. 403, 47 (1987).

82. Yeung, E. S., Acc. Chem. Res. 22, 125 (1989).

83. Nielsen, M. W. F., J. Chromatogr. 588, 321 (1991).

84. Moring, S. E., *Quantitative Aspects of Capillary Electrophoresis Analysis*, Cap 3, en Capillary Electrophoresis Theory and Practice, Paul D. Grossman and Joel C. Colburn, eds., Academic Press, Inc., (1992).

85.Dyson, N., in *Chromatographic Integrations Methods*, pp. 20 - 25, Roger M. Smith, ed., RSC Chromatography Monographs, Royal Society of Chemistry, England, (1990).

86. Albin, M., Weinberger, R., Sapp, E., and Moring, S. E. Anal. Chem. 63, 417 - 422 (1991).

87. Moring, S . E ., Colburn, J . C ., Grossman, P . D ., and Laurer, H . H . LC / GC 8(1), 34 - 36 (1990).

88. Matthew, D. E., and Hayes, J. M. Anal. Chem. 48(9), 1375 - 1382 (1976).

89.Katz, E., *Quantitative Analysis Using Chromatographic Techniques*, R. Scott, C. Simpson, and K. Ogan, eds., Wiley, New York (1987).

90.Rosi, D. T. J. Chromatogr. Sci. 26, 101 (1988).

91. Terabe, S., Otsuka, K., and Ando, T. Anal. Chem. 57, 834 (1985).

92. Grossman, P. D., Lauer, H. H., Moring, S. E., Mead, D. E., and Oldham, M. F., Nickel, J. H., Goudber, J. R. P., Krever A., Ramsom, D. H., and Colburn, J. C., *ABL*. 8, 35 (1990).

93. Ackermans, M. T., Everaerts, F. M. and Beckers, J. L., J. Chromatogr. 549, 345 (1991).

94. Beckers, J. L., Everaerts, F. M. and Ackermans, M. T., J. Chromatogr. 537, 407 (1991).

95. Lee, T. T. and Yeung, S., Anal. Chem. 63, 2842 (1991).

96. Buchberger, W. and Haddad, P. R., J. Chromatogr. 608, 59 (1992).

97. Beckers, J. L., Verheggen, Th. P. E. M. and Everaerts, F. M., J. Chromatogr. 452, 591 (1988).

98. Nardi, A., Fanali, S. and Foret, F., Electrophoresis 11, 774 (1990).

99. Weston, A., Brown, P. R., Jandik, P., Jones W. R. and Heckenberg, A. L., J. Chromatogr. 593, 289 (1992).

100.Beck, W. and Engelhardt, H., Chromatographia 33, 313 (1992).

Apéndice 3

ASPECTOS ECONOMICOS EN PROCESOS ED

SUMARIO: 3.1.Factores Económicos en los Procesos ED. 3.2.Análisis de Costes.

3.1. FACTORES ECONOMICOS EN LOS PROCESOS ED

La elección de un proceso de membrana u otro para una separación dada, se basa por completo en consideraciones de tipo económico. ¿ Qué factores determinan la economía de un proceso ?. No existe una respuesta totalmente clara; de hecho los costes tienen que calcularse para cada problema de separación en concreto y por ello las consideraciones que veremos aquí son generales.

Así, por ejemplo, para el tratamiento de aguas residuales, la economía ED es mas favorable en el caso de aguas de alimentación con contenido en sólidos totales disueltos (STD) no muy alto. Como el rechazo de sales varía entre un 45 a 55% por etapa, una alimentación con alta salinidad necesitará un número elevado de etapas sucesivas para la producción de un agua purificada con un contenido en STD bajo, con el consiguiente incremento de costes.

Además de la naturaleza del agua de la alimentación y del grado de desalación deseado, existe otra característica importante en un estudio económico, tal cual es el tamaño de la planta. Para plantas de gran capacidad podemos hacer las siguientes consideraciones económicas:

1ª) El número de pilas disminuye empleando membranas de mayor área.

2^a) En una pila se pueden incorporar varias etapas.

3^a) Una sola bomba puede alimentar a varias etapas en serie.

4^a) Un sólo panel de control puede servir a un número de pilas que comprendan un bloque único de producción.

Para el caso de plantas extremadamente grandes, es ventajoso tener una cantidad de bloques de producción independientes, cada uno provisto de sus bombas, rectificadores y paneles de control. Esto permite flexibilidad en la transformación de la planta, y aislamiento de los bancos de membranas para limpieza y reemplazo de las mismas. Consecuentemente el coste de planta por unidad de producto se estabiliza conforme aumenta el tamaño de la planta.

En general el coste de una instalación dada viene determinado por dos contribuciones: los costes de inversión y los costes de operación y mantenimiento [Larson-1979 y Glueckstern-1984].

3.1.1 Costes de Inversión

Los costes de inversión en la instalación se pueden dividir en tres partes:

- a) Módulos de membranas
- b) Coste de tuberías, bombas, electrónica y depósitos

c) Pretratamiento y postratamiento

En orden a calcular el precio por litro, m³ o Kg de producto, los costes de inversión se contemplan durante un período finito, generalmente de 10 años, amortizándose el interés de capital durante el mismo.

3.1.2 Costes de Operación y Mantenimiento

Los costes de operación y mantenimiento de la instalación se pueden dividir en cuatro partes:

a) Consumo de potencia

En ED se separan las sales del agua y en este proceso se emplea C.C. procedente de un rectificador que opera usualmente con una eficiencia elevada. Como los iones de la disolución transportan la mayor cantidad de corriente eléctrica, la potencia requerida es directamente proporcional a la sal eliminada.

b) Operación de Planta

Las plantas ED, tienen varias partidas que requieren el esfuerzo de uno o más operarios:

1) Preparación de disoluciones ácidas e inhibidoras de precipitación, cuando sean necesarias.

2) Preparación de las disoluciones de limpieza y verificación de dicho proceso mientras este en funcionamiento la planta.

3) Detección y localización de fallos en las celdas electrodialíticas.

4) Desmontaje de la pila para el reemplazo de membranas, espaciadores y juntas defectuosas.

5) Limpieza manual de las membranas cuando sea necesario.

6) Análisis químico del agua producto.

Además de estas partidas se debe incluir el trabajo empleado en el mantenimiento y reparación de tuberías y bombas.

Conforme aumenta el tamaño de la planta disminuyen los costes de operación y mantenimiento. Se debe hacer notar que estos costes asumen un pretratamiento adecuado del agua de alimentación y una correcta operación de la planta ED, lo contrario acarrearía un aumento drástico de los mismos.

c) Mantenimiento de materiales

El mantenimiento de las bombas es una partida importante. Las presiones liberadas por el fluido circulante y las bombas de alimentación son de 90 psig o menores, si bien, el suministro no es severo, la alimentación es corrosiva y se requiere un reemplazo de los impulsores, sellos, soportes y contenedores de las bombas de alimentación y recirculación.

Una partida corriente y que no suele tenerse en cuenta, es el recambio de los cartuchos de los filtros. Su frecuencia de cambio viene determinada por las características y composición química del agua de alimentación, así como por la bondad de su pretratamiento. Puede variar desde una vez cada dos semanas hasta tres o cuatro veces al año.

Un tercer componente es el coste de los limpiadores químicos. Aún con un buen pretratamiento, según el caso, puede ser necesario efectuar una limpieza en marcha cada dos o cuatro semanas.

d) Recambio de membranas

Como su deterioro no es uniforme, de la experiencia se puede extraer la conclusión de que como norma de seguridad se puede estimar un recambio de membranas de entre un 10 a un 14% del total por año. La mayoría de los fallos ocurren en las membranas aniónicas. Además, las membranas próximas a los electrodos fallan con mas frecuencia debido a que la contaminación química es más severa allí, y más elevada la temperatura, y consecuentemente puede ser necesario reemplazarlas con una frecuencia de 8 a 12 meses. Durante el recambio de las membranas, también se cambiarán los espaciadores y juntas defectuosos, cuyo deterioro se estima en un 5% anual. Además, los electrodos de la pila ED requieren un recubrimiento una vez cada cinco años.

3.2. ANALISIS DE COSTES

A través de la función de producción relacionamos los factores de producción ("*inputs*") con las unidades de producto ("*outputs*").



La eficiencia de una planta (o de una empresa en general), tanto desde un punto de vista técnico como económico, vendrá medida por el volumen de "*outputs*" que se pueden alcanzar para un volumen determinado de "*inputs*".

Podemos definir una *función de producción* Q, para un determinado producto X, como dependiente de las cantidades $(q_1, q_2, ..., q_n)$ de cada uno de los factores de producción $(x_1, x_2, ..., x_n)$ empleados:

$$Q = f(q_1, q_2, ..., q_n)$$

donde Q representa la cantidad obtenida del producto X.

En otras palabras, la cantidad de producto (nivel de producción) se ve afectada por las cantidades de los recursos empleados, así como por su combinación. En el caso que nos ocupa, la cantidad de agua desalada (producto) será función de la energía utilizable, precio de las membranas, duración de las mismas, etc.

Definiremos tres conceptos básicos relativos a la productividad de un factor x:

a) *Productividad Total*: Es la cantidad de producto que se puede obtener aumentando arbitrariamente dicho factor, manteniendo los otros factores constantes.

b) *Productividad Media*: Es el cociente entre la productividad total y la cantidad empleada de dicho factor.

c) *Productividad Marginal*: Es el incremento de producto obtenido al incrementar en una unidad dicho factor: (dQ/dx).

Así pues, la *función de costes* de una unidad económica va a depender de la *función de producción* y del precio de los factores de producción.

También se debe distinguir entre el gasto, que es la expresión monetaria de la adquisición de bienes y servicios por parte de la unidad económica, y el coste, que es el gasto consumido en la actividad productiva. El gasto que se consume en más de un período temporal se llama *inversión*. Por ejemplo, si se adquieren 200 membranas a 100.000 pesetas por membrana, el gasto sería de 20.000.000 de pesetas; si el proceso productivo consume 10 membranas, el coste por membrana para ese nivel de producto es de 1.000.000 de pesetas.

Se tiene entonces, que el *coste total* C_T (Q), para una determinada cantidad de producto es la suma de los *costes fijos* (C_F) más los *costes variables* (C_V (Q))

$$C_{T}(Q) = C_{V}(Q) + C_{F}$$

donde C_F , no depende de la producción, y C_V (Q), es función del volumen de producción, pudiendo ser esta dependencia proporcional, progresiva o regresiva.

Si consideramos una función de costes, como la que se ilustra en la parte A de la Figura 1, en la que se representa el coste total de producción (C_T) frente al nivel de producción (X), puede apreciarse que la curva es siempre creciente (dC_T/dX > 0), y que presenta dos tramos típicos: uno cóncavo (d²C_T/dX² < 0) hasta X₁ (que comprende a un punto de inflexión con pendiente positiva), y otro convexo (d²C_T/dX² > 0), a partir de éste punto, y dividido en dos subtramos, el primero hasta X₃, y donde dC_T/dX < 1, y el segundo a partir de él, con dC_T/dX > 1. Hasta el nivel de producción correspondiente a X₁ se obtienen rendimientos crecientes, ya que debido a la concavidad de la curva, cualquier incremento de producción supone un menor incremento de los costes, por lo que el coste de una unidad de producto es cada vez menor. Entre X₁ y X₃, el aumento de producción supone un mayor aumento de costes, hasta X₃, (dC_T/dX = 1), a partir del cual el aumento de producción deja de ser rentable. En éste punto, para el caso considerado, el valor de la producción y de los costes son iguales (C_T = X).

Se define el *Coste Total Unitario* (C_{TU}), como el cociente entre el coste total y el número de unidades producidas. Este coste es decreciente hasta una producción $Q_3 = X_3/v$, siendo v el precio unitario del producto, En efecto:

$$C_{TU} = \frac{C_T}{Q} = v \frac{C_T}{x} \Rightarrow \text{ condición de extremo} :$$

$$\frac{dC_{TU}}{dQ} = 0 = -\frac{1}{Q^2}C_T + \frac{1}{Q}\frac{dC_T}{dQ} \Rightarrow \frac{dC_T}{dQ} = \frac{C_T}{Q}$$

lo que únicamente ocurre en Q₃, i.e. el punto donde $dC_T/dX = 1 \Rightarrow C_T = X \Rightarrow C_T/Q = v$, y cuyo carácter de extremo se evidencia recurriendo a la derivada segunda

$$\frac{d^2 C_{TU}}{dQ^2} = \frac{2}{Q^3} C_T - \frac{2}{Q^2} \frac{dC_T}{dQ} + \frac{1}{Q} \frac{d^2 C_T}{dQ^2} = \frac{1}{Q} \frac{d^2 C_T}{dQ^2} > 0$$



Se definen además, los siguientes tipos de costes:

a) *Coste Fijo Unitario* (C_{FU}): cociente entre el coste fijo y el número de unidades producidas.

b) Coste Variable Unitario (C_{VU}): cociente entre el coste variable y el número de unidades producidas. En cualquier caso, $C_{TU} = C_{FU} + C_{VU}$.

c) Coste Marginal (C_{MG}): el incremento del coste total debido al incremento de la producción en una unidad: (dC_T/dQ) = v (dC_T/dx) que vale v para Q₃.

Todos los tipos anteriores de costes, aparecen representados en la parte B de la Figura 1. Como puede apreciarse, en el nivel de producción Q₃, se tiene que el coste marginal C_{MG} es igual al coste total unitario C_{TU} .

Una vez determinado el mínimo de los costes, es preciso establecer el **óptimo** económico, es decir, el nivel de producción que maximiza la utilidad (obtención del mayor beneficio posible).



Contemplamos dos funciones típicas, una de producción y otra de costes, como las indicadas en la parte A de la Figura 2, en donde observamos que existe un punto X^* en donde la recta tangente a la Función de Costes es paralela a la Función de Producción, y dos puntos, X' y X'', en donde se cortan las dos funciones.

En la parte B de la Figura 2, se reflejan, la producción donde el coste total es mínimo (punto C), intersección de las funciones C_{MG} y C_{TU} (que coincide con el mínimo de C_{TU}), la producción óptima Q^{*}, que corresponde al punto A (punto de corte de las funciones C_{MG} e Ingreso Marginal), y los puntos Q' y Q'' en donde el nivel de beneficios es nulo. Como el *nivel de ingresos* en el óptimo económico viene determinado por el producto entre el número de unidades producidas y el precio v, de las unidades vendidas (lo cual corresponde al área delimitada por la función de ingreso marginal, la ordenada en el punto A para el nivel de producción X^{*} y los ejes coordenados), y los costes vienen determinados por el producto entre el número de unidades producidas y el coste de las mismas (área determinada por el punto B de la función C_{TU} para el nivel de producción X^{*}), el beneficio para el nivel de producción X^{*}, será el área rayada, diferencia entre las áreas determinadas para costes e ingresos.

Apliquemos, ahora, lo anteriormente expuesto al caso concreto de la ED.

El Coste Total de Operación para un determinado nivel de producción de un proceso ED se puede considerar como la suma de los Costes Fijos y de los Costes Variables de la misma.

Los Costes Fijos (C_F) son los costes que tiene la instalación por sí misma, es decir, esté o no en funcionamiento. Por tanto no dependen de las unidades producidas (la cantidad de m³ de agua producto). Dentro de esta partida se engloban, los mínimos de los suministros de la industria (electricidad, agua, etc.), los impuestos locales, el mantenimiento, etc, que son independientes de la densidad de corriente.

Los Costes Variables, varían en función de la producción. En este caso, unos son directamente proporcionales a las unidades de producto, como por ejemplo la *Energía* consumida en la operación de planta (C_E). Si producimos más, ello implica consumir más energía. Otros son inversamente proporcionales a las unidades producidas, por ejemplo, la Amortización y el Reemplazo de Membranas.

La Amortización (C_A) es el proceso de recuperación parcial del valor de los activos fijos mediante una imputación a los costes productivos (se trata en realidad de un artificio contable), y la *Base* es el coste total de la instalación, que es el de la "puesta en marcha". La cifra que se incorpora como amortización al proceso productivo, o dotación anual a la amortización, puede ser el resultado de:

a) La elaboración de un plan individualizado de amortización. En función de la vida útil, se calcula para un determinado intervalo de producción (es decir de uso), el importe que representa su depreciación.

b) La aplicación de tablas que objetivamente son fijadas por la Administración y que indican los coeficientes a aplicar para el cálculo de la cifra anual a dotar.

El objetivo fundamental del proceso de amortización es conseguir la recuperación financiera de la inversión, que permita su renovación, es decir que se produzca un excedente monetario que libere el capital invertido. Así por ejemplo, para una inversión de 100 millones de pesetas, si se dota anualmente un coeficiente de amortización lineal igual al 10% anual, tendremos que cada año generamos un excedente de 10 millones de pesetas, que al cabo de 10 años nos permitiría reponer el activo de la inversión inicial.

Para el *Reemplazo de Membranas* (C_M), en donde la variable fija es el tiempo ya que tienen un tiempo límite de duración: a más cantidad de producto menos coste se incorpora. Por ejemplo, si las membranas de la instalación valen 10 millones de pesetas y duran 10 años, si linealmente se distribuye el gasto en esos 10 años, se tendrá un coste a incorporar de 1 millón de pesetas / año. Entonces si se producen 10.000 m³, el coste de esta variable de membranas sería de 100 pts/m³; si se produjesen 100.000 m³, el coste sería de 10 pts/m³ etc.

La suma de todos estos costes es el Coste Total (C_T). Así se tendrá que para los casos considerados:

$$\mathbf{C}_{\mathrm{T}} = \mathbf{C}_{\mathrm{F}} + \mathbf{C}_{\mathrm{E}} + \mathbf{C}_{\mathrm{A}} + \mathbf{C}_{\mathrm{M}}$$

En una instalación ED la producción corresponde a los m^3 de agua desalada obtenida, lo cual está en relación directa (ver ecuación (2.7-2)) con la densidad de corriente utilizada, siendo éste el motivo por el que se suele emplear esta magnitud como medida de producción.

Las partidas individuales que contribuyen al coste total de operación de un proceso ED se pueden dividir en tres categorías: costes que varían directamente con la densidad de corriente, como por ejemplo el coste de energía eléctrica; costes que varían inversamente con la densidad de corriente, como por ejemplo los costes de reemplazo de membranas y de amortización de capital; y costes que no varían con la densidad de

corriente, como los costes de operación y mantenimiento. La Figura.3 muestra la variación típica de estas partidas con la densidad de corriente.

El Optimo Económico de Densidad de Corriente corresponde al punto en el que el beneficio es máximo, y que puede apreciarse en la Figura 3. Observamos que existe un intervalo de densidad de corriente comprendido entre el límite inferior de densidad de corriente, que será el valor a partir del cual se puede empezar a producir con beneficios, y el óptimo económico de densidad de corriente, dentro del cual los costes de producción se mueven dentro de unos límites aceptables.



BIBLIOGRAFIA

- 1. Allison, R. P., "Surface and Wastewater Desalination by Electrodialysis Reversal", American Water Works Membrane Conference, Orlando, (1991).
- 2. Ahlgren, R. M., Electromembrane Processes for Recovery of Cosntituens from Pulping Liquors, en "Industrial Processing With Membranes", Lacey, R. E. and Loeb, S., Eds., Wiley-Interscience, New York, (1972a).
- 3. Ahlgren, R. M., Electromembrane Processing of Cheese Whey, en "Industrial Processing With Membranes", Lacey, R. E. and Loeb, S., Eds., Wiley-Interscience, New York, (1972b).
- 4. Arroyo, O. R., "Tratamiento de Agua por el Proceso de Electrodiálisis Reversible", 5º Congreso Internacional de Tratamiento de Agua, Mexico, (1985).
- 5. Bauer, B., Gerner, F. J., and Strathmann, H., "Development of Bipolar Membranes", *Desalination*, **68**(2-3):279-292, (1988).
- 6. Boudet-Dumy, M., Lindheimer, A., and Gavach, C., "Transpor Properties of Anion Exchange Membranes in Contact with Hydrochloric Acid Solutions: Membranes for Acid Recovery by Electrodialysis", J. of Membrane Science, 57(1):57-68, (1991).
- 7. Brunner, R. E., Electrodialysis, en "Saline Water Processing", Heitmann, H. G. Eds. WCH, Weinheim Alemania, (1990).
- 8. Bumgay, P. M., Lonsdale H. K., and de Pinho, M. N., "Synthetic Membranes Science, Engineering and Application", D. Riedel Pub. Co., Dordrecht, Holland, (1986).
- 9. Chen, D. H., Wang, S. S., and Huang, Y. C., J. Chem. Technol. Biotechnol., 64:284-292, (1995).
- 10. Chiapello, J. M., and Gal, J. G., "Recovery by Electrodialysis of Cyanide Electroplating Rinse Waters", J. of Membrane Science, 68(3):283-291, (1992).
- Davis, T. A., Brockman G. F., Physiochemical Aspects of Electromembrane Processes, en "Industrial Processing With Membranes", Jhon Wiley and Sons Inc., N. Y., (1979).
- 12. Díaz Peña, M., Roig Muntaner, A., Disoluciones de Electrolitos, en "Química Física" (Vol. 2), Ed: Alhambra, (1980).
- 13. Donnan, F. G., Z. Electrochem., 17,572, (1911).
- 14. Donnan, F. G., Chem. Rev., 1,73, (1924).
- 15. Donnan, F. G., and Guggenheim, E. A., "Exact Thermodynamics of Membrane Equilibrium", Z. Physik. Chemie, A162:346-360, (1932).

1

- 16. Escudier, J. L., Cottereau, R., and Moutounet, M., "Electrodialysis Applications in the Treatment of Grape Must", *Bull. O.I.V.*, **62**(695-696), 20-33, Fr.
- 17. Glueckstern, P., and Arad, N., "Economics of the Application of Membrane Processes. Part I: Desalting Brackish and Seawater" en "Synthetic Membrane Processes", Belfort, G., Ed., Academic Press, New York, (1984)
- 18. Goldman, D. E., J. Gen. Physiol., 27,37, (1943).
- 19. Helfferich, F. G., "Ion Exchange", McGraw-Hill, New York, (1962).
- 20. Hodgkiess, T., "Electrodialysis", en "European Desalination Association Seminar on Small Plant Applications for Desalination Technology", London, June 19 (1987).
- 21. Huffman, E. L., Lacey, R. E., "Engineering and Economic Considerations in Electromembrane Processing", en "Industrial Processing With Membranes", Jhon Wiley and Sons Inc., N. Y., (1979).
- 22. Ibáñez Mengual, J. A., "Fundamentos de los Procesos de Transporte y Separación en Membranas" en Cap. 2 de la serie Procesos de Separación y Transporte en Membranas (Vol. I), Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, (1989).
- 23. Ibáñez Mengual, J. A., Berná Amoros, L. M., Valerdi Peréz, R. V., "Desalación por Membranas" DM Eds., Murcia, España, (1997).
- 24. Jonsson, G., Boersen, C. E., "Polarization Phenomena in Membrane Processes", en "Synthetic Membrane Processes", Belfort, G., Ed., Academic Press, New York, (1984).
- 25. Lonsdale, H. K., J. Membrane Sci., 10: 81-181, (1981).
- 26. Lounis, A., and Gavach, C., J. Membrane Sci., 52: 332-348, (1990).
- 27. Katz, W. E., "The Electrodialysis Reversal (EDR) Process", *Desalination*, **28**:31-40, (1979).
- 28. Katz, W. E., "Desalination by ED and EDR State of the Art in 1981", *Desalination*, 42:129, (1982).
- 29. Kneifel, K. and Huttenbach, "Properties and Long-Term Behaviour of Ion-Exchange Membranes", *Desalination*, 10,383, (1980).
- Kolthof, I. M., Sandell, E. B., Meehan, E. J., Bruckenstein, S., "Principios de las Separaciones Cromatográficas. Intercambio Iónico", en "Análisis Químico Cuantitativo", Ed: Nigar S.R.L., Buenos Aires, (1979).

- 31. Korngold, E., "Present State of Technological Development of Permselective Polyethylene Membranes at the Negev Institute for Arid Zone Research", en "Water Desalination Symposium", Beersheva, Israel, (1970).
- 32. Korngold, E., "Electrodialysis Membranes and Mass Transport", en "Synthetic Membrane Processes", Belfort, G., Ed., Academic Press, New York, (1984).
- 33. Lacey, R. E., "Transport of Electrolytes Through Membrane Systems", US. Off. Saline Water Res. Dev. Rep. 343, (1967).
- 34. Lacey, R. E., Lang, E. W., "Transport of Electrolytes Through Membrane Systems", US. Off. Saline Water Res. Dev. Rep. 398, (1969).
- 35. Lacey, R. E., "Basis of Electromembrane Processes", en "Industrial Processing With Membranes", Jhon Wiley and Sons Inc., N. Y., (1979).
- 36. Lakshminarayanaiah, N., "Transport Phenomena in Artificial Membranes", Chem. Revs., 65(5):526, (1965).
- 37. Larson, T. J., and Leitner, G., "Desalting Seawater and Brackish Water: A Cost Update", *Desalination*, 30(1-3):525-539, (1979).
- 38. Leitz, F. B., "Electrodialysis for Industrial Cleanup", *Environmental Science and Technology*, **10**(2):136-139, (1976).
- 39. Leitz, F. B. and Eisenmann, J. L., "Electrodialysis as a Separation Process", AlChE Symposium Series, 77(204):204-212, (1981).
- 40. Lutin, F., Guerif, G., Herz, G., Tani, Y., "Ion Exchange Membranes: an Industrial Reality", en Proceedings of Euromembrane 95, vol. 2, p. 75, Bowen, R., Field, R. W., Howell, J. A., Eds. Bath, (1995).
- 41. Mackay, D., and Meares, P., "The Diffusion of Electrolytes in a Cation-Exchange Resin Membrane", Proc. Roy. Soc., A232:498-509, London, (1955).
- 42. Mani, K. N., "Electrodialysis Water Splitting Technology", Journal of Membrane Science, 58:117-138, (1991).
- 43. Mason, E. A. and Kirkham, T. A., "Design of Electrodialysis Equipment", en "Chemical Engineering Progress Symposium Series: Adsorption, Dialysis and Ion-Exchange", 55(24):173-189, (1959).
- 44. Meares, P., "The Nature and Properties of Ion-Exchange Membranes", en 4TH European Summer School in Membrane Science: "Ions in Membranes" Chester, September (1987).
- 45. Meller, F. H., Ed. "Electrodialysis (ED) & Electrodialysis Reversal (EDR) Technology" Ionics Incorporated, (1984).

4 CARACTERIZACION, EVALUACION Y OPTIMIZACION DE UNA PLANTA EDR

- 46. Meyer, K. H., and Sievers, J. F., "La Perméabilité des Membranes, I. Théorie de la Perméabilité Ionique", Helv. Chim. Acta, 19:649, (1936a).
- 47. Meyer, K. H., and Sievers, J. F., "La Perméabilité des Membranes, II. Essais Avec des Membranes Sélectives Artificielles", *Helv. Chim. Acta*, 19:655, (1936b).
- 48. Minz, M. S., "Electrodialysis: Principles of Process Design", Ind. Eng. Chem., 55(6):18-28, (1963).
- 49. Narebska, A., and Koter, S., "From Theory to Practice: Transport Phenomena in Working Membrane Systems", en 12TH European Summer School in Membrane Science: "Advances in Membrane Phenomena and Processes", Alicja, M., Mika, and Winnicki, Z., Eds., Gdansk-Sobrieszewo, June, (1988).
- 50. Nernst, W., Z. Phys. Chem., 2,613, (1888).
- 51. Nernst, W., Z. Phys. Chem., 4,129, (1889).
- 52. Nishiwaki, T. N., "Concentration of Electrolytes Prior to Evaporation with and Electromembrane Process", en "Industrial Processing With Membranes", Lacey, R. E. and Loeb, S., Eds., Wiley-Interscience, N. Y., (1972).
- 53. Rautenbach, R. y Albrecht, R. "Membrane Processes", Jhon Wiley and Sons Ltd. Frankfurt, (1989).
- 54. Rogers, A. N., "Design and Operation of Desalting Systems", en "Synthetic Membrane Processes", Belfort, G., Ed., Academic Press, New York, (1984a).
- 55. Rogers, A. N., "Economics of the Application of Membrane Processes", en "Synthetic Membrane Processes", Belfort, G., Ed., Academic Press, New York, (1984b).
- 56. Rubenstein, I., "Theory of Concentration Polarization Effects in Electrodialysis on Counter-Ion Selectivity of Ion-Exchange Membranes with Differing Counter-Ion Distribution Coefficients", J. Chem. Soc. Faraday Trans., 86(10):1857-1861, (1990).
- 57. Scatchard, G. J., "Ion-Exchanger Electrodes", J. Amer. Chem. Soc., 75,2883, (1953).
- 58. Schoeman, J. J., Buys, M., Schutte, I. B., and MacLeod, H., "Pilot Investigation on the Treatment of Fertilizer Manufacturing Process Effluent Using Lime and Electrodialysis Reversal", *Desalination*, 70(1-3):407-429, (1988).
- 59. Scott, K., "Membrane Separation Technology- Industrial Applications and Markets", en "Scientific and Technical Iformation", Oxford, England, (1990).

- 60. Shaffer, L. H., and Minz, M. S., "Principles of Desalination", Spiegler, K. S., Ed., Academic Press., New York, (1966).
- 61. Shaposhnik, V. A., and Kesore, K., J. Membrane Sci., 136:35-39, (1997).
- 62. Solt, G. S., Electrodialysis, en "Membrane Separation Processes", Meares, P., Ed. Elsevier, Amsterdam, (1986).
- 63. Solt, G. S., Electrodialysis, en 4TH European Summer School in Membrane Science: "Ions in Membranes" Chester, September (1987).
- 64. Sonin, A. A., and Probstein, R. F., "A Hidrodynamic Theory of Desalination by Electrodialysis", *Desalination*, 5:293-329, (1968).
- 65. Soriano Costa, E., Compañ Moreno, V., "Tecnología de Membranas; Electrodiálisis y Procesos Electródicos" Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Valencia, (1989).
- 66. Standard Metods for the Examinaton of Water and Wastewater (19 th edition), a. Geemberg et al. Eds. American Public Healt Association. 1995.
- 67. Strathmann, H., Electrodialysis, en "Membrane Handbook", Winston, W. S., Ho and Kamalesk, K. S., Eds., Van Nostrand -Reinhold, New York, (1992).
- 68. Teorell, T., Proc. Soc. Exp. Biol., 33:238, (1935).
- 69. Tuwiner, S. B., "Diffusion and Membrane Technology", Reinhold Publishing Co., New York, (1962).
- 70. Urano, K., Ase, T., and Naito, Y., "Recovery of Acid from Wastewater by Electrodialysis", *Desalination*, 20:365-374, (1984).
- 71. Van Duin, P. J., "Poisoning of Electrodialysis Membranes", Proc. Fourth. Int. Symp. Fresh Water Sea, 3:253-259, (1973).
- 72. Venderbosch, H. W., Overman, L. J., "Critical pH as Major Parameter in the Formation of Calcium Carbonate", *Kema Scientific and Technical Reports*, 4(10):129-124, (1986).
- 73. Williamson, T. y 'Coker, G., 'Descripción del Proceso de Electrodesionización'', 53RD Annual Meeting International Water Conference, Pittsburgh, (1992).
- 74. Wilson, J. R., Ed. "Demineralization by Electrodialysis" Butterworths Scientific Publications, London, (1960).
- 75. Wilson, J. R., Cooke, B. A., Mandersloot, W. G. B., and Wiechers, S. G., "The Electrodialysis Process", en "*Demineralization by Electrodialysis*" Wilson, J. R., Ed. Butterworths Scientific Publications, London, (1960).

ESQUEMA ELECTRICO DE LA PLANTA E.D.

