

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

NUEVOS MÉTODOS DE ANÁLISIS EN FLUJO (F.I.A. Y
MULTICONMUTACIÓN) APLICADOS A LA
DETERMINACIÓN POR QUIMIOCUMINISCENCIA DIRECTA
DE FENOLES Y POLIFENOLES

BÁRBARA GÓMEZ-TAYLOR COROMINAS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 31 d' Octubre de 2003 davant un tribunal format per:

- Dr. D. José Luis Moreno Frigols
- Dr. D. David Vasile
- Dr. D. Juan José Baeza Baeza
- Dra. D^a. Mónica Catalá

Va ser dirigida per:

Dr. D. José Martínez Calatayud

Dr. D. José Vicente García

©Copyright: Servei de Publicacions
Bárbara Gómez-Taylor Corominas

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5894-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Química Analítica



**Nuevos métodos de análisis en flujo (F.I.A. y multiconmutación)
aplicados a la determinación por quimioluminiscencia directa
de fenoles y polifenoles**

TESIS DOCTORAL

Bárbara Gómez-Taylor Corominas

Valencia, 2003

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Química Analítica



**Nuevos métodos de análisis en flujo (F.I.A. y multiconmutación)
aplicados a la determinación por quimioluminiscencia directa
de fenoles y polifenoles**

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Farmacia,
presenta la Licenciada
BÁRBARA GÓMEZ-TAYLOR COROMINAS

Valencia, abril de 2003

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

D. *José Martínez Calatayud*, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia, D. *Luis Lahuerta Zamora*, Profesor Titular y Director del Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad Cardenal Herrera-CEU y D. *José Vicente García Mateo* Profesor Titular del Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad Cardenal Herrera-CEU.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, cuyo título es:

“Nuevos métodos de análisis en flujo (F.I.A. y multiconmutación) aplicados a la determinación por quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles”

constituye la tesis doctoral de Bárbara Gómez-Taylor Corominas.

Así mismo certifican haber dirigido y supervisado tanto los diferentes aspectos del trabajo de investigación como la redacción de la presente memoria.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente en Burjassot, en abril de 2003.

Fdo.: José Martínez Calatayud

Fdo.: José Vicente García Mateo

Fdo.: Luis Lahuerta Zamora

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a la Fundación “ San Pablo CEU” por la concesión de una Beca para la Formación del Profesorado que me ha hecho posible llevar a cabo la presente Tesis Doctoral.

De modo muy especial expresar mi agradecimiento a mis directores, el Dr. José Martínez Calatayud, el Dr. Luis Lahuerta Zamora y el Dr. José Vicente García Mateo por su eficaz dirección, su continua disponibilidad, por las enseñanzas recibidas y por la enorme paciencia que han demostrado tener durante todos estos años, para atender a cualquier duda surgida, desde los primeros momentos en mi andadura en el mundo del análisis por inyección en flujo hasta la realización de esta memoria.

También quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. José Martínez Calatayud por haberme permitido trabajar en el laboratorio nueve de Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia, en aquellos momentos donde todo parecía que iba en mi contra, por saber escucharme y por los valiosos consejos recibidos de él, tanto en el ámbito de la investigación como en lo personal.

Al Dr. Gerardo Manuel Antón, por su dedicación y colaboración en la realización de los estudios de Conectividad Molecular. A la Dra. Mónica Catalá Icardo, por su amistad, la gran paciencia mostrada conmigo en todo momento y por su inestimable ayuda en mis comienzos con la multiconmutación.

Quisiera expresar mi gratitud a todos mis compañeros con los que durante tantas horas de trabajo he compartido las alegrías y las frustraciones de la investigación.

Agradecer de forma muy especial a M^a Carmen por guiarme en los primeros pasos del trabajo experimental y por la confianza que muchas veces ha depositado en mí. A Ana y Beatriz que empezaron al mismo tiempo que yo como becarias en el C.E.U. y que durante estos años hemos cultivado una gran amistad. A M^a José y Ángela por haberme escuchado en todo momento y el interés mostrado hacia mí. A José Antonio, por poner a su disposición sus conocimientos y por su ayuda prestada en todo momento para solucionar cualquier duda técnica o química. A Bernat pese aunque por circunstancias no he tenido la oportunidad de trabajar durante mucho tiempo con él, hemos creado una gran amistad. A Julia, por su

confianza y a M^a Carmen por su eficacia, a Miriam y como no a Ana, Mila y Mónica por los ánimos recibidos y su amistad.

Quiero destacar las comidas de los viernes en el “Trenet” y los buenos momentos vividos con mis compañeros, que con el tiempo se han convertido en mis amigos y ahora que estoy lejos de ellos realmente los añoro.

También deseo mencionar a otras personas que he tenido la oportunidad de conocer durante mi estancia en el laboratorio nueve de la facultad de Ciencias químicas que hicieron realmente inolvidables esos años Carmen, Ramón, Adela, Edina, Emilio, Voldan y por supuesto Mónica.

Agradecer todas las ayudas recibidas por Eugenia, Pedro, Vicente en mis preguntas sobre química orgánica.

Igualmente expresar mi agradecimiento a Nuria, Antonio, José Luis Moreno, Fermín, Vicente, Julio, Antonio Nuñez y a todos aquellos de los que tuve la oportunidad de recibir sus conocimientos durante mis estudios en la licenciatura de Farmacia y que por circunstancias especiales he mantenido una relación muy personal más allá del ámbito docente.

Muchísimas gracias a Alfredo y a mi familia por soportarme durante todos estos años, estoy segura que sin ellos no hubiera finalizado este trabajo. Me faltan palabras para expresar lo mucho que les agradezco el esfuerzo que han tenido que hacer para escuchar cada uno de los problemas que he tenido durante la realización de la presente Tesis Doctoral. Y como no gracias por quererme tanto.

Agradecer a todos mis amigos el interés mostrado por mi trabajo, los ánimos recibidos en todo momento y su amistad.

A Alfredo

*A mis padres
y mis hermanos*

ÍNDICE

Capítulo primero

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. INTRODUCCIÓN	3
1.2. SISTEMAS HETEROGÉNEOS SÓLIDO-LÍQUIDO:	
REACTORES EN FASE SÓLIDA	6
1.2.1. Ventajas del uso de reactores en fase sólida.....	7
1.2.2. Condiciones del reactivo inmovilizado y del soporte de inmovilización.....	9
1.2.3. Función analítica del reactor en fase sólida y su ubicación en el montaje F.I.A.	10
1.2.4. Estrategias para la inmovilización de reactivos en un reactor en fase sólida.....	12
1.2.5. Funciones del reactor en fase sólida.....	15
1.2.6. Reactores en fase sólida sin reacción química. Preconcentración.....	16
1.3. NUEVAS ESTRATEGIAS: ANÁLISIS EN FLUJO POR MULTICONMUTACIÓN	21
1.3.1. Limitaciones de la válvula rotatoria de seis puertos	22
1.3.2. Multiconmutación.....	23
1.3.2.1. Válvula solenoide de tres puertos.....	24
1.3.2.2. Perfil de inserción en multiconmutación.....	26
1.3.3. Ventajas y desventajas de la multiconmutación frente a F.I.A.	27
1.3.4. Modalidades F.I.A. y multiconmutación.....	30

1.3.4.1. Imitación del modo de inserción en F.I.A. con multiconmutación.....	31
1.3.4.2. Determinación multiparamétrica basada en la eficiente discriminación de la muestra en el portador o en la corriente portador-reactivo.....	32
1.3.5. Aplicaciones analíticas.....	37
1.4. COMBINACIÓN F.I.A.-QUIMIOLUMINISCENCIA APLICADA A LOS ANÁLISIS FARMACÉUTICOS.....	41
1.4.1. Consideraciones básicas. Aplicaciones analíticas.....	46
1.4.1.1. Sistemas básicos de quimioluminiscencia.....	48
1.4.1.1.1. Sistemas químicos no biológicos.....	49
a) <i>Imidazoles</i>	49
b) <i>Acilhidrazinas</i>	50
c) <i>Sales de acridinio</i>	54
d) <i>Ésteres de oxalato</i>	55
e) <i>Tris (2,2'-bipiridina) Rutenio (II)</i>	57
1.4.1.1.2. Sistemas químicos biológicos.....	60
1.4.1.1.3. Electro y fotoluminiscencia.....	61
1.4.1.2. Sistemas específicos de quimioluminiscencia.....	63
1.4.2. Aspectos operativos.....	66
1.4.2.1. Procedimientos en estático.....	67
1.4.2.2. Procedimientos en flujo continuo.....	68
1.4.2.3. Reacción muestra-reactivo.....	70
1.4.2.4. Celdas de flujo.....	71
1.4.2.5. Detectores.....	73
1.5. PREDICCIÓN DE QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA POR CONECTIVIDAD MOLECULAR.....	92
1.5.1. Conectividad molecular.....	93
1.5.1.1. La matriz topológica.....	94
1.5.1.2. Índices topológicos.....	96
1.5.2. Tratamiento informático.....	97

1.5.2.1. Obtención de índices topológicos.....	98
1.5.2.2. Obtención de las funciones discriminantes.....	98
1.5.2.2.1. Análisis lineal discriminante.....	99
1.5.2.3. Diagramas de distribución.....	100

Capítulo segundo

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO..... 103

2.1. OBJETIVOS.....	105
2.2. PLAN DE TRABAJO.....	106
2.2.1. Determinación de fenol en aguas con preconcentración por quimioluminiscencia directa.....	106
2.2.2. Determinación de ácido tánico e hidroquinona por quimioluminiscencia directa.....	108

Capítulo tercero

MATERIALES Y MÉTODOS..... 111

3.1. MATERIALES.....	113
3.1.1. Instrumentación analítica.....	113
3.1.2. Material para los montajes en flujo.....	114
3.1.3. Reactivos.....	115
3.2. MÉTODOS.....	120
3.2.1. Proceso de optimización.....	120
3.2.2. Preparación y activación del reactor en fase sólida.....	123
3.2.3. Preparación de muestras reales.....	124

Capítulo cuarto

**CONECTIVIDAD MOLECULAR APLICADA A LA
PREDICCIÓN DE QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA
DE FENOLES Y POLIFENOLES..... 127**

4.1. INTRODUCCIÓN..... 129

4.2. BARRIDO EXPERIMENTAL..... 129

4.3. CONECTIVIDAD MOLECULAR..... 131

4.3.1. Cálculo de los descriptores o índices topológicos..... 131

4.3.2. Análisis lineal discriminante..... 131

4.3.3. Predicción de la quimioluminiscencia directa de fenoles y
polifenoles por conectividad molecular..... 136

4.4. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS FENOLES
Y POLIFENOLES FRENTE AL PERMANGANATO
POTÁSICO EN MEDIO ÁCIDO..... 138

4.5. CONCLUSIONES..... 142

Capítulo quinto

**DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS CON
PRECONCENTRACIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA
DIRECTA..... 143**

INTRODUCCIÓN

5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL FENOL..... 145

5.1.1. Descripción y propiedades físicas..... 145

5.1.2. Toxicidad del fenol y efecto contaminante en las aguas..... 146

5.1.3. Legislación sobre la calidad de las aguas.....	147
5.2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS.....	149
5.2.1. Métodos cualitativos.....	149
5.2.2. Métodos cuantitativos.....	149
5.2.3. Métodos de análisis en flujo con preconcentración.....	151
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	
5.3. ESTUDIO DE LA PRECONCENTRACIÓN-SEPARACIÓN CON DETECCIÓN POR ABSORCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	155
5.3.1. Precalibrado.....	160
5.3.2. Optimización de las variables experimentales.....	161
5.3.2.1. Influencia del caudal de HCl.....	162
5.3.2.2. Influencia del caudal de NaOH.....	163
5.3.2.3. Influencia de la longitud y del diámetro interno del reactor.....	164
5.3.3. Ensayos en un nuevo montaje F.I.A.	165
5.3.3.1. Influencia del tiempo de preconcentración.....	169
5.3.3.2. Estudio del caudal de muestra.....	170
5.3.3.3. Precalibrado.....	171
5.3.3.4. Influencia del NaOH como eluyente.....	171
5.3.3.5. Estudio de la concentración del eluyente.....	172
5.3.3.6. Estudio del tiempo de elución.....	173
5.3.4. Sistema F.I.A. optimizado para la preconcentración-separación por absorción en el ultravioleta-visible.....	174
5.4. ESTUDIO DE LA REACCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE.....	176
5.4.1. Ensayos previos en flujo continuo.....	176
5.4.1.1. Estudio del sistema oxidante.....	177
5.4.1.2. Influencia del caudal.....	178

5.4.1.3. Influencia de la naturaleza del medio.....	182
5.4.1.4. Estudio de la concentración de oxidante.....	184
5.4.1.5. Precalibrado.....	185
5.4.1.6. Influencia de la temperatura.....	185
5.4.1.7. Influencia de la presencia de sensibilizadores.....	187
5.4.1.8. Reoptimización de la concentración de oxidante y del caudal.....	192
5.4.2. Ensayos en un sistema F.I.A.	195
5.4.2.1. Pruebas preliminares en un sistema F.I.A.	196
5.4.2.2. Influencia de la presencia de agentes tensoactivos.....	198
5.4.2.3. Optimización de la concentración de sensibilizador, HCOOH.....	199
5.4.3. Sistema F.I.A. optimizado para la reacción quimioluminiscente.....	200
5.5. ESTUDIO DE LA PRECONCENTRACIÓN-SEPARACIÓN CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE.....	201
5.5.1. Ensayos preliminares en el sistema F.I.A. con preconcentración y detección quimioluminiscente.....	203
5.5.1.1. Reoptimización del caudal de eluyente.....	203
5.5.1.2. Estudio de posibles montajes F.I.A.	204
5.5.2. Reoptimización de las variables experimentales.....	207
5.5.3. Sistema F.I.A. optimizado para la preconcentración- separación con detección quimioluminiscente.....	208
5.5.4. Influencia de la presencia de catalizadores metálicos.....	209
5.5.5. Estudio de la capacidad de preconcentración del reactor en fase sólida.....	213
5.6. APLICACIONES ANALÍTICAS.....	214
5.6.1. Intervalo de linealidad.....	214
5.6.2. Estudio de la repetitividad y de la frecuencia de inserción.....	215
5.6.3. Límite de detección.....	216

5.6.4. Reproducibilidad del sistema.....	216
5.6.5. Estudio de interferentes.....	217
5.6.6. Análisis de muestras reales.....	220
5.7. CONCLUSIONES.....	225

Capítulo sexto

<u>DETERMINACIÓN DE ÁCIDO TÁNICO POR QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA.....</u>	227
--	------------

INTRODUCCIÓN

6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ÁCIDO TÁNICO.....	229
6.1.1. Descripción y propiedades físicas.....	229
6.1.2. Estabilidad y degradación.....	231
6.1.3. Aplicaciones del ácido tánico.....	231
6.2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN.....	233
6.2.1. Métodos volumétricos.....	233
6.2.2. Métodos espectrofotométricos.....	234
6.2.3. Análisis por espectroscopía de absorción atómica.....	235
6.2.4. Técnicas de separación.....	236
6.2.5. Métodos electroquímicos.....	237
6.2.6. Identificación visual o cualitativa.....	238
6.2.7. Análisis por inyección en flujo, F.I.A.	239

PARTE EXPERIMENTAL

6.3. ENSAYOS PREVIOS EN FLUJO CONTINUO.....	241
6.3.1. Estudio del sistema oxidante.....	242
6.3.2. Selección del oxidante.....	242
6.3.2.1. Influencia de la concentración de oxidante.....	243
6.3.2.2. Influencia del pH del medio de reacción.....	244
6.3.3. Estudio de la influencia de la naturaleza del medio.....	246
6.3.4. Influencia de la temperatura.....	250
6.4. ENSAYOS EN UN SISTEMA F.I.A.	251
6.4.1. Pruebas preliminares en un sistema F.I.A.	251
6.4.1.1. Estudio de la naturaleza del medio de reacción y del portador.....	252
6.4.2. Optimización de las variables F.I.A.	254
6.4.3. Precalibrado.....	257
6.4.4. Influencia de la presencia de agentes tensoactivos.....	258
6.4.5. Influencia de la presencia de sustancias sensibilizadoras.....	259
6.4.6. Influencia de la temperatura.....	263
6.5. SELECCIÓN DEL MONTAJE F.I.A. ÓPTIMO.....	267
6.6. REOPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES QUÍMICAS.....	268
6.6.1. Reoptimización de la concentración de HClO_4 en el canal 3.....	269
6.6.2. Reoptimización de la concentración de KMnO_4	270
6.6.3. Reoptimización de la concentración de HClO_4 en el canal 1.....	271
6.6.4. Reoptimización de la concentración de sulfato de quinina.....	272
6.7. SISTEMA F.I.A. OPTIMIZADO.....	273
6.8. APLICACIONES ANALÍTICAS.....	274
6.8.1. Estudio del intervalo de linealidad.....	274
6.8.2. Estudio de la repetitividad y de la frecuencia de inserción.....	275
6.8.3. Límite de detección.....	276

6.8.4. Reproducibilidad.....	277
6.8.5. Estudio de la robustez química.....	277
6.8.6. Estudio de interferentes.....	279
6.8.7. Análisis de muestras reales.....	284
6.9. CONCLUSIONES.....	293

Capítulo séptimo

<u>DETERMINACIÓN DE HIDROQUINONA POR QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA.....</u>	295
--	------------

INTRODUCCIÓN

7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA HIDROQUINONA.....	297
7.1.1. Descripción y propiedades físicas.....	297
7.1.2. Estabilidad y degradación.....	298
7.1.3. Aplicaciones de la hidroquinona.....	299
7.2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN.....	300
7.2.1. Métodos volumétricos.....	300
7.2.2. Métodos espectrofotométricos.....	301
7.2.3. Técnicas de separación.....	303
7.2.4. Métodos electroquímicos.....	306
7.2.5. Análisis por inyección en flujo, F.I.A.	306

PARTE EXPERIMENTAL

7.3. ENSAYOS PREVIOS EN FLUJO CONTINUO.....	308
7.3.1. Estudio del sistema oxidante.....	309
7.3.2. Influencia de la concentración de oxidante.....	309

7.3.3. Influencia de la naturaleza del medio de reacción.....	310
7.3.4. Estudio de la concentración del medio de reacción.....	312
7.3.5. Influencia de la temperatura.....	312
7.4. ENSAYOS EN FLUJO POR MULTICONMUTACIÓN.....	314
7.4.1. Pruebas previas con multiconmutación.....	314
7.4.1.1. Simplex Modificado para el primer montaje.....	314
7.4.1.2. Simplex Modificado para el segundo montaje.....	318
7.4.1.3. Simplex Modificado para el tercer montaje.....	321
7.4.1.4. Estudio de la reproducibilidad de los montajes.....	324
7.4.1.5. Selección del montaje en flujo por multiconmutación.....	328
7.4.2. Influencia de la presencia de agentes tensoactivos.....	338
7.4.3. Influencia de la presencia de sensibilizadores.....	341
7.4.4. Estudio de la relación entre la temperatura y la velocidad de flujo.....	345
7.5. REOPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.....	346
7.6. SISTEMA EN FLUJO POR MULTICONMUTACIÓN OPTIMIZADO.....	353
7.7. APLICACIONES ANALÍTICAS.....	356
7.7.1. Intervalo de linealidad.....	356
7.7.2. Estudio de la repetitividad y frecuencia de inserción.....	357
7.7.3. Límite de detección.....	358
7.7.4. Reproducibilidad.....	359
7.7.5. Estudio de la robustez química.....	359
7.7.6. Estudio de los interferentes.....	362
7.7.7. Análisis de muestras reales.....	366
7.8. APLICACIÓN ANALÍTICA DEL SISTEMA EN FLUJO POR MULTICONMUTACIÓN A OTROS FENOLES Y POLIFENOLES.....	374
7.9. CONCLUSIONES.....	377

Capítulo séptimo

<u>CONCLUSIONES FINALES</u>	379
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	383

Capítulo primero

INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

El creciente número de controles analíticos requeridos en áreas como la salud, medio ambiente o la alimentación hace surgir la necesidad de automatización de los procesos analíticos. La automatización permite reemplazar la actividad humana en tareas tediosas e incluso peligrosas para el operador, proporcionando una mayor reproducibilidad al minimizar la influencia del factor humano, además de incrementar la velocidad de análisis, ya que hace posible la realización de un mayor número de análisis en un menor tiempo. Todo ello, junto con la disponibilidad comercial de variado instrumental y las ventajas económicas que reporta a medio y largo plazo su incorporación a la industria, son razones a las que atribuir el despegue de estas técnicas automatizadas de análisis.

De entre todas las metodologías analíticas existentes para la automatización, el análisis por Inyección en Flujo (Flow Injection Analysis, F.I.A.), ha experimentado un rápido desarrollo desde la introducción del concepto original por Ruzicka y Hansen¹ (Dinamarca) y Stewart² (E.E.U.U.) en 1975, abarcando en la actualidad casi todos los campos analíticos. Aunque resulta difícil formular una definición del F.I.A. que englobe a las diversas modalidades que del mismo han ido surgiendo desde sus comienzos^{3,4}, se podría decir que se trata de un tipo de análisis automatizado en flujo continuo, que se basa en la inserción y dispersión controlada de un volumen de disolución en una corriente continua de un portador, que lo transporta hasta el detector, donde se genera una señal transitoria en forma de pico, denominado fiagrama.

El F.I.A., en su utilización más frecuente, pertenece a los métodos cinéticos de análisis de medida a tiempo fijo, ya que normalmente no espera que la muestra insertada alcance el equilibrio físico ni químico antes de ser detectada. Esto facilita la

medida de intermedios de reacción de vida corta tales como radicales, frente a técnicas convencionales en estático, mostrándose muy eficaz también para automatizar métodos catalíticos al conseguir una gran repetitividad en la medida a un tiempo determinado.

Además de gozar de la versatilidad de los métodos en flujo continuo, esta metodología presenta dos ventajas que la hacen destacar sobre otros métodos: un diseño simple y económico, y suficiente robustez para soportar el tratamiento habitual en un laboratorio analítico de control.

Existen numerosas publicaciones dedicadas a aspectos generales del análisis por inyección en flujo⁵⁻¹⁰, o a parcelas concretas del análisis químico, tales como el área farmacéutica⁴, dado el gran número de aplicaciones que ha encontrado el F.I.A. en este campo.

Para dar una visión global de las múltiples posibilidades de esta metodología, bastaría decir que todas las operaciones necesarias efectuadas en cualquier modalidad de análisis convencional: filtración y redisolución, extracciones líquido-líquido, reacciones de formación y recogida de gases, utilización de reactivos sólidos o inmovilizados, se pueden realizar con facilidad en la modalidad F.I.A.^{11,12}, mejorando de este modo su reproducibilidad, tiempo de análisis y permitiendo el ahorro de reactivos.

Del mismo modo, esta metodología permite un amplio espectro de opciones analíticas, desde valoraciones a métodos en flujo detenido, así como el empleo de cualquier detector usual y conocido, con el único requisito que se pueda introducir la muestra en flujo.

En la Figura 1.1 se muestran los resultados de una revisión efectuada para conocer la frecuencia de utilización de diversos detectores aplicados a sistemas F.I.A. El periodo en el que se ha realizado la búsqueda comprende desde el año 1980

hasta octubre de 2002. Está se ha llevado a cabo sobre el *Analytical Abstracts* efectuando rastreos a partir de las entradas “Flow injection o F.I.A.” y los distintos detectores que se muestran en dicha Figura.

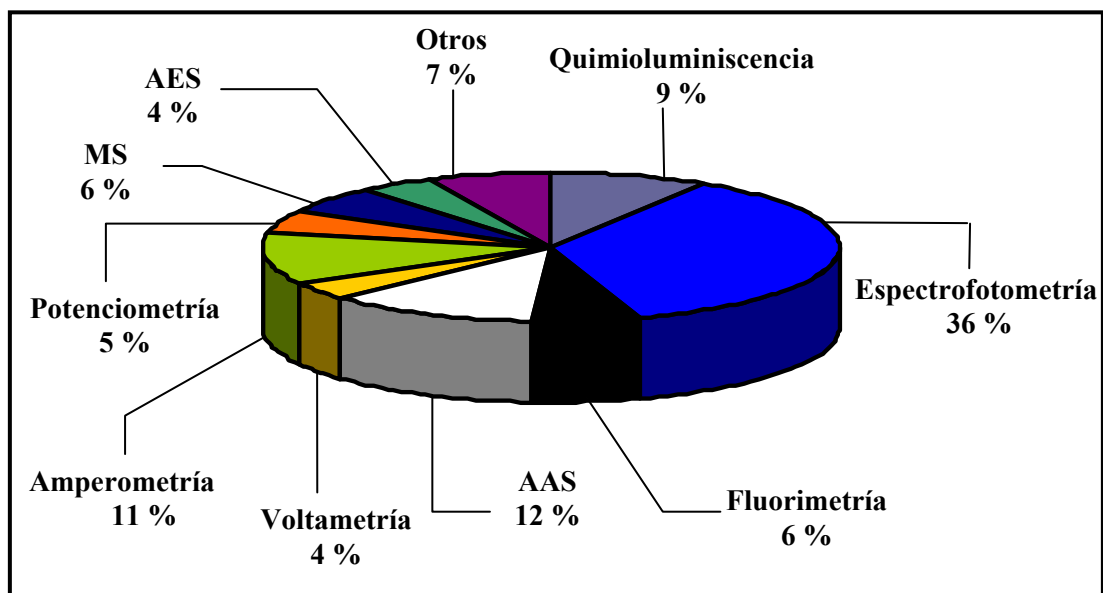


Figura 1.1: Proporción entre los tipos de detectores acoplados a los sistemas de análisis por inyección en flujo

AAS, Atomic Absorption Spectrometry: Espectrometría de Absorción Atómica.

AES, Atomic Emission Spectrometry: Espectrometría de Emisión Atómica.

MS, Mass Spectrometry: Espectrometría de Masas.

En la Figura 1.2, se comparan las proporciones de análisis sobre muestras del campo farmacéutico, biomédico, alimentario y mediambiental que emplean la técnica F.I.A. La revisión bibliográfica fue análoga a la descrita para la Figura 1.1.

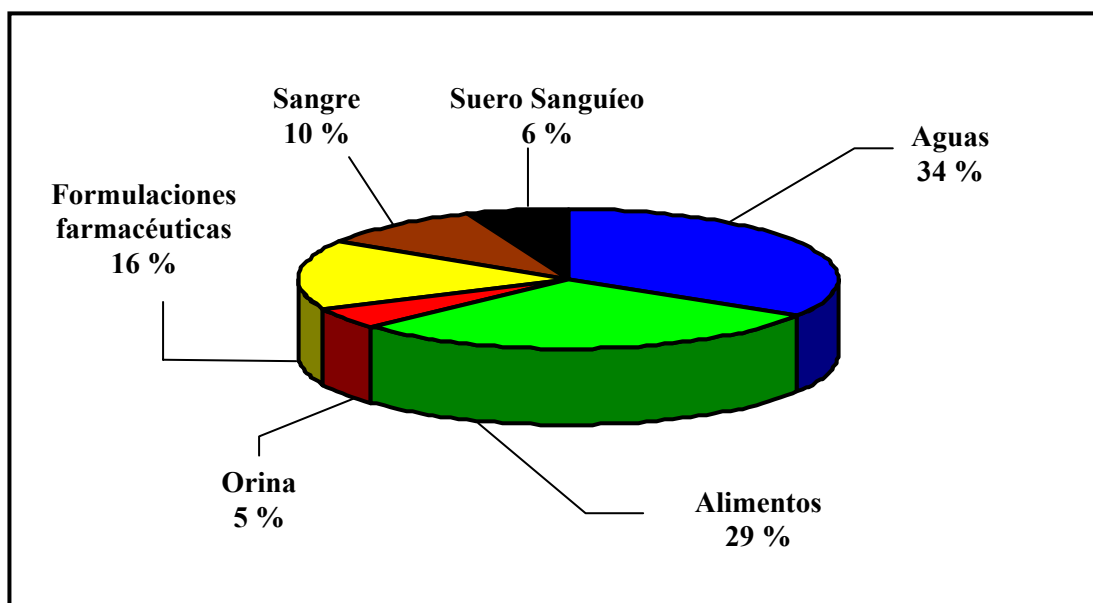


Figura 1.2: Proporción entre las muestras analizadas por inyección en flujo en las áreas farmacéutica, alimentaria, biomédica y medioambiental.

Un capítulo importante dentro de la metodología F.I.A., lo constituyen los sistemas heterogéneos sólido-líquido, y más concretamente aquellos sistemas que hacen uso de reactores en fase sólida, que supone la incorporación en alguna parte del montaje F.I.A. de reactivos sólidos o inmovilizados en un soporte sólido inerte.

1.2. SISTEMAS HETEROGÉNEOS SÓLIDO-LÍQUIDO: REACTORES EN FASE SÓLIDA EN LOS SISTEMAS F.I.A.

El análisis por inyección en flujo, permite trabajar con cualquier sistema heterogéneo: con dos fases líquidas inmiscibles, con fases sólida y líquida o combinando la fase líquida con la gaseosa, lo que demuestra la gran versatilidad alcanzada por la metodología F.I.A. La fase sólida en un sistema F.I.A. puede ser incluida como muestra en estado sólido, como producto de una reacción de precipitación o como reactivo analítico, siendo esta última estrategia la más ampliamente difundida entre los sistemas heterogéneos F.I.A.

Los reactivos sólidos se han utilizado desde la antigüedad en química analítica, tanto como los reactivos en disolución, aunque su empleo siempre ha estado restringido a unos casos concretos, como por ejemplo para oxidaciones o reducciones previas en procesos analíticos, cromatográficos y en columnas de extracción sólido-líquido. De entre las razones por las cuales su uso no se ha popularizado, destacan la incomodidad en cuanto a su manipulación y el grado de dificultad que supone controlar la reacción, al intervenir gran cantidad de factores como concentración, tiempo de contacto, estado de subdivisión, así como la existencia de reacciones laterales o parásitas no deseadas.

En el análisis en flujo continuo, la estrategia que ha despertado un gran interés en los últimos años, es el empleo de reactivos inmovilizados. Se entiende por inmovilización la utilización de reactivos confinados en un punto del sistema de flujo, de modo que a través o sobre ellos fluye el caudal muestra-portador y las reacciones tienen lugar en la interfase sólido-disolución. El confinamiento de estos reactivos se puede conseguir directamente, si se trata de productos insolubles en el medio utilizado, es lo que se suele llamar inmovilización *natural*, o si ello no es posible, se inmovilizan *anclándolos* a un soporte sólido estable, con ayuda de algún mecanismo físico o químico.

1.2.1. Ventajas del uso de reactores en fase sólida

El empleo de reactores en fase sólida presenta una serie de ventajas analíticas respecto a los sistemas homogéneos en disolución.

❖ Aumento en la sensibilidad analítica y en la velocidad de inyección, ambas derivadas de una menor dispersión sufrida por la muestra. Esta menor dispersión de la muestra se debe fundamentalmente a dos factores:

- La transferencia radial de masas en un lecho empacado es mucho más intensa y por consiguiente, la conversión en el bolo de muestra transcurre con mayor facilidad.

- La derivatización química del analito tiene lugar donde no hay dispersión de muestra, dicha conversión ocurre en la interfase sólido-disolución.

El incremento de la sensibilidad se debe también a que los reactivos están presentes en su “máxima concentración”, sin tener lugar una disolución previa de los mismos. Todo ello se traduce en un aumento de la señal analítica y en la posibilidad de incrementar el volumen de muestra en una sola inyección.

❖ Mayor selectividad cinética, fruto de la disposición del reactor en fase sólida en un lugar concreto del sistema, lo que evita el exceso de reactivos en el detector y la posible reacción del lecho con el portador u otros reactivos.

❖ Menor consumo de reactivos, aspecto especialmente importante cuando se trabaja con reactivos tóxicos o de elevado precio, como algunas enzimas.

❖ Reducción del coste de los reactivos debido a la posibilidad de reutilización del lecho o la regeneración en línea del mismo.

❖ Otro aspecto ventajoso es que se consiguen montajes F.I.A. más simples, por la reducción del número de canales, siendo muy frecuentes los sistemas monocanales o a lo sumo bicanales.

❖ Miniaturización de los montajes F.I.A., por ejemplo mediante el emplazamiento del reactor en la celda de detección bajo la modalidad optosensores o bien utilizando mini-reactores en fase sólida.

❖ Por último destacar, que la creciente popularización de la metodología F.I.A., se debe en gran medida al aumento de su versatilidad y su eficacia en operaciones de preconcentración, purificación, separación, catálisis, pretratamiento, que se pueden simplificar en línea mediante la incorporación de reactores en fase sólida en el montaje F.I.A.

1.2.2. Condiciones del reactivo inmovilizado y del soporte de inmovilización

Los reactivos inmovilizados o el lecho reactivo⁴, deben de reunir una serie de condiciones a priori para su uso en flujo continuo:

❖ Tamaño de partícula adecuado que permita el flujo de líquido libremente, para poder trabajar a bajas presiones, teniendo presente que ésta es una de las ventajas del análisis por inyección en flujo.

❖ Estabilidad mecánica al flujo continuo, con la finalidad de que no se desarrollen espacios vacíos o caminos “preferenciales” durante el uso continuado de los mismos.

❖ Cinética de reacción rápida y elevada difusión de los reactivos y de los productos, con el propósito de lograr el mayor grado de conversión posible.

❖ Evitar la adsorción de analitos, productos u otros reactivos en la superficie del lecho, con el fin de eliminar la posible contaminación entre muestras.

❖ Inercia química frente al portador o los reactivos, para garantizar un prolongado tiempo de uso del reactor.

Algunas de estas condiciones son tan exigibles al lecho reactivo como a los soportes de inmovilización de estos reactivos. A su vez, entre los soportes sólidos

más utilizados para la inmovilización de los reactivos como resinas de intercambio, sílice modificada, vidrio de tamaño de poro controlado y alúmina activada, es necesario considerar una serie de características adicionales:

- ❖ El tamaño de partícula y estructura condicionan en buena medida aspectos tales como la “concentración” del reactivo inmovilizado, ya que, ésta depende del número de centros activos donde se enlaza o retiene el reactivo.

- ❖ Buenas características de mojabilidad, debido a que el reactivo ocupa puntos en la superficie interior de los poros o cavidades superficiales de las partículas de soporte.

- ❖ Inmunidad frente a la degradación microbiana, imprescindible en aquellos sistemas para el tratamiento de muestras biológicas o para aquellos reactivos como las enzimas, que por sí mismas constituyen un caldo de cultivo.

- ❖ Compatibilidad con el sistema de detección.

Por último resaltar, que los reactivos y los soportes de inmovilización se combinan para dar lugar a una gran variedad de posibilidades analíticas.

1.2.3. Función analítica del reactor en fase sólida y su ubicación en el montaje F.I.A.

La configuración del montaje F.I.A. depende lógicamente de la finalidad analítica para la que haya sido diseñado. Por tanto, la longitud y el diámetro interno del reactor vienen condicionadas según la misión que va a desempeñar en el proceso analítico, salvo limitaciones o conveniencias de tipo operativo.

En la Figura 1.3 se reproducen posibles ubicaciones del reactor en fase sólida en el montaje F.I.A., pudiendo distinguir: **a)** pretratamiento y conversión de los reactivos; **b)** pretratamiento de las muestras; **c)** conversión del analito; **d)** combinación reactor-detector.

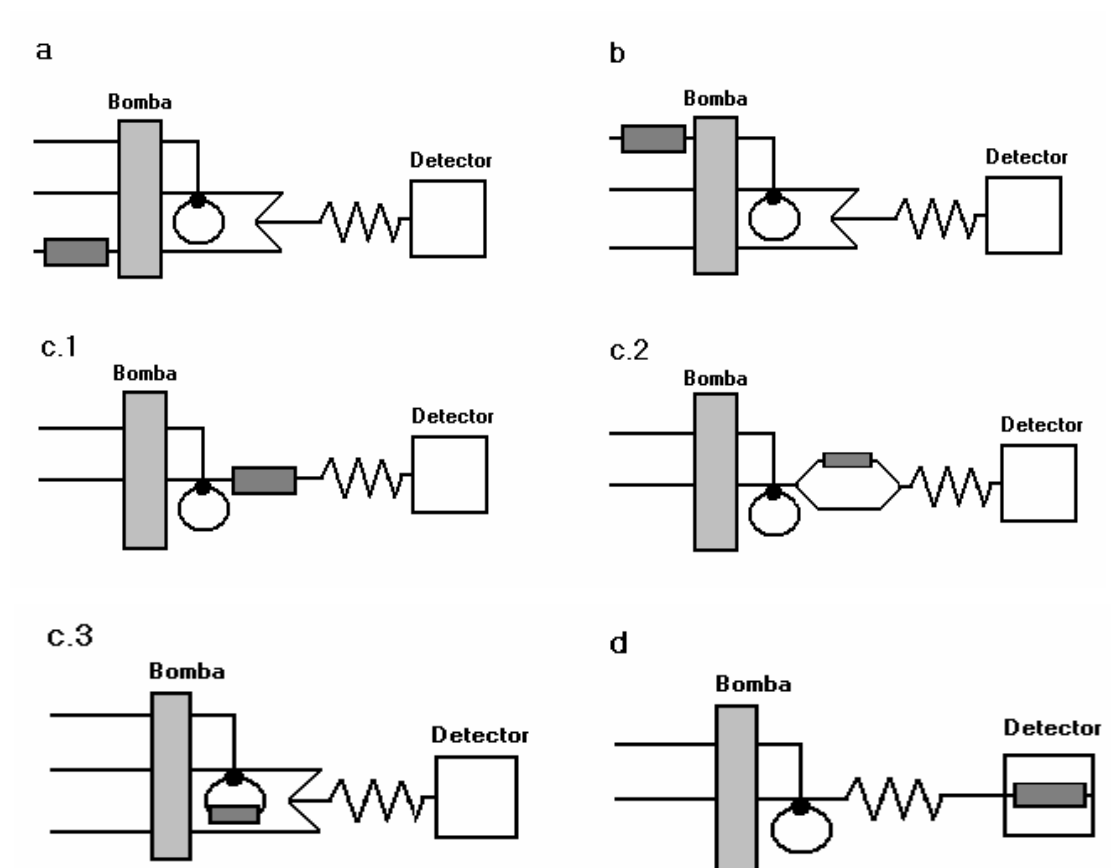


Figura 1.3: Función analítica y ubicación del reactor en fase sólida en el montaje F.I.A. **a):** Pretratamiento de los reactivos; **b):** Pretratamiento de las muestras; **c1, c2 y c3):** Conversión del analito; **d):** Combinación con el detector.

a) Pretratamiento de los reactivos: El reactor se ubica antes de la bomba peristáltica con el propósito de purificar la disolución del reactivo mediante el empleo de resinas de intercambio o adsorbentes, o para la generación “in situ” de reactivos inestables, como es el caso de reductores u oxidantes fuertes.

b) Pretratamiento de muestras: Mediante la ubicación del reactor antes de la válvula de inyección se consigue realizar una serie de tratamientos previos de la disolución de muestra, como la eliminación de interferencias, ajuste del pH, preconcentración e incluso la conversión en una pseudo-muestra que será inyectada en el montaje en lugar de la muestra original.

c) Reacciones de conversión: En la combinación c1 y c2 el reactor se encuentra entre la válvula de inyección y la celda del detector. Éstas son las posibilidades más frecuentemente explotadas cuando únicamente se pretende la conversión del analito en otra especie que presente mejores características para su detección. La combinación c3 sirve para aumentar la señal analítica y disminuir el tiempo de residencia, o puede ser un montaje alternativo al tratamiento previo de la muestra, por ejemplo, para preconcentrar el analito. En aquellos casos en que la reacción del analito con el reactor en fase sólida sea lenta, la ubicación del reactor en el bucle de muestra de la válvula de inyección permite trabajar sin disminuir el caudal del portador o sin la necesidad de detener el flujo para que tenga lugar la reacción, lo que supondría parar y arrancar las bombas, con la pérdida de reproducibilidad que esto puede conllevar.

d) Combinación con reactor-detector: El emplazamiento de la unidad de reacción en el sistema de detección, integra la conversión y la detección en la celda de flujo del detector, permite la miniaturización de los sistemas F.I.A. y minimiza la dispersión de la muestra entre el reactor y el detector¹³.

1.2.4. Estrategias para la inmovilización de reactivos en un reactor en fase sólida

Para la preparación de reactores en fase sólida, deben de considerarse tanto los mecanismos físico-químicos empleados para inmovilizar el reactivo de interés, así como la configuración interna del reactor.

Las estrategias de inmovilización están condicionadas por la naturaleza del reactivo a inmovilizar (especialmente por el tamaño y el tipo de partícula) y la finalidad de su inmovilización (preconcentración, pretratamiento, conversión de muestras).

Atendiendo al mecanismo de inmovilización, las estrategias de inmovilización se pueden dividir en tres tipos fundamentalmente: *inmovilización natural*, cuando el propio reactivo sin modificación alguna constituye el relleno; *inmovilización sobre un soporte físico*, el reactivo se inmoviliza sobre un soporte físico, mediante interacción física o enlace químico, e *inmovilización por atrapamiento físico*.

La inmovilización natural, únicamente es posible con aquellos sólidos que sean insolubles en las disoluciones portadoras, que reúnan las características adecuadas de reactividad química, estabilidad mecánica al flujo continuo y un tamaño de partícula que permita el paso del flujo a su través sin ocasionar problemas de sobrepresión. Este tipo de inmovilización se limita a un pequeño número de reactivos como minerales, sales inorgánicas, amalgamas, resinas de intercambio iónico o de adsorción. En un trabajo de la presente memoria se emplea un reactor en fase sólida, donde se inmoviliza de forma natural una resina polimérica no polar tipo Amberlite XAD-4.

Existen una cantidad de reactivos químicos que se presentan en forma de polvo finamente dividido, partículas amorfas o cristalinas de tamaño y forma incontrolada, que dificulta su inmovilización y la posterior incorporación en el sistema F.I.A. Por ejemplo, en el caso de reactivos pulvulentos la inmovilización natural requiere un alto grado de empaquetamiento del reactor en fase sólida que imposibilita el empleo de la bomba peristáltica y el trabajar a bajas presiones, sin embargo este tipo de reactivos, han sido aplicados con éxito por J. Martínez y col.¹⁴ sustituyendo el sistema de propulsión habitual por una bomba de pistón de las empleadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), capaz de

proporcionar caudales constantes en un amplio intervalo y vencer la oposición mecánica al flujo causada por el reactor, al mismo tiempo que se consigue miniaturizar el sistema F.I.A. Por otro lado, la presencia de este tipo de partículas de tamaño y forma incontrolada crean un problema adicional, como es la pérdida considerable de precisión, debido a que la dispersión y la reacción de la muestra no transcurre de modo reproducible y uniforme.

Por todas estas razones y con el propósito de resolver estos problemas, surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de inmovilización lo más versátiles e inespecíficas posible, que puedan ser aplicadas a un gran número de reactivos sólidos, escasamente utilizados anteriormente por los inconvenientes prácticos de su uso, sin más limitación que los requerimientos químicos necesarios para que el reactivo inmovilizado reaccione con el analito y no con el portador empleado.

Esta alternativa sería *la inmovilización sobre un soporte físico* estable al flujo, mediante algún mecanismo de interacción física, atracción electrostática, adsorción o bien por enlace químico. Para este tipo de inmovilización se han empleado soportes de vidrio, resinas de intercambio iónico, alúmina activada, carbón activado o cadenas C₁₈ enlazadas sobre sílica gel entre otros.

Otra alternativa la constituye *la inmovilización por atrapamiento físico*, que hace uso de resinas de poliéster comerciales que actúan a modo de soporte como “atrapador”. En esta estrategia de inmovilización el reactivo no está unido al soporte por ningún tipo de interacción, simplemente se encuentra físicamente atrapado en la resina. Este atrapamiento físico ocurre durante la polimerización y solidificación de la resina, siendo por tanto, simultáneas la formación del soporte y la inmovilización. Este proceso puede ser aplicado a la inmovilización de cualquier reactivo, ya que es químicamente inespecífico y poco “agresivo”, puesto que transcurre a temperatura ambiente. Además, la inercia química y microbiológica que presenta el soporte junto con su gran estabilidad mecánica, lo hacen apto para su empleo en las condiciones y medios habituales de trabajo.

1.2.5. Funciones del reactor en fase sólida

Las distintas tentativas llevadas a cabo se pueden clasificar en alguno de los siguientes grupos:

❖ **Reactores sin reacción química.** Hacen referencia a reactores donde la interacción con la muestra se limita a un proceso físico-químico de adsorción, extracción o enlace electrostático, sin alteración química de la especie retenida. En este sentido, se han utilizado materiales adsorbentes como la alúmina, carbón activado, materiales poliméricos, esqueletos de microorganismos y resinas de intercambio iónico, para tareas de preconcentración del analito y eliminación de interferentes. Además, también se incluyen en este grupo, reactores con rellenos inertes, generalmente esferas de vidrio, que facilitan el mezclado y la reacción entre las disoluciones que los atraviesan.

❖ **Reactores con reacción química.** Incluye la inmovilización de especies químicas oxidantes, reductoras y reactivos que participan en reacciones de formación de complejos o en menor medida en reacciones ácido-base. El uso más generalizado de estos reactores es la conversión o derivatización del analito en una especie detectable.

❖ **Reactores electroquímicos.** Se emplea la electricidad como reactivo analítico para procesos de disolución de la muestra, eliminación de interferencias, preconcentración o conversión del analito previos a la etapa de detección.

❖ **Biorreactores.** Para procesos enzimáticos o inmunológicos separados físicamente del sistema de detección.

A continuación se comentan los reactores en fase sólida que no conllevan reacción química y que tienen la función de preconcentrar el analito y eliminar interferencias, por ser el reactor utilizado en uno de los trabajos de esta memoria.

1.2.6. Reactores en fase sólida sin reacción química. Preconcentración

La preconcentración se incluye dentro de las separaciones no cromatográficas en línea, basadas en resinas de intercambio iónico o adsorbentes que incrementan la selectividad y sensibilidad del método analítico. La elevada eficiencia en la preconcentración y el trabajo en un sistema cerrado constituido por materiales inertes como el PTFE, hacen a este tipo de reactores sólidos ideales para el análisis de trazas, ya que, a menudo la concentración de las especies de interés están por debajo del límite de detección de la instrumentación disponible, lo que implica una etapa de preconcentración con el propósito de incrementar la respuesta del analito, al mismo tiempo que se consigue eliminar interferencias y separarlo de la matriz. Normalmente la etapa de preconcentración es muy laboriosa y requiere de un elevado consumo de tiempo, aún así, ha sido incorporada con éxito al análisis por inyección en flujo.

La separación y la preconcentración en línea se ha acoplado a gran variedad de detectores, los más utilizados siguen siendo la espectrofotometría ultravioleta-visible¹⁵⁻¹⁸, la fluorescencia^{19,20}, la quimioluminiscencia^{21,22}, los electrodos selectivos²³, la amperometría²⁴, la potenciometría^{25,26} y sobre todo destacar el tandem F.I.A. AAS²⁷⁻³⁰, GFAAS³¹, ICP-ES^{32,33}, ET-AAS³⁴⁻³⁶ y ICP-MS³⁷⁻³⁹ que ha resultado ser con diferencia, el más fructífero.

La funcionalidad de este tipo de reactores establece una serie de exigencias específicas:

❖ La preconcentración del analito en la superficie del reactor se efectúa mediante un ciclo que incluye cuatro etapas:

- 1) *La carga del reactor o preconcentración*, mediante repetidas inyecciones de muestra (a volumen constante) o haciendo pasar durante un tiempo fijo y a un caudal conocido, la muestra a su través.

- 2) *Lavado del reactor*, con una disolución tampón al pH adecuado para el proceso de carga, para eliminar residuos de muestra no retenidos convenientemente en el reactor.
- 3) *Elución del analito*, con un volumen pequeño de eluyente que posea una elevada afinidad hacia el analito.
- 4) *Reacondicionamiento del reactor*, con una disolución tampón al pH adecuado para el proceso de carga, que restituya las características hidrodinámicas y de adsorción que poseía al principio del ciclo, equilibrando de esta manera el reactor.

Por tanto, al diseñar o seleccionar las características del reactor hay que considerar especialmente aquellas variables que influyan directamente en la dispersión de la muestra, como son la geometría del reactor, las propiedades del material adsorbente y del eluyente, así como los caudales de eluyente y portador.

❖ Las diferentes variables asociadas a sistemas con preconcentración, tienen algunas consideraciones generales de tipo práctico a tener en cuenta.

- Bajo la modalidad a *volumen constante* la obtención de altos factores de enriquecimiento en la preconcentración, exige el empleo de grandes volúmenes de muestra y largos periodos de carga hasta lograr una transferencia total del analito, por lo que se hacen preferibles los sistemas basados en un *tiempo constante de carga*, donde la cantidad de muestra a preconcentrar depende del tiempo de paso de la muestra a través del reactor y del caudal de la misma.

- La dispersión en el proceso de elución es doble y presenta un cierto paralelismo con las técnicas cromatográficas (HPLC). Por un lado la muestra se dispersa en distinto grado dependiendo del coeficiente de distribución del analito entre la fase estacionaria (reactor) y la fase móvil (muestra-eluyente); por otro lado existe también una dispersión post-columna que puede ser mínima cuando la detección es directa (AAS, ICPES, electrodos selectivos), o más significativa si se

incluye una reacción de derivatización post-columna con detección espectrofotométrica, fluorimétrica o quimioluminiscente.

- La capacidad del reactor de un sistema con preconcentración suele variar entre 15µl y 400µl. No siempre son deseables grandes capacidades, pese a que suelen mostrar una mayor tolerancia a los interferentes, pues en ocasiones existe una incompatibilidad con el sistema de detección. En el caso de la espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito se requieren volúmenes de muestra de unos pocos µl, mientras que los grandes volúmenes muertos de la AAS basada en la generación de hidruros, exige reactores con grandes capacidades.

- A igualdad de capacidad se obtienen factores de enriquecimiento más favorables al aumentar la relación longitud/diámetro del reactor. Sin embargo son frecuentes las columnas o reactores de con unos pocos milímetros de longitud y con un pequeño tamaño de partícula de relleno, que minimiza los riesgos de saturación, estando limitado este parámetro, a las sobrepresiones que pueden modificar sensiblemente los caudales operativos.

- Para obtener una buena eficacia en lo que se refiere a la preconcentración, son deseables caudales elevados en la etapa de preconcentración, sin embargo tienen que estar controlados los factores cinéticos asociados al material inmovilizado y a la estabilidad de flujo por efecto de la sobrepresión.

- Para el proceso de elución en línea, no son útiles eluyentes débiles que requieren largos periodos de equilibrio o que posean una baja afinidad por el analito. Además, es necesario que el eluyente no ataque al lecho reactivo y debe ser compatible con el detector, ya que, las determinaciones espectrofotométricas pueden verse significativamente afectadas por variaciones en los índices de refracción del bolo que recorre la celda (efecto Schlieren) y tanto los ácidos como las bases que son habitualmente utilizados como eluyentes, pueden causar obturaciones y corrosión en el sistema de nebulización con espectroscopía de absorción atómica.

- El caudal del eluyente debe ajustarse a los requerimientos del detector y según lo fuertemente retenido que se encuentre el analito al reactor en fase sólida. En ocasiones, está recomendado un flujo inverso en la etapa de elución cuando existen especies fuertemente retenidas, pero en todo momento se busca la minimización de la dispersión de la muestra durante la etapa de elución y garantizar un grado de empaquetamiento del lecho inalterable durante largas sesiones de trabajo.

❖ Por último, resaltar que las consideraciones generales efectuadas para los sistemas F.I.A. con reactivos inmovilizados son aplicables a sistemas con preconcentración, teniendo en cuenta que los aspectos cinéticos afectan doblemente a los procesos de preconcentración y de elución.

En la confección de reactores de preconcentración han sido empleados diferentes materiales:

Alúmina activada, la cual presenta gran estabilidad durante largos tiempos de trabajo, tanto en medios ácidos como básicos y se ha empleado en la determinación de oxoaniones⁴⁰ y cationes metálicos⁴¹⁻⁴².

Carbón activado, empleado para la adsorción directa de cationes metálicos como el zinc, plomo, níquel y cadmio presentes en muestras de agua⁴³ o como soporte para la inmovilización y adsorción del complejos formados entre iones metálicos y agentes complejantes⁴⁴.

C₁₈ unido a sílica gel, utilizado con el propósito de retener los complejos formados entre los cationes metálicos y agentes complejantes, para tras un proceso de preconcentración y elución determinar la cantidad de catión metálico⁴⁵, también se ha descrito una microcolumna de C₁₈ de fase inversa que permite preconcentrar el selenito y selenato⁴⁶ presente en agua del mar y su determinación a nivel en trazas mediante espectroscopía de absorción atómica electrotérmica.

Intercambio de iones complejantes, se trata de columnas rellenas de resinas complejantes tipo D401⁴⁷, iminodiacetato⁴⁸, PAMPA (ácido poliaminofosfónico)⁴⁹,

que permiten la determinación de metales pesados en aguas naturales, potables y en otro tipo de muestras.

Oxidos metálicos, básicamente son columnas rellenas de TiO_2 o ZrO_2 con una elevada superficie específica, que pueden preconcentrar la muestra permitiendo alcanzar límites de detección de ppt ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$). Se han descrito diversos trabajos donde se utilizan estos óxidos metálicos para la determinación de diversos metales en aguas mediante espectrofotometría¹⁸ y ICP-AES^{32,33}.

Intercambio iónico, pueden ser resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas tipo Bio-Rad AG1 X-8 column⁵⁰ o de intercambio catiónico fuertemente ácidas como Bio-Rad AG 50W-X12 column⁵¹ empleadas para la separación en línea de aniones y cationes respectivamente.

Esqueletos de microorganismos, el *Saccharomyces Cerevisiae*⁵² o diferentes algas⁵³ pueden ser inmovilizados en un reactor en fase sólida con el propósito de preconcentrar metales y su posterior determinación por espectroscopia de absorción atómica.

Polímeros adsorbentes, como resinas poliméricas del tipo Amberlite XAD (XAD-2⁵⁴, XAD-4^{55,56}, XAD-7⁵⁷, XAD-8⁵⁸, XAD-16⁵⁹) que pueden adsorber directamente al analito^{55,56} o al complejo formado entre el mismo y un reactivo complejante^{57,59}, presentando todas ellas unas excelentes propiedades de adsorción y desorción con el eluyente que tenga mayor afinidad hacia el analito.

Los polímeros adsorbentes tipo Amberlite son estructuras altamente porosas y en su superficie interna pueden adsorber o desorber una gran variedad de diferentes especies dependiendo del medio en el que se encuentren. Por ejemplo en disolventes polares como el agua, estos polímeros presentan un comportamiento apolar o hidrofóbico y pueden adsorber especies orgánicas, mientras que en medios apolares como los hidrocarburos, estos adsorbentes manifiestan un comportamiento polar o hidrofílico, adsorbiendo a especies con cierto grado de polaridad. Las resinas Amberlite tipo XAD son útiles para separar fenoles, antibióticos, pesticidas clorados, diversos compuestos aromáticos y nitrogenados de un medio acuoso, además de participar en procesos de desalinización y decoloración.

Concretamente las resinas no polares tipo XAD-4, XAD-2 se utilizan en diversos métodos analíticos para la detección y identificación de narcóticos y contaminantes orgánicos medioambientales como el fenol. En uno de los trabajos presentes en esta memoria, se utiliza una resina polimérica no polar tipo XAD-4, para separar y preconcentrar el fenol de una matriz acuosa.

Como ya se ha comentado anteriormente, la función principal de este tipo de reactores se centra en tareas de preconcentración, llegando con frecuencia en combinación con técnicas de espectrofotometría atómica a alcanzar límites de detección del orden de nM y ng·l⁻¹. Además, la gran versatilidad y naturaleza de los lechos de retención mejora la selectividad de los procedimientos analíticos, eliminando posibles interferentes presentes en la matriz, encontrado también su aplicabilidad en estudios de especiación⁶⁰.

1.3. NUEVAS ESTRATEGIAS: COMBINACIÓN DE ANÁLISIS EN FLUJO POR MULTICONMUTACIÓN

Desde la introducción del análisis por inyección en flujo (F.I.A.) se han desarrollado diferentes procedimientos para la manipulación de disoluciones y el control de la dispersión de las mismas. Para la ejecución de estas tareas, se han diseñado ingeniosos montajes y dispositivos que permiten la introducción de manera reproducible de la disolución de muestra en el sistema en flujo. Estos dispositivos han evolucionado desde la jeringa hipodérmica empleada por Ruzicka y Hansen en los orígenes del F.I.A. (hoy en día de interés histórico), pasando por el inyector proporcional, hasta culminar en la válvula rotatoria de seis puertos, actualmente el sistema de inyección más extendido en la metodología F.I.A. Con estas válvulas de seis puertos los procesos de carga e inyección de muestra se efectúan por desplazamiento de un elemento móvil entre dos posiciones fijas, quedando definido el volumen de muestra a inyectar por la longitud del bucle de muestra y el volumen interno de la válvula rotatoria. Sin embargo, este diseño carece de versatilidad

especialmente cuando se trata de determinar varios analitos. Estas y otras limitaciones pueden paliarse mediante el diseño de un sistema en flujo, consistente en un conjunto de válvulas solenoide de tres puertos, actuando cada una de ellas como un conmutador independiente.

1.3.1. Limitaciones de la válvula rotatoria de seis puertos

Con la válvula rotatoria⁶¹ de seis puertos sólo es posible introducir el volumen de muestra correspondiente al bucle, la introducción de un volumen distinto exige reemplazar la longitud del mismo con la consiguiente interrupción del flujo y consumo de tiempo. Los volúmenes de muestra a inyectar en F.I.A. están estrictamente limitados; los volúmenes más pequeños insertables corresponden al volumen interno de la válvula que suele ser de aproximadamente decenas de μl ; para volúmenes grandes el perfil de dispersión (Figura 1.4) impone restricciones, ya que, la muestra se dispersa en el medio portador sólo a través de los extremos frente y cola. Por tanto, volúmenes grandes no permitirán un mezclado eficiente de la zona central del bolo de muestra con el portador a menos que se prolonguen los tiempos de residencia mediante caudales bajos y reactores de gran longitud, siendo necesario un lavado del bucle después de cada inyección con un volumen adicional de muestra para limpiar las paredes del mismo que han sido bañadas con la disolución portadora.

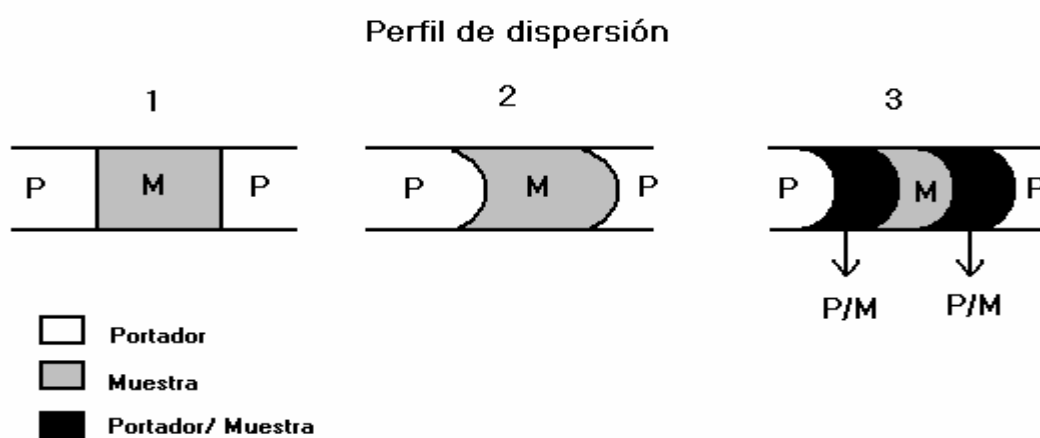


Figura 1.4: Perfil de dispersión en F.I.A.

El funcionamiento de la válvula rotatoria de seis puertos para las dos posiciones, de carga y de inyección se describe a continuación en la Figura 1.5.

Válvula rotatoria de seis puertos

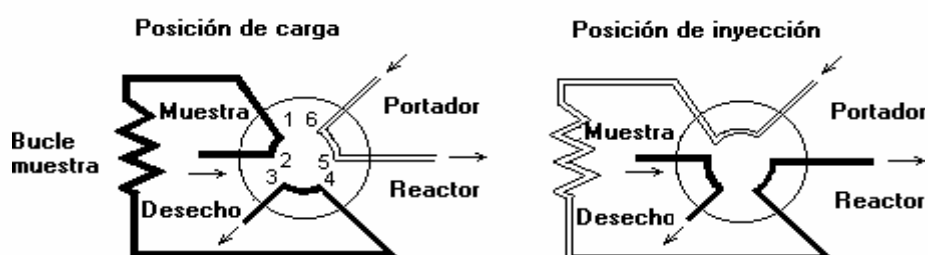


Figura 1.5: Funcionamiento de la válvula rotatoria de seis puertos.

La válvula de inyección de seis puertos es un dispositivo rígido, limitado en la generación de gradientes de concentración y perfiles de disolución que condiciona sensiblemente el diseño del montaje F.I.A., exige un consumo extra de muestra no despreciable y además presenta dificultades en cuanto a su automatización.

1.3.2. Multiconmutación

En el modo de multiconmutación⁶² con válvulas solenoide de tres puertos, el volumen de muestra a introducir se controla por el tiempo y el caudal. Por tanto, la incertidumbre asociada a las alícuotas de volúmenes de muestra está relacionada principalmente con la precisión en el control del tiempo de muestreo, siendo máxima la reproducibilidad si se emplean dispositivos electrónicos.

Las válvulas solenoide han sido utilizadas en cromatografía para la inserción de muestra y disolventes; para controlar la salida y la entrada de aire en cromatografía de gases; en espectrometría de masas para la introducción de disoluciones y en los montajes en F.I.A. se han incluido una o más válvulas solenoide, con el propósito de evitar las oscilaciones del flujo durante la inserción de

la muestra⁶³ y recientemente en el análisis por inyección secuencial S.I.A., se han utilizado un conjunto de tres válvulas solenoide como interfase entre el horno microondas para la digestión de la muestra y el montaje para la determinación de hierro⁶⁴.

Las principales aportaciones de la multiconmutación al análisis en flujo consisten, en la sustitución de los *volúmenes* de inserción por *tiempos* de inserción, lo que permite desarrollar métodos de muestreo basados en el tiempo y conseguir un sistema en flujo activo, versátil y de fácil reconfiguración.

El dispositivo fundamental en multiconmutación es la válvula solenoide de tres puertos que permite el diseño de redes activas, controlar la dispersión de la muestra y de los reactivos, lo cual favorece el desarrollo de modalidades de gradiente de difícil ejecución en la metodología F.I.A. convencional.

1.3.2.1. Válvula solenoide de tres puertos

La implementación de una válvula solenoide de tres puertos en un sistema en flujo presenta una estructura funcional controlada por el ordenador, como se muestra en la Figura 1.6.

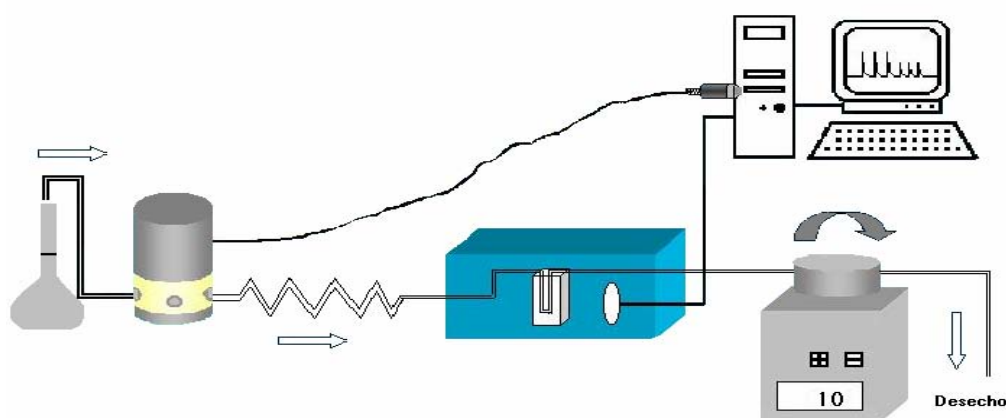


Figura 1.6: Válvula solenoide integrada en un sistema en flujo.

Los montajes por multiconmutación con válvulas solenoide comprenden, un número variable de válvulas que actúan cada una de ellas como un conmutador independiente controlado por un ordenador. Esta red, se podría asimilar a un circuito electrónico que presentase un número variable de nodos activos que podrían adoptar de forma independiente en el tiempo, dos estados posibles “OFF y ON”. De este modo, la dispersión de la muestra y de los reactivos puede ser controlada eficazmente, abriendo nuevos caminos para el desarrollo del análisis en flujo.

En la Figura 1.7, se describe el funcionamiento de la válvula solenoide en las dos posiciones de OFF y ON.

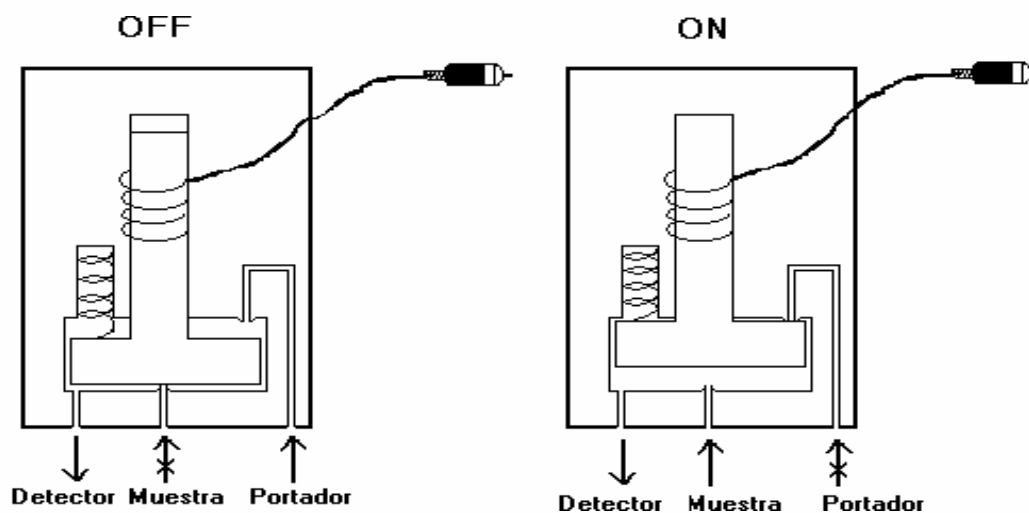


Figura 1.7: Funcionamiento de la válvula solenoide de tres puertos.

En posición ON, al coil que esta conectado al ordenador se le transmite una cierta cantidad de energía proporcional al pulso eléctrico y la armadura (en forma de T) es atraída hacia arriba, de esta forma se bloquea la entrada del portador permitiendo exclusivamente el paso de la muestra hacia el detector. Mientras que en posición OFF, el coil que esta conectado al ordenador se relaja y la armadura es atraída hacia abajo, se bloquea la entrada del muestra y únicamente circula el portador hacia el detector.

1.3.2.2. Perfil de inserción en multiconmutación

Las válvulas solenoide de tres puertos, se comportan como un conmutador o interruptor entre dos posiciones distintas OFF y ON, permaneciendo en todo momento dos de los tres orificios de la válvula comunicados. Mientras la válvula se encuentra inactiva (OFF) la disolución de portador es aspirada hacia el detector; en posición ON un pulso electrónico de duración programable permite la inserción de la muestra en el portador. El volumen de muestra insertado es proporcional a la duración del pulso y puede modificarse alterando el perfil de la secuencia de inserción, siendo posible la inserción de un sólo segmento de muestra o de varios segmentos idénticos o de distintas longitudes alternados con disolución portadora. La muestra consumida es la aspirada durante el tiempo que la válvula permanece activa (ON) y no es necesario un consumo adicional en tareas de lavado.

Las microinserciones de pequeños segmentos de muestra “emparedados” entre microsegmentos de portador favorecen un mezclado íntimo de las disoluciones de muestra y portador incluso cuando el volumen inyectado es grande, que bastará con aumentar el número de microinserciones de muestra.

Se trata pues, de un sistema versátil que permite la inserción de volúmenes variables de muestra a través del “*software*”, garantiza la inserción reproducible de volúmenes muestra de unos pocos microlitros mediante el control electrónico de la duración de los pulsos y finalmente destacar que las válvulas solenoide son susceptibles de una fácil automatización.

A continuación, en la Figura 1.8 se detallan diferentes perfiles y secuencias de inserción que se pueden obtener con un sistema con válvulas solenoide controlado por el tiempo o por la longitud del pulso eléctrico.

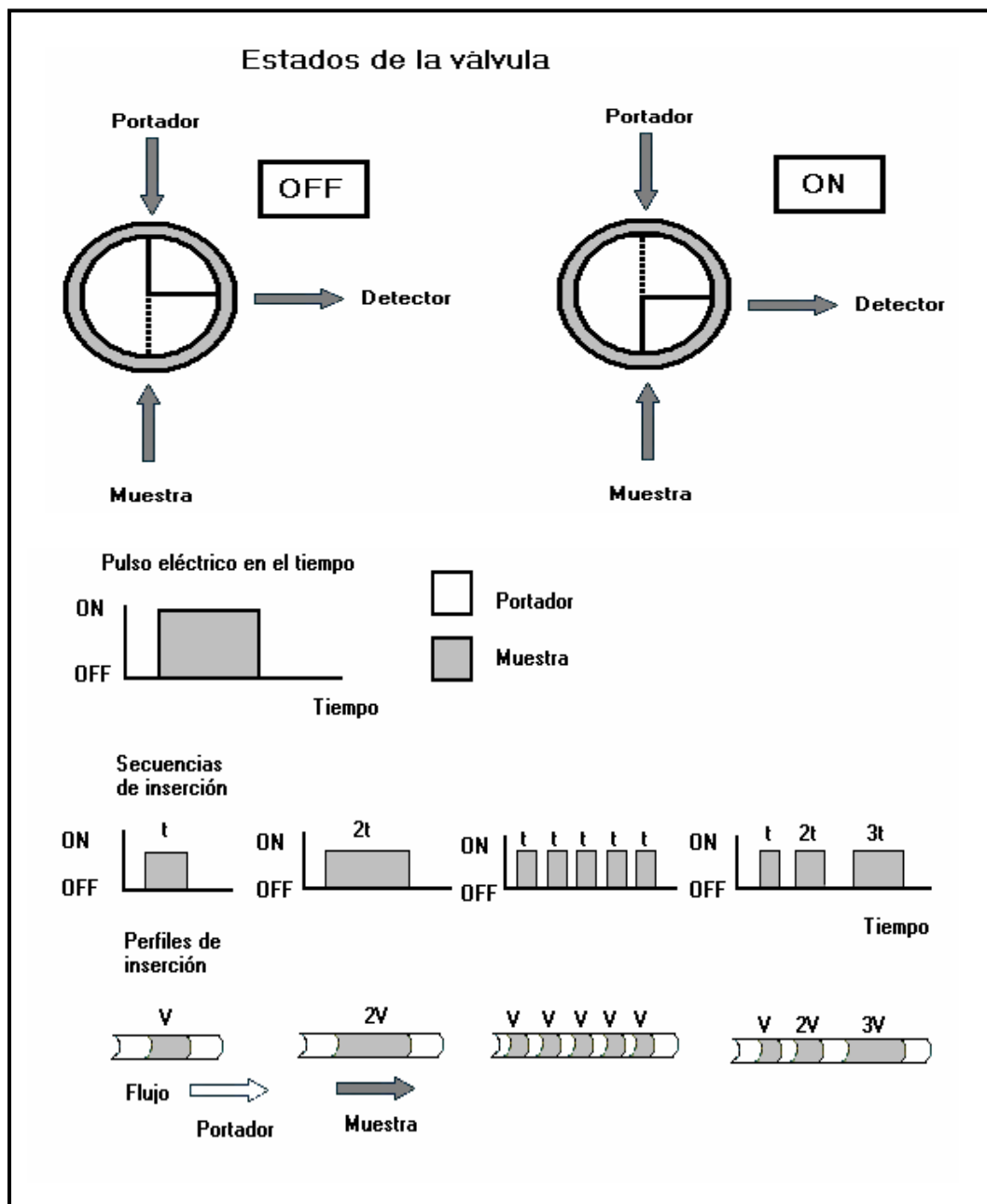


Figura 1.8: Secuencias y perfiles de inserción.

1.3.3. Ventajas y desventajas de la multiconmutación frente a F.I.A.

La multiconmutación no debe entenderse como una alternativa más cómoda y eficaz a los métodos clásicos, en lo que se refiere a la inserción de la muestra o de los reactivos en la corriente portadora. El empleo de pequeñas redes con nodos en forma

de válvulas solenoide actuando como conmutadores y controladas por un ordenador a través de un sencillo “*software*”, permite modificar la configuración del montaje (ciclos de apertura y cierre) sin necesidad de alterarlo físicamente y manipularlo, ampliando enormemente las posibilidades analíticas del análisis en flujo, revolucionado en los últimos años por la metodología F.I.A.

Las principales ventajas de la multiconmutación frente al análisis por inyección en flujo son:

❖ **Miniaturización de los montajes en flujo.** El reducido tamaño de las válvulas solenoide y de las interfases electrónicas permite el desarrollo de equipos integrados de reducido tamaño y de instrumentación portátil para efectuar análisis “in situ”.

❖ **Disminución del consumo de muestra y reactivos.** Las configuraciones en multiconmutación permiten que muestra y reactivos sean microdispensados de forma muy precisa; volúmenes de unos pocos μl , correspondientes a fracciones de segundo de tiempos de inserción, pueden obtenerse de forma muy reproducible.

❖ **Aumento de la reproducibilidad.** La intervención del operador es mínima (principal fuente de irreproducibilidad), ya que, el proceso de inserción está controlado por un ordenador vía “*software*”. Por tanto, la multiconmutación favorece el diseño de métodos de análisis completamente automatizados.

❖ **Economía y sencillez.** El precio de una válvula solenoide de tres puertos es inferior al de una válvula rotatoria convencional de las empleadas en F.I.A. Además, el dispositivo para los ciclos de apertura y cierre de las válvulas solenoide sólo necesita un impulso eléctrico (12 V y 100 mA como valores de referencia), no se precisa de una fuente de alimentación suplementaria, una tarjeta conectada directamente al ordenador controla todo el sistema. Por tanto, se requiere de un

“*hardware*” y de un “*software*” relativamente simples y de lenguajes de programación como Quickbasic y TurboPascal ampliamente difundidos.

❖ **Versatilidad.** A diferencia de la metodología F.I.A., la multiconmutación permite alterar la longitud de reactores, los volúmenes de muestra insertados, en definitiva, todas aquellas variables que inciden directamente en los perfiles de dispersión, sin necesidad de modificar físicamente el montaje. La reconfiguración del mismo se lleva a cabo más fácilmente que en los sistemas F.I.A., basta únicamente con reprogramar la duración de los impulsos eléctricos que controlan la apertura y cierre de las válvulas, o modificar la secuencia de conmutación de las mismas.

❖ **Ampliación de las modalidades de análisis en flujo.** El “control electrónico” de la dispersión (mejor control espacio-temporal de la dispersión frente al F.I.A.) y la mayor versatilidad asociada a la multiconmutación han permitido la implementación de modalidades de gradiente⁶² (flujo detenido, confluencia de zonas, penetración de zonas, muestreo de zonas), de procedimientos automatizados para determinaciones multiparamétricas y de montajes multicanales complejos que pueden ser manipulados de forma simple y eficaz.

Sin embargo, frente a estas importantes ventajas, hay que mencionar algunas limitaciones o desventajas:

❖ **Limitaciones en los volúmenes de inserción.** Si los segmentos de muestra y reactivos introducidos son muy pequeños se hace necesario sincronizar la unidad de bombeo y las microinserciones, en caso contrario, los pulsos de la bomba distorsionarían de forma irreproducible los perfiles de dispersión.

❖ **Aspiración de muestra y reactivos.** Debido a que las válvulas solenoide actúan como un conmutador entre las posiciones ON-OFF, una de las dos posiciones de entrada o salida de las válvulas queda cegada, quedando interrumpido el flujo por ese canal, ello obliga a emplazar en algunas ocasiones la unidad de bombeo después

de las válvulas y a aspirar muestra y reactivos en vez de ser bombeados, aumentando de esta manera la irreproducibilidad del caudal. No obstante, una sencilla combinación de las válvulas solenoide permite el emplazamiento clásico de la bomba antes de los puntos de inserción.

❖ **Comercialización de equipos.** La no disponibilidad comercial de los equipos (interfases electrónicas y “*software*” para el control de las válvulas solenoide) se pone de manifiesto en el hecho de que prácticamente la totalidad de los trabajos publicados relacionados con multiconmutación hacen uso de “*hardware y software*” de fabricación propia.

1.3.4. Modalidades F.I.A. y multiconmutación

La versatilidad y aplicaciones de la multiconmutación surgen como consecuencia de la mayor simplicidad y eficacia en el control de la dispersión de muestra y reactivos en comparación con la metodología F.I.A.

La multiconmutación no es una manera más elegante y automatizada de reproducir las estrategias que el análisis por inyección en flujo ha desarrollado desde 1975, sino que, bajo esta denominación se esconde un nuevo concepto del análisis en flujo, el cual engloba y amplía al F.I.A. como precursor.

Es interesante destacar que mediante la combinación de válvulas solenoide y el diseño de redes eficaces y versátiles, se pueden reproducir y llevar a cabo las siguientes operaciones:

- 1) Reproducir el mecanismo de inserción del bolo de muestra en F.I.A.
- 2) Dispensar de manera controlada muestra y reactivos para llevar a cabo una determinación multiparamétrica basada en la discriminación espacial y temporal de los segmentos de disolución insertados.

- 3) Producir perfiles y gradientes de concentración adecuados, indispensables en procesos de dilución o en el diseño de métodos automáticos volumétricos.
- 4) Trabajar bajo modalidades en flujo (flujo detenido, confluencia de zonas, penetración de zonas, muestro de zonas) que exigen una sincronización perfecta de los ciclos de apertura y cierre de las válvulas, lo cual es difícil de lograr con sistemas de inserción “clásicos”.
- 5) Imitar a las metodologías de flujo más recientes, como es el análisis secuencial en flujo el S.I.A.

1.3.4.1. Imitación del modo de inserción en F.I.A. con multiconmutación

La versatilidad de la multiconmutación la proporciona el hecho de que sea posible reproducir fielmente el mecanismo de inyección de una válvula rotatoria de seis puertos empleada habitualmente en la metodología F.I.A. El procedimiento se muestra en la Figura 1.9.

En la posición de carga la disolución portadora y la muestra circulan por distintos canales; el volumen de muestra a inyectar corresponde a la longitud L del bucle de muestra que conecta las válvulas $V2$ y $V3$. El llenado del bucle se efectúa mediante una segunda unidad de propulsión consistente en una bomba solenoide, que se activa automáticamente durante el proceso de carga proporcionando un flujo intermitente y pulsante. Durante el proceso de inserción de la muestra, la conmutación simultánea de las tres válvulas solenoide a la posición ON permite que la disolución portadora arrastre la muestra hacia el detector.

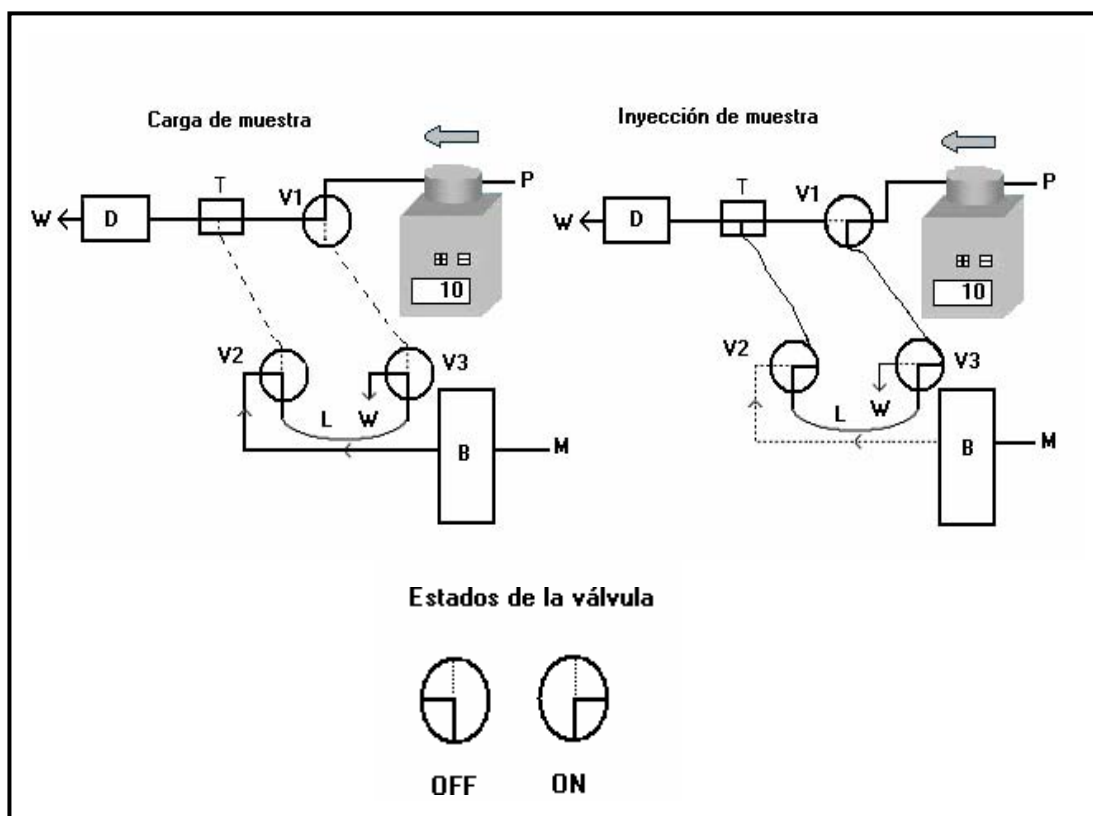


Figura 1.9: Multiconmutación reproduciendo la inserción en el análisis por inyección en flujo (F.I.A.). **W:** Desecho; **D:** Detector; **T:** Conector; **Vn:** Válvula solenoide; **M:** Muestra; **P:** Portador; **B:** Bomba solenoide.

1.3.4.2. Determinación multiparamétrica basada en la eficiente discriminación de la muestra en el portador o en la corriente portador-reactivo

Una configuración básica o tipo dentro de la multiconmutación, del mismo modo que en electrónica se habla de circuitos básicos, es aquella formada por una disposición de válvulas solenoide en serie o en paralelo que actúan a modo de microdispensadores de muestra y reactivos. A este procedimiento de inserción secuencial de alícuotas de muestra y reactivos en un único canal donde transcurren las reacciones químicas y el cual está conectado a la unidad de “propulsión” se le llama “*muestreo binario*”.

A continuación se muestran diversos posibles montajes en multiconmutación:

- 1) Montaje en serie (Figura 1.10).
- 2) Montajes en paralelo (Figuras 1.11 y 1.12).

MONTAJE EN SERIE

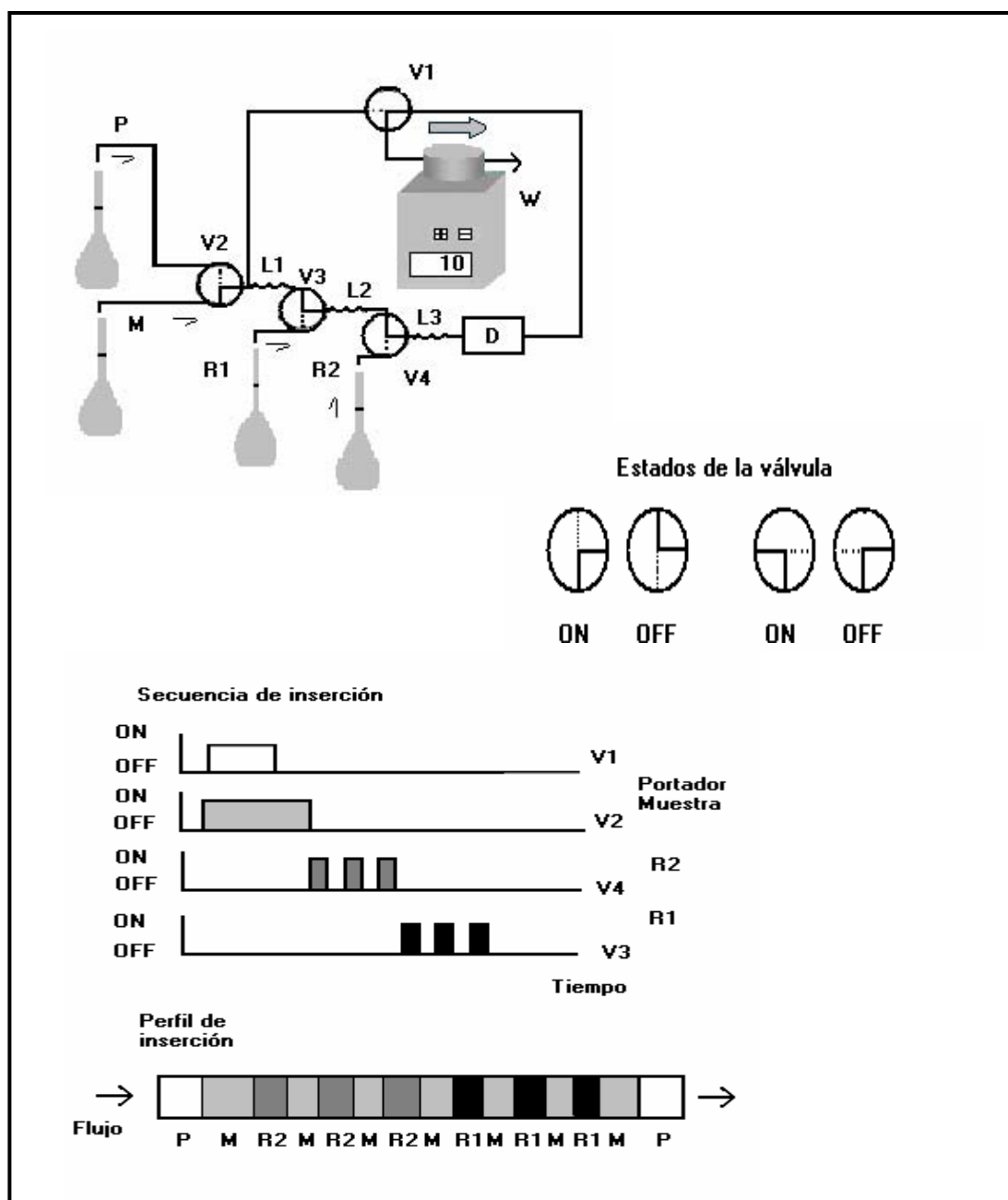


Figura 1.10: Montaje en serie. **P:** Portador; **M:** Muestra; **R1:** Reactivo 1; **R2:** Reactivo 2; **Vn:** Válvula solenoide; **Ln:** Reactor; **D:** Detector; **W:** Desecho.

En el sistema de la *Figura 1.10* la válvula V1 tiene como finalidad aspirar las muestras y los patrones, permitiendo el lavado del sistema y la eliminación de burbujas que se pudieran formar como consecuencia del cambio de disoluciones al conmutar a la posición ON. Como se observa en la secuencia de inserción, primero circula el portador por el sistema, a continuación la misma válvula V2 conmuta a la posición de encendido y se inserta la muestra. Una vez lleno el sistema con la disolución de muestra se produce la inserción consecutiva de cada uno de los reactivos. Los reactores L1-L3 discriminan espacialmente los distintos “emparedados” de muestra-reactivo, pudiéndose realizar una determinación multiparamétrica.

En la configuración descrita a continuación en la *Figura 1.11* los reactivos son impulsados en vez aspirados. En posición OFF todas las disoluciones son recirculadas, excepto el portador que circula por el reactor hasta que la válvula V6 conmuta a la posición de encendido. A partir de este momento, la corriente portadora es recirculada y las válvulas (V1,V2,V3,V5) son alterativamente encendidas y apagadas para insertar secuencialmente alícuotas de muestra y reactivos en un único canal donde tienen lugar las reacciones químicas. Además, transcurrido un número de ciclos la válvula 4 permite la limpieza del sistema al conmutar a la posición ON. En ausencia de la válvula 7 el flujo principal se dirige directamente al detector, pero la presencia de la misma permite detener el flujo dentro del reactor para hacer un control cinético de la reacción, después de seleccionar un tiempo durante el cual la válvula 7 se mantiene encendida.

MONTAJES EN PARALELO

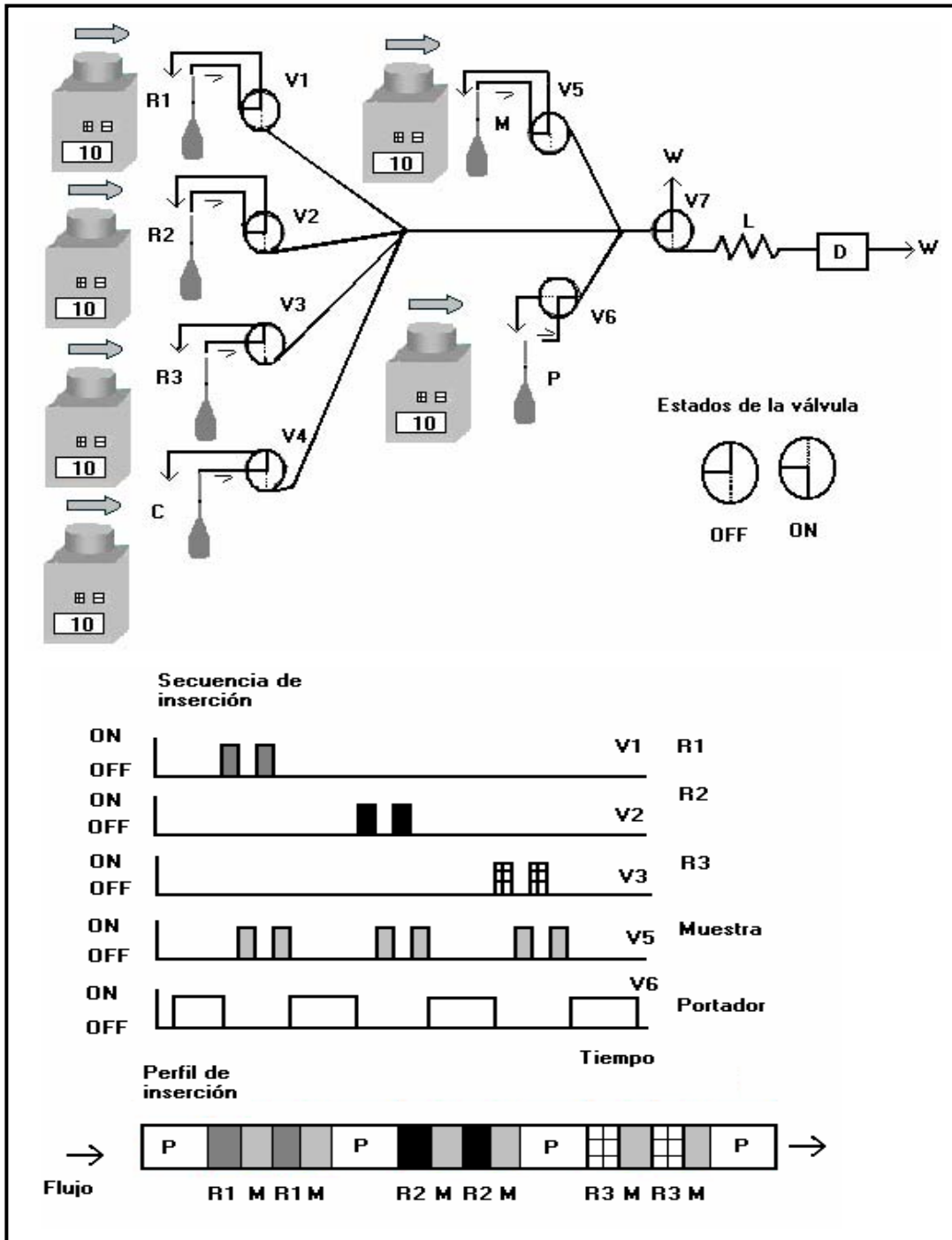


Figura 1.11: Montaje en paralelo. **P:** Portador; **M:** Muestra; **R1:** Reactivo 1; **R2:** Reactivo 2; **R3:** Reactivo 3; **C:** Solución de lavado; **Vn:** Válvula solenoide; **L:** Reactor; **D:** Detector; **W:** Desecho.

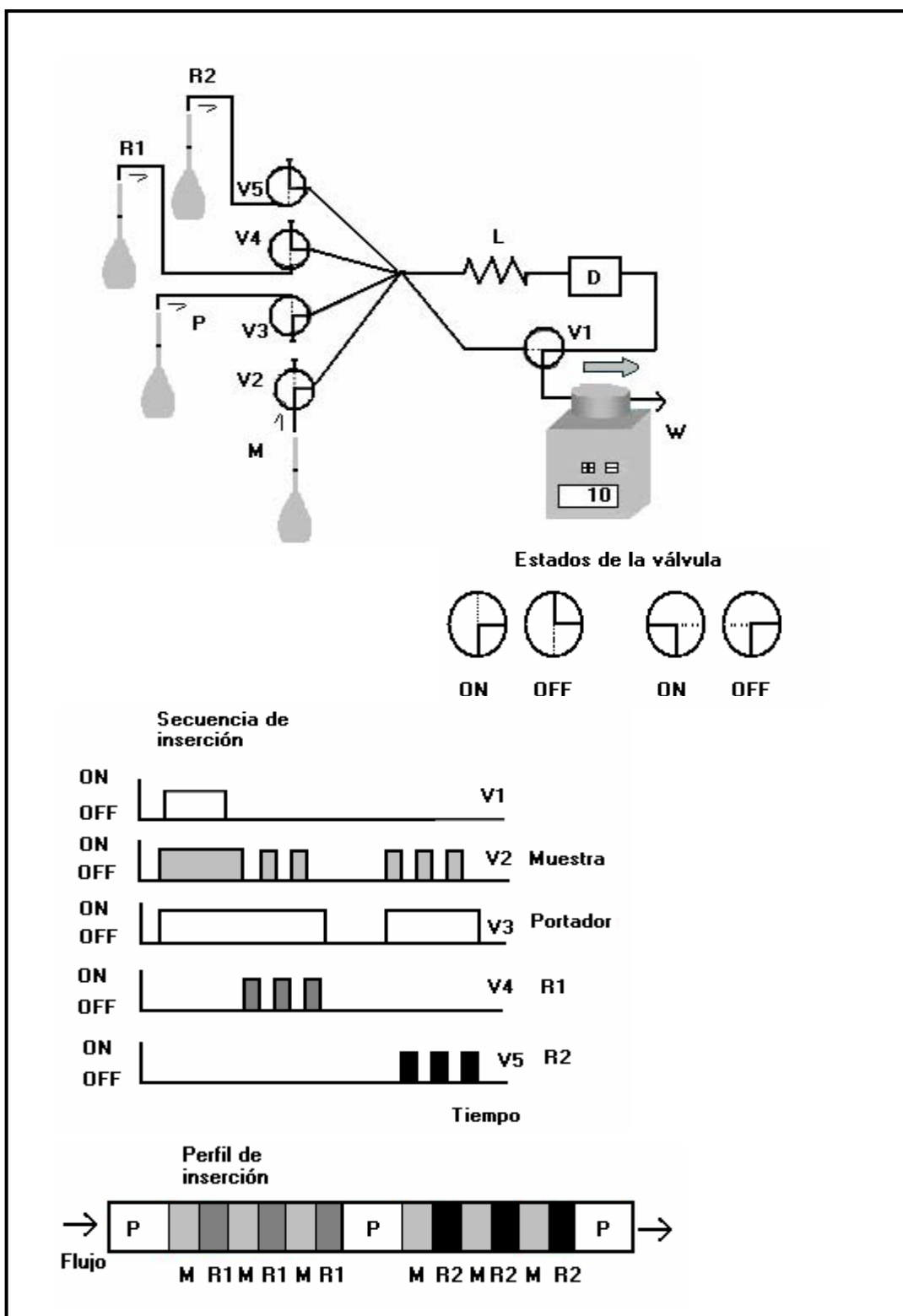


Figura 1.12: Montaje en paralelo. P: Portador; M: Muestra; R1: Reactivo 1; R2: Reactivo 2; Vn: Válvula solenoide; L: Reactor; D: Detector; W: Desecho.

En el montaje en paralelo de la *Figura 1.12* la válvula V1 tiene la función de aspirar las muestras y los patrones, además de permitir el lavado y la eliminación de burbujas del sistema que se pudieran formar como consecuencia del cambio de disoluciones al conmutar a la posición ON. Una de las entradas de las válvulas V2-V5 está cegada y es necesario que la inserción de reactivos sea espaciada en el tiempo introduciendo un segmento de disolución portadora. Según la secuencia de inserción, en primer lugar circula el portador cuando la válvula 3 se encuentra apagada, seguidamente se introducen alternativamente segmentos de muestra y reactivo 1 al conmutar las válvulas 2 y 4. Tras una nueva inserción del portador, las válvulas 2 y 5 se encenderían insertándose segmentos de muestra y de reactivo 2 alternativamente. La secuencia de inserción debe programarse de forma que el caudal de aspiración para cada una de las disoluciones del sistema se mantenga constante y no se vea afectado por la conmutación del resto de las válvulas del circuito.

De las anteriores configuraciones se deducen dos importantes ventajas: el consumo de muestra y reactivos es mínimo y el control de la dispersión de cada una de las disoluciones dispensadas permite la cuantificación de diferentes parámetros en una misma muestra sin que se produzca un solapamiento de los distintos picos (en principio un pico por reactivo insertado), mientras que en un montaje F.I.A. habría que recurrir a reactores de gran longitud para poder discriminar entre picos, evitando así el solapamiento de los perfiles de dispersión.

1.3.5. Aplicaciones analíticas

Algunas aplicaciones analíticas de la multiconmutación quedan reflejadas en las Tablas (I y II). En cada una de ellas se detalla el detector utilizado, el número de válvulas solenoide necesarias, así como las características analíticas del método propuesto para la determinación de un grupo de analitos. Es de destacar que no todas las aplicaciones se desarrollan para la determinación de un único analito, sino que existen numerosos métodos diseñados para la cuantificación de varios parámetros en una misma muestra.

Tabla I: Iones metálicos y aniones inorgánicos

Analito	Muestra	Detector	Intervalo linealidad Límite detección (L.D.)	dSr(%)	Velocidad muestreo h ⁻¹ Volumen de muestra µl	Válvulas solenoide	Ref
Ag/ Cd/ Hg/ Pb/ Tl	Músculo cazón; Hígado vacuno; Salvado maíz; Harina; Arroz	ET ICP MS	0.15-41 ng g ⁻¹		5	65	
As(III)/ As(V)	Agua potable	PSVI	t=20 s > 60 ppb; t= 5s >350 ppb; t=1s > 300 ppb (t=80 s 0.5-0.2 ppb)	2.2 (n=8)	4	66	
Bi(III)/ Pb(II)	Hierro; Hojas	ET AAS	1-5 ppb (Bi, 0.25 ppb / Pb, 0.21 ppb)	4-19	-/ 20	67	Bi 6; Pb 7
Ca	Agua; materia vegetal; Leche; Formulaciones farmacéuticas; Fertilizantes; Rocas	S (575 nm)	0.25-1000 ppm (7 ppb)	0.83 (n=10)	42-68 / 10-500	68	5-6
Ca /Mn/ Zn	Materia vegetal	ICP AES				69	
Cu	Comida; Materia vegetal	AAS	(1 ppb)	3 (n=10, 21.75 ppb)	48	70	

Ref: Referencia. **S:** Espectrofotómetro. **PSIV:** Instrumento para voltimetría con preconcentración y redisolución “Stripping”. **ETICPMS:** Espectrometría de masas acoplada a plasma con vaporización electroterma. **ASS :** Espectroscopía de absorción atómica. **ICP AES :** Espectroscopía de emisión atómica acoplada a plasma.

Tabla I: (Continuación)

Analito	Muestra	Detector	Intervalo linealidad Límite detección (L.D.)	dsr(%)	Velocidad muestreo h ⁻¹ Volumen de muestra µl	Válvulas solenoide	Ref
Cd/ Pb/ Ni	Agua (embotellada, mineral, grifo, mar)	ET AAS	Cd, 2.2 ng l ⁻¹ Pb, 23 ng l ⁻¹ ; Ni 75 ng l ⁻¹	Cd< 5	30 / 3000	4	71
				Pb<4 Ni<6 (n=10)			
Mn ⁺²	Materia vegetal	S (548 nm)	2.5-40.0 ppm (1.2 ppm)	0.27 (n=9 17.1 ppm)	50	4	72
				30 s, 1.5 (n=42, 0.72 ppm); 120 s, 1.8 (n=33, 0.23 ppm)			
Cl ⁻	Lejías; Tabletas; Agua	S (445 nm)	30 s preconcentración: 0.05-1.30 ppm (0.05 ppm); 120 s preconcentración: 0.02-0.43 ppm (0.43 ppm)	30 s, 1.5 (n=42, 0.72 ppm); 120 s, 1.8 (n=33, 0.23 ppm)	30 s, 38; 120 s, 20	3	73
NH ₃ / Metilaminas	Agua; Aire	C	Metilaminas >100 nM NH ₃ > 1000 nM	< 8			74
SO ₄ ²⁻	Materia vegetal	T (410 nm)	> 500 ppm	2 (n=11)	100 /54 (100-500 ppm) / 94 (0-150 ppm)	5	75
NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	Agua río	S	0.025-1 ppm NO ₂ ⁻ (5 ppb) 0.10-5 ppm NO ₃ ⁻ (15 ppb) 0.1-2 ppm NH ₄ ⁺ (25 ppb)	NO ₂ ⁻ , 0.32; NO ₃ ⁻ , 0.42; NH ₄ ⁺ , 0.72	60	8	76

Ref: Referencia. **S:** Espectrofotómetro. **ETASS:** Espectroscopía de absorción atómica electrotrémica. **T:** Turbidimetría. **C:** Conductimetría.

Tabla II: Compuestos orgánicos

Analito	Muestra	Detector	Intervalo linealidad Límite detección (L.D.)	dsr(%)	Velocidad muestreo h ⁻¹ Volumen de muestra µl	Válvulas solenoides	Ref
Cefalexina	Formulaciones farmacéuticas	S (262 nm)	> 1250 ppm (1.57 ppm)	0.66 - 2.1	180	2	77
Creatinina	Orina	S		2.9 (n=10, 1.26 g l ⁻¹)	24	3	78
Fenol	Agua	QL	(5 ppb)		12 - 60 (Sin preconcentración)		79
Etanol	Bebidas alcohólicas	S (600 nm)	10 - 50	1.6 (n=11, 42.1 %)	40 / 18 -296		80
Pindolol	Formulacion farmacéuticas	S (635 nm)	5 - 120 ppm	1.1 (n=10)	30	5	81

Ref: Referencia. **S:** Espectrofotómetro. **QL:** Quimioluminiscencia.

1.4. COMBINACIÓN F.I.A.-QUIMIOLUMINISCENCIA APLICADA A LOS ANÁLISIS FARMACÉUTICOS

El fenómeno de la luminiscencia se basa en la emisión del exceso de energía en forma de radiación electromagnética (ultravioleta, visible o infrarroja cercana) por parte de moléculas, átomos o iones, como resultado de la transición desde un estado electrónicamente excitado a un estado de menor energía, normalmente el estado fundamental. Se conocen muchos tipos de luminiscencia que se clasifican según la naturaleza de la fuente de energía responsable de excitar las sustancias. En la Tabla 1.1 se exponen los distintos tipos de luminiscencia⁸².

Las dos manifestaciones más conocidas de la luminiscencia⁸³ producida por especies moleculares de utilidad analítica son la fluorescencia y la fosforescencia. Otra manifestación que está adquiriendo cada vez una mayor importancia en analítica es la quimioluminiscencia, que en términos sencillos se puede definir como la producción química de radiación: el estado excitado se produce a expensas de la energía resultante de una reacción química. El ejemplo más típico de este fenómeno es el luminol. Cuando en este tipo de reacciones intervienen los seres vivos o sistemas biológicos, el fenómeno recibe el nombre de bioluminiscencia. El ejemplo más conocido es el de las luciérnagas.

La quimioluminiscencia se define como la producción de radiación electromagnética (ultravioleta, visible o infrarroja cercana) como resultado de un reacción química, de forma que alguno de los productos de reacción se obtiene en el estado excitado y emite luz al volver a su estado fundamental. El que se produzca este fenómeno no suele ser muy común, ya que, la energía liberada en la reacción química no es lo suficientemente elevada para provocar la excitación, se disipa en forma de calor u ocurre la combinación de ambos. El proceso por el cual se produce la quimioluminiscencia es el mismo que para la fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) excepto que no se necesita ninguna fuente de excitación luminosa.

Nombre	Características
<i>Fluorescencia</i>	Fotoluminiscencia de tiempo de vida corto procedente de un singlete excitado, formado por la absorción de radiación ultravioleta, visible o infrarroja cercana.
<i>Fosforescencia</i>	Fotoluminiscencia de tiempo de vida largo procedente de un triplete excitado, formado por la absorción de radiación ultravioleta, visible o infrarroja cercana.
<i>Quimioluminiscencia</i>	Luminiscencia en que la molécula en estado electrónicamente excitado ha sido generada por una reacción química.
<i>Bioluminiscencia</i>	Quimioluminiscencia en la cual la radiación visible emitida procede de procesos químicos en el interior de organismos vivos o de sistemas químicos derivados de ellos.
<i>Electroquimioluminiscencia</i>	Quimioluminiscencia en la que uno o más reactivos se generan in situ por un proceso electrolítico.
<i>Electroluminiscencia</i>	Luminiscencia procedentes de descargas eléctricas.
<i>Termoluminiscencia</i>	Luminiscencia procedente de sólidos sometidos a calentamiento.
<i>Candoluminiscencia</i>	Luminiscencia procedente de sólidos incandescentes.
<i>Piroluminiscencia</i>	Luminiscencia procedente de átomos metálicos excitados por llamas.
<i>Anodoluminiscencia</i>	Luminiscencia originada por irradiación con partículas alfa.
<i>Catodoluminiscencia</i>	Luminiscencia originada por irradiación con partículas beta.
<i>Radioluminiscencia</i>	Luminiscencia originada por irradiación con rayos gamma o X.
<i>Triboluminiscencia</i>	Luminiscencia originada por reordenamiento estructural en sólidos, por ejemplo por aplastamiento.
<i>Sonoluminiscencia</i>	Luminiscencia originada por exposición de la sustancia en disolución a la acción de ultrasonidos.

Tabla 1.1:Tipos de luminiscencia.

El proceso químico de generación de quimioluminiscencia se puede esquematizar en los dos siguientes pasos:

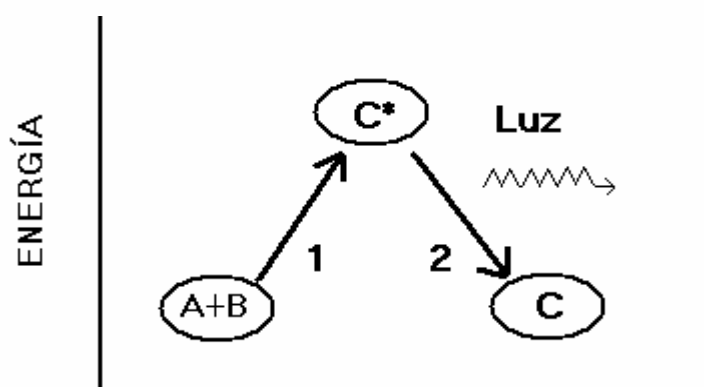
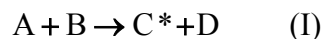


Figura 1.13: Esquema del fenómeno de quimioluminiscencia. 1) Excitación, 2) Relajación y emisión de luz.

El fenómeno de quimioluminiscencia lo producen muy pocas reacciones, por tanto, es necesario cumplir tres condiciones para que una reacción química produzca quimioluminiscencia:

- ❖ Liberar la suficiente energía para producir un estado electrónicamente excitado. La energía de los fotones en la región visible oscila entre 44 y 71 Kcal/mol, de acuerdo con esto, la energía liberada tiene que ser como mínimo de 44 Kcal/mol para que la reacción sea quimioluminiscente. Cambios en esta magnitud de energía se pueden encontrar en reacciones de oxidación, especialmente en aquellas donde intervienen el oxígeno, peróxidos y oxidantes fuertes.
- ❖ El camino de reacción debe de favorecer la formación del estado electrónicamente excitado.
- ❖ El estado excitado ha de ser luminiscente o transferir su energía a otra molécula luminiscente.

De los cuatro parámetros que caracterizan la emisión quimioluminiscente; intensidad, color, velocidad de producción y velocidad de disminución, el primero es el más importante en cuanto a la aplicabilidad analítica de un reacción quimioluminiscente.

Esta intensidad de luz emitida depende de la velocidad de la reacción química, del rendimiento de la producción de estados excitados y del rendimiento correspondiente a la emisión de luz por parte de los últimos.

En quimioluminiscencia el rendimiento cuántico se define como:

$$\phi_{CL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ fotones emitidos}}{\text{N}^\circ \text{ de moléculas reaccionantes}}$$

y la intensidad como:

$$I_{CL} = \phi_{CL} \frac{dP}{dt} = \phi_{EX} \phi_{EM} \frac{dP}{dt}$$

- I_{CL} Es la intensidad de la emisión quimioluminiscente; es decir, el número de fotones emitidos por segundo.
- dP/dt Es la velocidad de la reacción química; que corresponde al número de moléculas que reaccionan por unidad de tiempo, en segundos.
- ϕ_{CL} Es el rendimiento cuántico de la quimioluminiscencia; o lo que es lo mismo, el número fotones emitidos por molécula reaccionada.
- ϕ_{EX} Es el rendimiento cuántico de excitación, es decir, el número de estados excitados producidos por molécula reaccionada.
- ϕ_{EM} Es el rendimiento cuántico de emisión o número de fotones emitidos por estado excitado.

Por tanto, una reacción quimioluminiscente adecuada requiere de una producción selectiva del intermediario y una eficaz conversión de éste en un estado singlete excitado de un producto altamente fluorescente.

En general, las reacciones quimioluminiscentes comúnmente explotadas en el análisis tienen rendimientos cuánticos que pueden llegar a 0.5, pero la casi inexistencia de emisión de fondo hace que sistemas con rendimientos cuánticos mucho menores puedan ser empleados, como es el caso del luminol, que durante muchos años ha sido considerado el de mayor eficacia y posee un rendimiento cuántico de quimioluminiscencia entre 0.01-0.05.

Hay que destacar que el color y el rendimiento cuántico que inciden directamente sobre la emisión quimioluminiscente, pueden verse muy afectados por la polaridad del disolvente, la temperatura de la disolución, y por la influencia de procesos secundarios, como la amortiguación de la emisión de radiación del estado excitado (quenching).

A falta de predicciones teóricas seguras, existen varias reglas empíricas para tratar de estimar si un sistema va o no a tener un comportamiento quimioluminiscente. Por ejemplo, si un analito o su producto de oxidación es fluorescente entonces existe una alta posibilidad de que la oxidación de la molécula resulte quimioluminiscente con oxidantes fuertes. Sin embargo, existen muchas excepciones a estas reglas, y en muchas ocasiones no es posible predecir un comportamiento quimioluminiscente.

En la naturaleza el fenómeno de emisión de luz derivado de reacciones químicas en organismos luminosos (bacterias, hongos, insectos, peces y pescado en descomposición), se conoce desde hace mucho tiempo⁸⁴⁻⁸⁷ y se denomina bioluminiscencia. La primera referencia que se tiene sobre la producción química de luz se remonta al año 1669 cuando el alquimista Henning Brandt⁸⁸, de Hamburgo, tras el proceso de destilación de la orina mezclada con arena y calentando a fuego intenso, observó que en el fondo de la retorta existía una sustancia blanca cerúlea que emitía una luminiscencia blanca a la que denominó “fuego frío”. No fue hasta dos siglos después cuando Radziszewski descubrió que la lófina⁸⁹ emitía luz verde cuando reaccionaba con el oxígeno en presencia de una base. Desde entonces, se han

synthesized compounds chemiluminescent and they have studied their mechanisms of reaction and analytical applications.

Chemiluminescence has been observed in solid, gaseous and liquid phase. The emission of radiation produced by solid compounds has found numerous and important applications (X-ray screens, cathode ray tubes), but without embargo the number of solids conducentes to chemiluminescent reactions is reduced, perhaps the best illustration of this type of reaction is the chemiluminescence produced by the oxidation of siloxane. The chemiluminescent systems in gaseous phase arise due to the need of determination of atmospheric contaminants; the systems in gaseous phase are classified according to whether they take place or not in the presence of a flame. With flame, the chemiluminescent emission can be produced by the recombination of species generated in the flame, the most important applications of this modality is the determination of sulfur and phosphorus. While the chemiluminescent systems in gaseous phase without flame, they are based generally on mixing an excess of gaseous reagent with the gaseous sample and measuring the emitted light. All these phenomena have given place to analytical processes of high sensitivity, although the modality denominated chemiluminescence in solution is the most used. This introduction is centered on *the most important chemiluminescent systems employed in liquid phase.*

1.4.1. Consideraciones básicas. Aplicaciones analíticas

The analytical interest of chemiluminescence lies in the possibility of producing light-emitting molecules without previous irradiation, which avoids various problems derived from the dispersion of light, non-selective excitation or instability of the radiation source.

Las ventajas de la quimioluminiscencia para el análisis incluyen la posibilidad de alcanzar una elevada sensibilidad, bajo límite de detección y un amplio intervalo dinámico de linealidad utilizando una instrumentación muy simple. Los bajos límites de detección que caracterizan a estos procedimientos dependen de un gran número de factores, pero especialmente del hecho de que no es necesario el uso de una fuente de radiación, lo que reduce o elimina la dispersión de Raman y Rayleigh y el ruido de fondo asociado a la fuente. Esto permite aplicar altos voltajes al tubo fotomultiplicador⁹⁰ consiguiendo una mejora significativa en la relación señal-ruido de fondo con respecto a la detección fluorimétrica convencional⁹¹. Por tanto, la bajísima señal de fondo es una ventaja destacable en la excitación química, y permite obtener límites de detección de femtomoles, alcanzándose attomoles en algunos casos⁹². Se han llegado incluso a detectar niveles tan bajos como 120 moléculas en el caso de ciertas enzimas⁹³. Las rectas de calibrado son a menudo lineales en varios órdenes de magnitud, así por ejemplo, la gráfica de calibrado log-log para la morfina es lineal en el intervalo 10^{-4} - 10^{-10} mol·l⁻¹⁹⁴.

Todos los sistemas básicos de quimioluminiscencia así como otros menos explotados, han sido empleados para la determinación de una gran número de sustancias tanto de naturaleza orgánica como inorgánica, cuya presencia repercute sobre la intensidad de emisión finalmente medida como resultado de la participación del analito en el proceso global que conduce a la quimioluminiscencia^{82,95}.

Desde el punto de vista analítico, los procesos quimioluminiscentes pueden ser clasificados en:

- a) **Métodos directos:** aquellos en que el analito emite la radiación tras ser oxidado.
- b) **Métodos indirectos:** cuando el analito interviene de un modo distinto en el sistema quimioluminiscente.

En las Tablas I, II, III, IV, V (pp.75-91) se presentan únicamente aquellas aplicaciones a la determinación quimioluminiscente de productos farmacéuticos que

1.4.1.1.1. Sistemas químicos no biológicos

Este grupo de sistemas quimioluminiscentes incluye como reactivos más utilizados las siguientes sustancias: lofina, luminol, lucigenina, ésteres de oxalato y tris (2,2'-bipiridina) rutenio (II) responsables de la mayoría de las aplicaciones analíticas.

a) Imidazoles

Como se ha indicado anteriormente, los primeros estudios de la reacción quimioluminiscente de la lofina (2,4,5-trifenilimidazol) fueron realizados en 1877 por Radziszewski⁸⁹. La lofina se oxida en medio alcalino con dimetilsulfóxido (DMSO) o en medio hidróxido sódico alcohólico por los pares peróxido-hipoclorito o peróxido-hexacianoferrato (III) y también por el oxígeno como se observa en la Figura 1.14. La oxidación de la lofina puede ser catalizada por varios iones inorgánicos como AuCl_4^- , ClO^- , MnO_4^- , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, $\text{Co}(\text{II})$ y $\text{Cr}(\text{III})$.

En la reacción de la lofina con el peróxido de hidrógeno en medio alcalino, se ha aprovechado el hecho de que el cobalto $\text{Co}(\text{II})$ actúa como catalizador de la reacción para determinarlo en la cianocobalamina (vitamina B_{12}) incrementando la intensidad de la emisión quimioluminiscente con el empleo de cloruro de hidroxilamina¹⁰⁰.

Se han estudiado las reacciones quimioluminiscentes de dieciocho derivados de lofina en un sistema F.I.A.¹⁰¹.

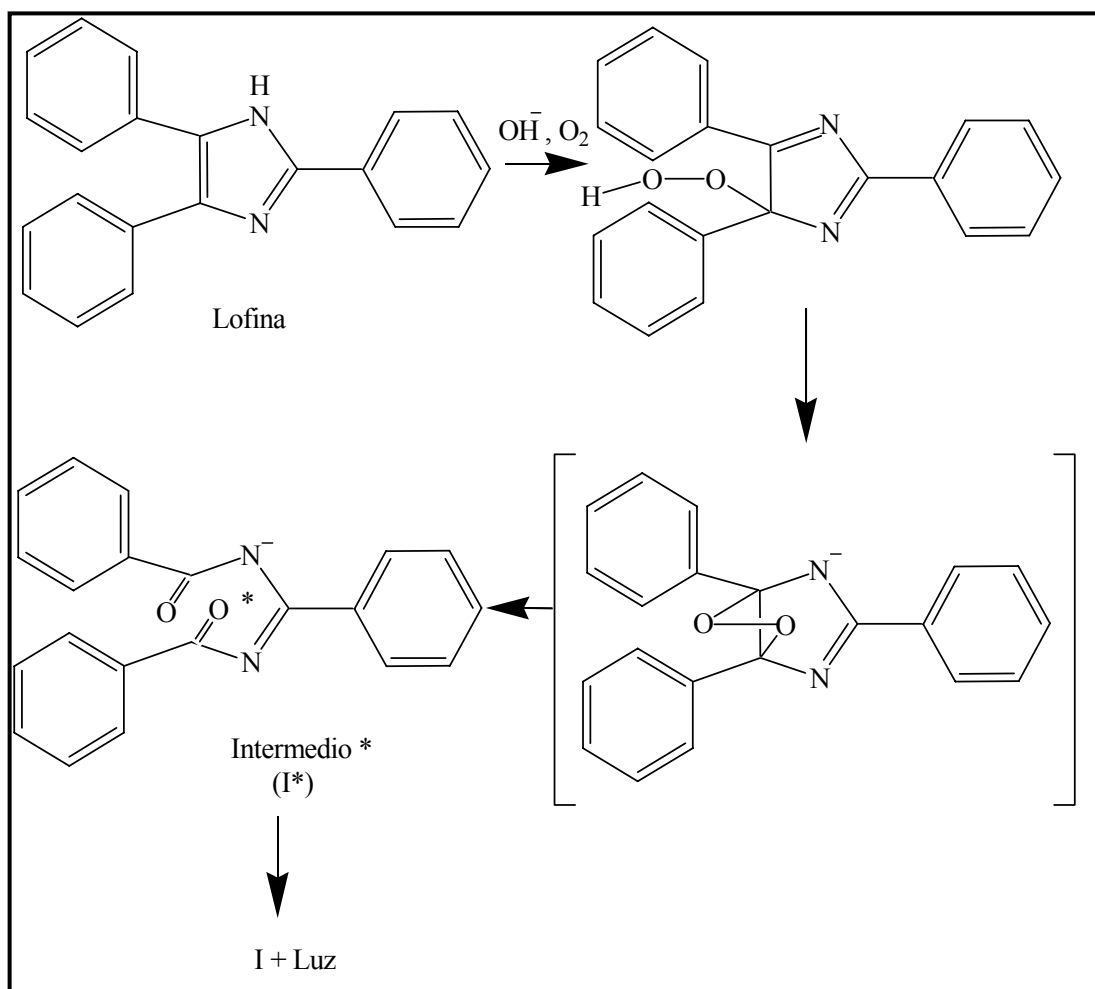


Figura 1.14:Reacción quimioluminiscentes con lofina (imidazoles).

b) Acilhidrazinas

La oxidación quimioluminiscente del luminol (5-aminofthalhidrazida) a 2-aminofthalato provocada por peróxido de hidrógeno, oxígeno, hipoclorito, permanganato o perborato, en disolución básica (pH =10-11) fue descubierta por Albrecht⁸⁹ en 1928. Esta reacción ilustrada en la Figura 1.15, es catalizada por enzimas (ej.: peroxidasa) y un gran número de iones metálicos, de los cuales Cu(II), Co(II), Mn(II) y Fe(II) son especialmente efectivos. Hay que destacar que con algunos catalizadores como el Cr(II), Cu(II), Fe(II) y Ni(II) la quimioluminiscencia producida, es incrementada por la presencia de haluros como el bromuro, cloruro y

fluoruro. Además, el hexacianoferrato (III) puede actuar como catalizador y co-oxidante en la reacción.

La reacción de oxidación del luminol con peróxido de hidrógeno puede aumentar la intensidad quimioluminiscente por un factor de 25000 en presencia de algunos compuestos orgánicos como sales de diazonio. El complejo acetilacetato de oxovanadio (IV) puede aumentar la quimioluminiscencia del luminol, empleando un medio micelar inverso de cloruro de cetiltrimetilamonio, incluso en ausencia de reactivos oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno¹⁰². El dióxido de carbono produce un efecto exaltador en la quimioluminiscencia del luminol en ausencia de oxidante añadido¹⁰³.

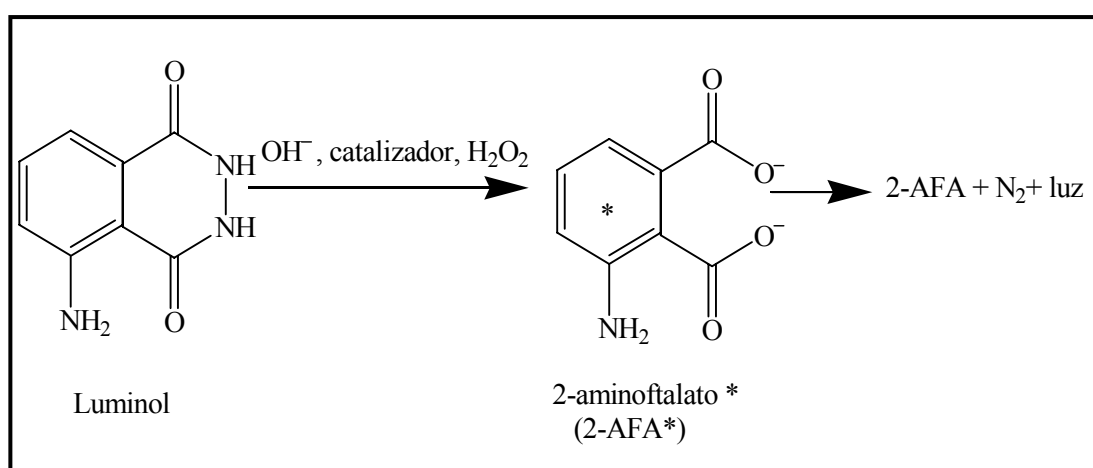
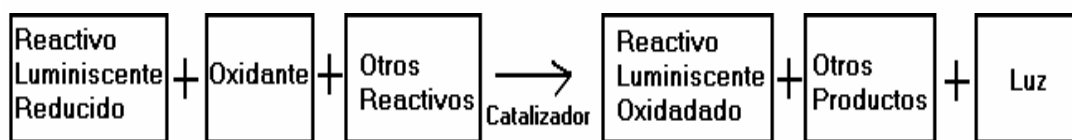


Figura 1.15: Reacción quimioluminiscente con luminol (acilhidrazinas)

El luminol puede reaccionar con agentes reductores para producir quimioluminiscencia en presencia de un catalizador (como hexacianoferrato (III) y hexacianoferrato (II) en disolución alcalina). Este tipo de reacción se ha utilizado para determinar, mediante análisis por inyección en flujo, ácido úrico, alcohol fenacílico, cortisona, ácido ascórbico, corticosterona, glutadiona, cisteína, fructosa, glucosa y creatinina¹⁰⁴.

El proceso general de oxidación del luminol se puede describir mediante el siguiente esquema:



Este esquema muestra el elevado número de variables que intervienen en la reacción y por lo tanto el gran número de posibilidades analíticas que ofrece, que sumado al elevado rendimiento cuántico del proceso lo hace idóneo para explotar estas posibilidades. El analito puede intervenir en estas reacciones quimioluminiscentes como oxidante, catalizador, sensibilizador o incluso se puede convertir en una especie oxidante o en un compuesto luminiscente (“etiquetado” como reactivo luminiscente). Las determinaciones analíticas se pueden extender tanto a sustancias que tienen un efecto indirecto en la reacción, como a aquellas que influyen sobre la concentración del oxidante o del catalizador (inhibidores de la reacción). A continuación se comentarán algunos ejemplos basados en la determinación indirecta del analito mediante la oxidación del luminol, que pueden observarse, a su vez, en la Tabla II.

La determinación del nitroprusiato sódico se basa en la acción de éste como catalizador de la reacción del luminol con el peróxido de hidrógeno en medio alcalino^{105,106}.

Un procedimiento basado en la catálisis indirecta lo constituye la determinación de ácido ascórbico, en la que el analito reduce el Fe(III) a Fe(II) y, a su vez, el hierro ferroso generado cataliza la oxidación del luminol¹⁰⁷. De la misma forma, el complejo Fe(III)-citrato se descompone fotoquímicamente para liberar el catalizador Fe(II) de la oxidación del luminol por H₂O₂¹⁰⁸. En la determinación de la vitamina B₁₂ (cianocobalamina), el analito se acidifica para liberar Co(II) que actúa como catalizador de la reacción con el luminol^{109,110}.

En la determinación de la vitamina B₆ (piridoxina) el analito interacciona en la reacción del luminol como sensibilizador¹¹¹.

El análisis de las moléculas que contienen el grupo tiol aprovecha el hecho de la inhibición de la quimioluminiscencia que causan al provocar la reducción del hipoclorito, que es utilizado por algunos autores como oxidante del luminol¹¹².

El ácido ascórbico se determina fundamentalmente por la inhibición que provoca al consumir parcialmente el oxidante del luminol, bien en disolución¹¹³⁻¹¹⁵ o bien inmovilizado el luminol en una resina de intercambio aniónico¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Entre el grupo de métodos recogidos en la Tabla II, también cabe destacar la utilización de reactores en fase sólida en la que el luminol se inmoviliza con ayuda de una resina aniónica fuerte^{116,117}. En alguno de los casos expuestos también se inmoviliza el agente oxidante¹¹⁸. En la determinación de isoniazida¹¹⁹, la muestra pasa a través de un reactor conteniendo MnO₂; la oxidación del fármaco al pasar por el reactor provoca la liberación de una cantidad equivalente de Mn(II) y su presencia inhibe, en un tanto proporcional, la emisión de radiación causada por la oxidación del luminol mediante H₂O₂ y K₃Fe(CN)₆. En ausencia de este último reactivo, K₃Fe(CN)₆, se observa el efecto contrario.

La reacción del luminol se ha empleado para determinar ATP de forma indirecta y en un sistema por inyección en flujo, para ello, se inmoviliza un enzima por adsorción en una membrana de nitrocelulosa¹²⁰.

Esta reacción también ha sido utilizada para cuantificar alcaloides por la inhibición del sistema H₂O₂-luminol-NH₄(Cr(NH₃)₂(SCN)₄)·H₂O¹²¹.

Se han ensayado diferentes derivados del luminol y en ningún caso se han obtenido, en las mismas condiciones, intensidades de quimioluminiscencia superiores que con el propio luminol¹²².

c) Sales de acridinio

La sal de acridinio más conocida y más ampliamente utilizada en quimioluminiscencia es la lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio). Los primeros estudios de quimioluminiscencia son de Glue y Petsch⁸⁹ en 1935. La oxidación de la lucigenina tiene lugar en medio básico por el peróxido de hidrógeno (Figura 1.16). Esta reacción es catalizada por un gran número de iones metálicos, alguno de los cuales como por ejemplo el Bi(III)⁸² no catalizan la reacción del luminol. El producto de la reacción es insoluble en agua y se deposita en las paredes de los sistemas de flujo y de los detectores, ello genera problemas a la hora de realizar un análisis cuantitativo. Sin embargo, una pequeña cantidad de tensoactivo como el sodio dodecilsulfato, añadida a la disolución de lucigenina^{123,124} previene la precipitación.

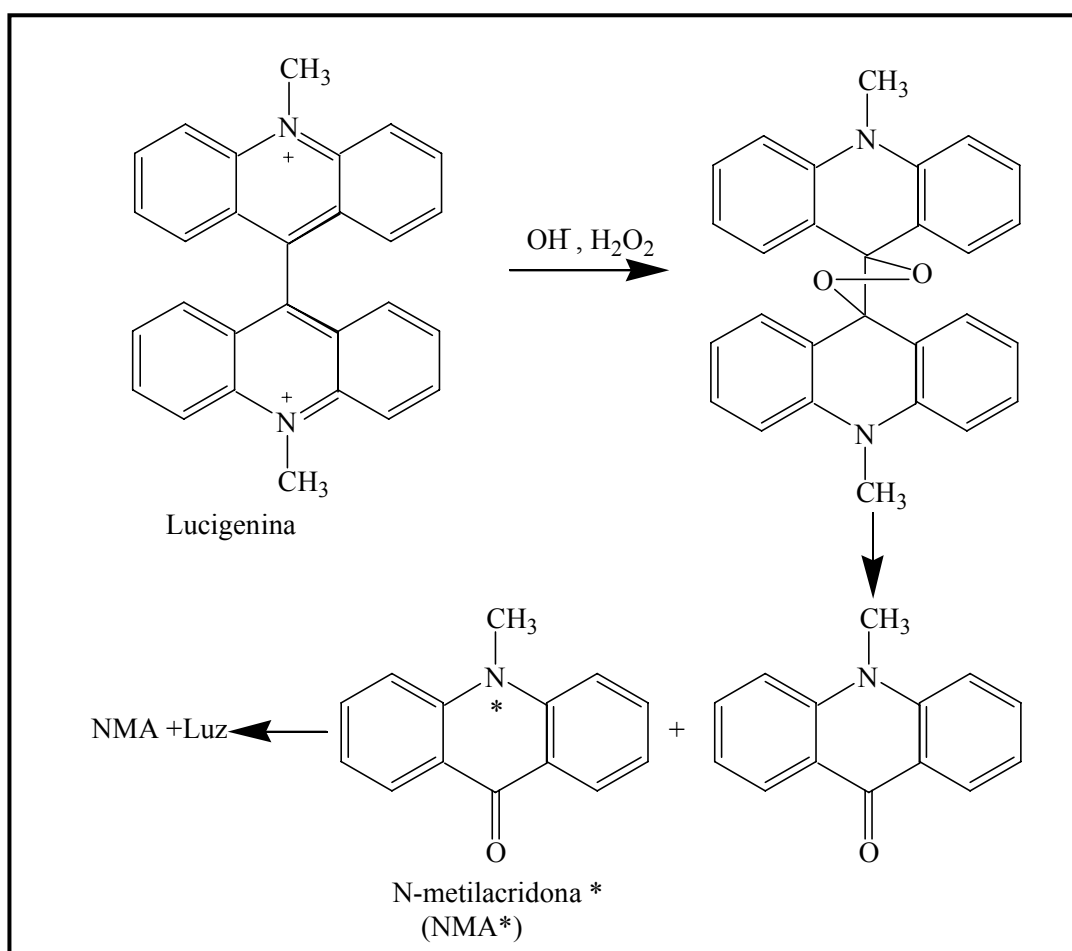


Figura 1.16: Reacción quimioluminiscente con lucigenina (sales de acridinio).

El tensoactivo iónico Brij 35 se ha propuesto en la determinación de ácido ascórbico¹²⁵ e isoprenalina¹²⁶ mediante el sistema de oxidación de la lucigenina.

La determinación de la kanamicina se basa en la inhibición de oxidación de la lucigenina por el peróxido de hidrógeno en presencia de Co(II) como catalizador¹²⁷.

Trabajos recientes¹²⁸ ponen de manifiesto la posibilidad de determinar por quimioluminiscencia directa algunos compuestos de la familia de las acridinas, concretamente acriflavina, proflavina, y amarillo de acridina por oxidación con KMnO₄ en medio ácido sulfúrico. Dichos compuestos habían sido descritos como no quimioluminiscentes, sin embargo, la combinación de F.I.A. con los nuevos modelos de luminómetros está permitiendo éstas y otras muchas aplicaciones de los sistemas con sales de acridinio.

También se ha desarrollado un nuevo método para la determinación de nitrito en aguas en un sistema F.I.A., basado en la inhibición de la quimioluminiscencia de la acriflavina¹²⁹.

d) Ésteres de oxalato

La oxidación quimioluminiscente de ésteres de aril-oxalato, normalmente con peróxido de hidrógeno y en presencia de un fluoróforo como se describe en la Figura 1.17, presenta un rendimiento cuántico de hasta 0.5^{96,130}. Esta reacción fue descubierta por Chandross en 1963⁸⁹. Los sistemas analíticos que se basan en esta reacción se ven menos afectados por parámetros experimentales que los basados en la reacción del luminol, aunque la emisión quimioluminiscente puede verse disminuida por parte de especies fácilmente oxidables tales como bromuro, yoduro, sulfito, nitrito, compuestos organosulfurados y anilidas sustituidas⁹¹.

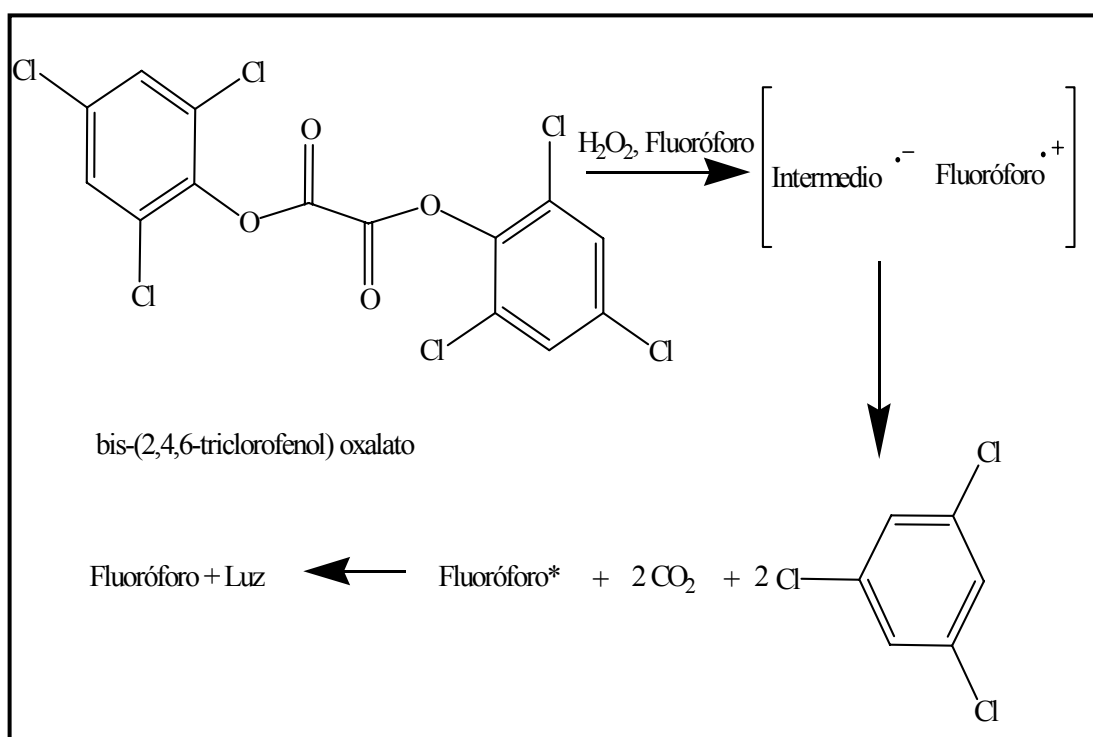


Figura 1.17: Reacción quimioluminiscente con bis-(2,4,6-triclorofeno) oxalato (ésteres de oxalato).

Los ésteres de aril-oxalato más empleados han sido: bis(2,4,6-triclorofenil) oxalato (TCPO) y bis(2,4-dinitrofenil) oxalato (DNPO). La intensidad de la quimioluminiscencia depende del éster que se use y del disolvente y puede ser alterada por la modificación del pH mediante adición de ácidos y bases débiles¹³⁰. El TCPO es más estable pero el DNPO presenta la ventaja de dar lugar a reacciones más rápidas¹³¹. La insolubilidad de ambos en agua y su tendencia a hidrolizarse supone un inconveniente. Por ello, con el fin de aumentar la solubilidad y estabilidad de los reactivos se han usado disolventes orgánicos y mezclas tales como dioxano/agua, terc-butanol/agua, acetonitrilo/agua o acetato de etilo/metanol/agua como medio de reacción. Con la misma finalidad, se han usado también micelas, micelas inversas y agregados de membrana de doble capa⁸². Mediante las micelas inversas se ha podido exaltar la intensidad de emisión correspondiente a la reacción quimioluminiscente del TCPO-H₂O₂ hasta 55 veces, empleando el sistema para determinar fluoróforos tales como el ácido 8-anilinio-1-naftalensulfónico y la rodamina B¹³². Se ha intentado también explotar la insolubilidad en agua de los aril-oxalatos usando

TCPO¹³³ inmovilizado, que se disuelve lentamente con el paso del flujo. Otros estudios han demostrado que otros oxalatos pueden ser más apropiados en algunos casos particulares¹³⁴⁻¹³⁶.

Se han estudiado diferentes catalizadores de la reacción quimioluminiscente del peroxioxalato, empleando el TCPO como reactivo. Estos catalizadores son compuestos heterocíclicos constituidos por imidazoles sustituidos⁹³.

Varios cationes metálicos exaltan la intensidad de quimioluminiscencia de los peroxioxalatos de entre los cuales cabe destacar el Cu(II) como el que causa un mayor incremento¹³⁷.

La reacción de TCPO y DNPO con peróxido de hidrógeno se ha aprovechado para determinar porfirinas en orina¹³⁸.

En la bibliografía se puede encontrar una revisión sobre el empleo de la reacción quimioluminiscente del TCPO en cromatografía líquida y en técnicas de inyección en flujo¹³⁹.

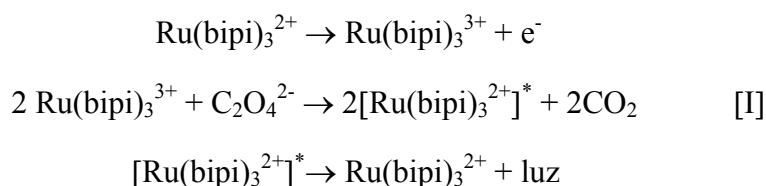
e) Tris (2,2'-bipiridina) rutenio (II)

En el sistema del tris(2,2'-bipiridina) rutenio(II), la emisión naranja centrada en 610 nm proviene del $\text{Ru}(\text{bip})_3^{2+*}$, (bip=2,2'-bipiridina). Esta especie excitada se puede obtener de las siguientes formas:

- a) por reacción de $\text{Ru}(\text{bip})_3^{3+}$ con $\text{Ru}(\text{bip})_3^+$
- b) por reacción de $\text{Ru}(\text{bip})_3^+$ con algunos oxidantes
- c) por reacción del $\text{Ru}(\text{bip})_3^{3+}$ con algunos reductores

La especie estable en disolución es $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ y las otras dos se pueden generar a partir de ella: el $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{+}$ por reducción a potencial -1.3 V (frente Ag/AgCl) y, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ por oxidación a $+1.3 \text{ V}$ aproximadamente.

La reacción con el oxalato se muestra en la ecuación [I]



La especie inicial $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se regenera durante la reacción. El sistema quimioluminiscente del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ proporciona fácilmente un control electroquímico debido a la simple interconversión de los estados de oxidación.

La zona de pH óptima para obtener y medir la quimioluminiscencia del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se encuentra generalmente entre pH 4 y 10. En aplicaciones quimioluminiscentes del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se emplean disolventes tales como agua/acetonitrilo, agua/metanol o agua/acetona. Estos disolventes se pueden emplear como modificadores en HPLC, teniendo en cuenta que a medida que se aumenta la concentración del disolvente orgánico, la intensidad de la señal quimioluminiscente se incrementa, sin aumentos significativos en la línea base. El $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se puede convertir en $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ y éste se puede usar simplemente como cualquier otro reactivo quimioluminiscente en disolución¹⁴⁰.

Existe una gran variedad de aplicaciones (Tabla III) en las que interviene la reacción del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ con reductores; en ellas la muestra se mezcla con el $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$, se inserta en un portador a pH adecuado utilizando un electrodo de Pt, como electrodo de trabajo, frente al de Ag metálica y se mide la quimioluminiscencia generada. En la determinación de los compuestos tiazida¹⁴¹ se emplea un analizador polarográfico para oxidar el $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ a $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$. El oxalato y las aminas

alifáticas (incluyendo aminoácidos, aminas alicíclicas, NADH, y muchos aminoglicósidos o antibióticos tetraciclínicos) se pueden determinar a niveles por debajo de $1 \mu\text{mol l}^{-1}$. Las intensidades quimioluminiscentes para las aminas terciarias son entre 10 y 100 veces mayores que para las aminas secundarias, cuyas intensidades son, a su vez, 10 veces mayores que para las aminas primarias. Las aminas terciarias alifáticas se pueden determinar de 1 pmol o 10 nmol l^{-1} o por debajo. No se ha observado quimioluminiscencia en las aminas aromáticas como anilina o difenilamina. El límite de detección para los aminoácidos varía desde $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ a 1 mmol l^{-1} dependiendo de la estructura.

Debido a que la especie $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ se regenera durante la reacción quimioluminiscente, puede ser una ventaja inmovilizar $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ en la superficie de un electrodo. La especie $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ se puede crear por control del potencial del electrodo; un analito en contacto con el electrodo reacciona con $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ para producir emisión de luz y conversión del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ en $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$, el cual es luego transformado en $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ otra vez por el electrodo¹⁴².

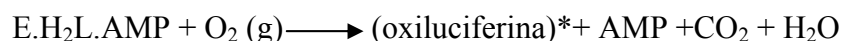
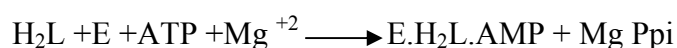
Los derivados del $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ han sido recientemente introducidos como “etiquetas” para inmunoensayos. Se han cuantificado cantidades por debajo de $0.2 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ o 20 attomol en $100 \mu\text{l}$ vía oxidación a $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ en la presencia de triptofilamina. El intervalo dinámico de concentraciones es lineal en 6-7 órdenes de magnitud^{142,143}.

1.4.1.1.2. Sistemas químicos biológicos

La bioluminiscencia es un fenómeno natural procedente de una gran variedad de organismos en los que se incluyen bacterias, hongos, animales y plantas, pero es particularmente significativo en algunas especies marinas. Analíticamente, los dos sistemas bioluminiscentes más empleados son los que producen las luciérnagas *Photinus pyralis* (rendimiento cuántico 0.88¹²³) y las bacterias marinas *Vibrio harveyi* y *Photobacterium fischeri*¹⁴⁴.

Las reacciones bioluminiscentes implican la oxidación de la luciferina catalizada por luciferasas. Luciferina y luciferasa son dos nombres genéricos inventados en 1880 y ampliamente utilizados en nuestros días para reacciones bioluminiscentes. Las luciferasas son enzimas que catalizan la oxidación del sustrato (luciferina), el cual produce luz. Al igual que muchas enzimas, las luciferasas son inestables en disolución pero pueden ser estabilizadas por proteínas como la albúmina.

La cuantificación del adenosín trifosfato⁴ (ATP) se lleva a cabo mediante una reacción bioluminiscente. La reacción del ATP-luciferina es catalizada por una luciferasa, formando inicialmente un adenilato que reacciona con el oxígeno disuelto produciendo el emisor oxiluciferina (y luz), dióxido de carbono y AMP (adenosín monofosfato). El pH tiene una gran influencia sobre la intensidad de luz emitida. La presencia de iones Mg(II) en esta reacción es imprescindible para desencadenar la actividad de la luciferasa. La cantidad de luz emitida es proporcional a la concentración de ATP, por tanto cualquier sustancia relacionada en la producción o disminución de ATP puede ser igualmente cuantificada. Un efecto similar se produce con el empleo de metales divalentes como el Zn(II).



donde:

H₂L: Luciferina

E: Luciferasa

ATP: Adenosin trifosfato

AMP: Adenosin monofosfato.

Ppi: pirofosfato inorgánico.

Existen revisiones de métodos en flujo continuo e inyección en flujo que permiten analizar diferentes sustratos mediante la inmovilización de enzimas y el empleo de sistemas básicos de bioluminiscencia^{145,146}.

1.4.1.1.3. Electro y fotoluminiscencia

Algunos de los fenómenos anteriormente descritos se pueden producir eléctricamente. El fenómeno de la *electroquimioluminiscencia* se origina a partir de una especie generada electroquímicamente. Los reactivos se pueden generar en períodos y lugares exactamente controlados. Los intermedios de reacción generados en el proceso electrolítico tienen por lo general tiempos de vida muy cortos y su acción sobre el seno de la disolución a distancia del electrodo es despreciable. La emisión quimioluminiscente se confina sobre la superficie activa del electrodo y la reacción puede iniciarse y detenerse simplemente por el cambio del potencial del mismo.

Esta técnica de detección ha sido utilizada ampliamente en HPLC y aunque con menos frecuencia también en F.I.A. Comparte las ventajas de las técnicas quimioluminiscentes incluyendo la ausencia de luz dispersa de la fuente y el no

necesitar una instrumentación muy sofisticada, ya que un potenciostato directo es suficiente para excitar el analito. Frecuentemente se argumenta que la técnica supone un ahorro de tiempo frente a la quimioluminiscencia, la cual conlleva la preparación de disoluciones de uno o más reactivos. Una de sus principales ventajas es que permite obtener reactivos redox muy inestables, cuyas disoluciones son prácticamente imposibles de obtener de otro modo.

El luminol produce luminiscencia por la electro-oxidación *in situ* en presencia de oxígeno o peróxido de hidrógeno⁴. La intensidad de la *electroquimioluminiscencia* debida al peróxido se solapa con el ruido de fondo de la emisión del oxígeno. El ruido de fondo, sin embargo, no disminuye el límite de detección del peróxido (aprox. $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). La *electroquimioluminiscencia* neta (después de restarle el ruido de fondo) es máxima a pH 10. El material óptimo para el electrodo en este caso es oro; aunque el electrodo de carbono vítreo aventaja al platino y proporciona un máximo de intensidad a potencial positivo de 0.4-0.6V. La estabilidad de la señal electroquimioluminiscente se puede mejorar utilizando potenciales alternados: el luminol primero se oxida a potencial positivo y luego se reduce en la superficie del electrodo a -0.2V.

El principal inconveniente de la técnica de electroquimioluminiscencia radica en que se puede extinguir a causa del agua presente en el sistema. El trabajo necesario para eliminar completamente la humedad ha incitado la investigación de los mecanismos de reacción y la búsqueda de la utilidad analítica de los sistemas acuosos. Existen muchos métodos selectivos para determinar trazas de metales basados en la electrogeneración del luminol en un electrodo de Pt. Alternativamente el luminol se puede generar usando un electrodo cubierto de óxido de aluminio para multi-determinaciones de trazas de iones inorgánicos, compuestos orgánicos fluorescentes e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Haapakka¹⁴⁷ ha desarrollado un detector basado en un electrodo implantado en un sistema de flujo continuo.

También es posible provocar el fenómeno de la quimioluminiscencia por irradiación de las muestras. La *fotoiniciación* quimioluminiscente del peroxioxalato fue presentada por primera vez en 1990¹⁴⁸. El procedimiento químico clásico basado en la quimioluminiscencia del peroxioxalato presenta reacciones laterales y es muy sensible a parámetros experimentales como la naturaleza del disolvente, pH y temperatura. La fotoiniciación conduce a un procedimiento simplificado por eliminación del peróxido de hidrógeno. El procedimiento puede ser mejorado utilizando imidazol como catalizador. El mecanismo empieza con la abstracción del hidrógeno por el estado triplete excitado (éster oxalato) seguido por adición de oxígeno. La quimioluminiscencia se observa sólo cuando existen especies hidrógeno-donantes presentes. Como dadores de hidrógeno se incluyen los alcoholes, éteres, aldehídos y cetonas. El procedimiento quimioluminométrico puede iniciarse por una lámpara de mercurio de baja presión.

En otros casos, se ha empleado una película fina de óxido de zinc que favorece la fotocatalisis para la generación de peróxidos orgánicos derivados del analito en un reactor fotoquímico. En esta ocasión la fotoiniciación se induce por iluminación bajo luz UV. Mediante este tipo de reacción se han podido determinar ácidos orgánicos y aminas¹⁴⁹.

Los montajes F.I.A. combinados con reactores fotoquímicos y detección quimioluminiscente aunque se han descrito, no han sido ampliamente utilizados¹⁴⁸.

1.4.1.2. Sistemas específicos de quimioluminiscencia

Cabe destacar la importancia de los métodos basados en la oxidación directa del analito por un oxidante fuerte que constituyen un 47% (64 artículos del total 134 artículos) de los trabajos publicados entre 1980 y 2002 en el área (F.I.A.

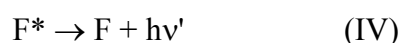
quimioluminiscencia aplicada a los productos farmacéuticos), habiéndose publicado más de la mitad (40 artículos) en los últimos siete años.

Los métodos directos consisten en la generación de la especie responsable de la emisión quimioluminiscente por reacción del analito con oxidantes fuertes (Tabla I). Se trata de una modalidad sencilla basada en un sistema F.I.A. bicanal donde la muestra se inserta en un portador adecuado y confluye con la disolución de oxidante a la entrada de la celda de flujo. Los procedimientos resultantes suelen poseer una elevada sensibilidad y muy bajos límites de detección, habitualmente superiores a los métodos indirectos. Por ejemplo, en el caso de la morfina se llega a detectar una concentración de 28.5 ppt⁹⁴.

Los reactivos utilizados son siempre oxidantes fuertes o moderados de uso corriente, tales como permanganato potásico, Ce(IV), ferricianuro potásico, peróxido de hidrógeno, bromo, hipoclorito sódico, oxígeno y N-bromosuccinimida. Entre todos ellos destacan por el mayor número de trabajos publicados, el permanganato potásico y el Ce(IV), ambos en medio ácido.

La intensidad de la emisión quimioluminiscente puede mejorar mediante el uso de medios organizados (tensoactivos), sensibilizadores o catalizadores de oxidación. Por ejemplo, en la determinación de tetraciclina¹⁵⁰ se ha empleado el tensoactivo CTMAB, con el propósito de proteger el analito y evitar la pérdida de energía en otras formas distintas a la emisión, para producir un incremento en la intensidad de emisión quimioluminiscente de 6 a 8 veces. Entre los sensibilizadores empleados, destacan el sulfato de quinina que se emplea en la determinación de cefadroxil¹⁵¹, tiopronina¹⁵², penicilamina¹⁵³, las rodaminas 6G y B utilizadas en la determinación de captopril¹⁵⁴, hidroclorotiazida¹⁵⁵, ácido fólico¹⁵⁶ y fenotiazinas¹⁵⁷. En la determinación de tiopronina¹⁵⁸ destaca la presencia de ambos sensibilizadores: sulfato de quinina y rodamina 6G.

Aunque el producto de reacción sea capaz de emitir luz, el empleo de estos sensibilizadores (fluoróforos) convierte a los métodos directos en indirectos, pues el producto de la oxidación del analito no es quien emite la luz detectada, sino que transfiere su energía a un aceptor fluorescente responsable final de la emisión. La secuencia inicial se puede considerar como en la reacción (I) (página 43), donde C^* es la especie que se forma en estado electrónicamente excitado; inmediatamente C^* retorna al estado fundamental expulsando un fotón que puede pasar la energía transferida a un fluoróforo apropiado (F) que ha de exhibir características fluorescentes.



Las reacciones con sensibilizadores presentan una serie de ventajas sobre las directas, ya que, el sensibilizador puede ser seleccionado para proporcionar el mejor compromiso entre las longitudes de onda de excitación y emisión, estabilidad química y rendimiento cuántico. En contraste, en la quimioluminiscencia directa todas estas propiedades residen en el producto de la reacción el cual obviamente no puede ser cambiado, lo que hace que presente menor versatilidad en sus aplicaciones.

En cuanto a los catalizadores de oxidación se ha propuesto el Cu(II) que cataliza la oxidación de las tetraciclinas¹⁵⁹ por la mezcla peróxido de hidrógeno y persulfato; y el Mn(II) , que se emplea en la oxidación aeróbica de la adrenalina^{160,161}.

Ocasionalmente, el amoníaco exalta la emisión quimioluminiscente cuando se emplea N-bromosuccinimida como oxidante¹⁶²⁻¹⁶⁴ en medio NaOH . De la misma manera se emplea formaldehído¹⁶⁵ como exaltador de la señal en la oxidación de epinefrina y dopamina por permanganato potásico en medio ácido.

En la Tabla I se puede observar, que la tónica general en las reacciones quimioluminiscentes que emplean permanganato en medio ácido como oxidante, es que sean directas¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ aunque también se puede encontrar alguna reacción sensibilizada¹⁵¹.

En cuanto a las reacciones quimioluminiscentes que emplean Ce(IV) como oxidante, cabe resaltar que la gran mayoría son indirectas. Algunas de ellas utilizan sensibilizadores en la reacción^{155,158} mientras que en otras ocasiones se emplea el sistema Ce(IV) en medio ácido sulfúrico como oxidante y sulfito sódico como la especie excitada que provoca la emisión quimioluminiscente, como es el caso de la determinación de acetato de prednisona¹⁷⁰, clorhidrato de ciprofloxacina¹⁷¹ y de algunos alcaloides cinchona¹⁷². El analito actúa en este sistema como sensibilizador de la señal quimioluminiscente, aceptando la energía transferida por el sulfito oxidado (se ha postulado que la especie excitada es SO_2^*)¹⁷³ y emitiendo a continuación la radiación.

En algunos casos se propone el uso conjunto de más de un oxidante, por ejemplo peróxido de hidrógeno/permanganato potásico en la determinación de reserpina¹⁷⁴ y peróxido de hidrógeno/persulfato potásico en la determinación de las tetraciclinas¹⁵⁹.

1.4.2. Aspectos operativos

Las aplicaciones analíticas tradicionales de la quimioluminiscencia se derivan de reacciones con emisiones de gran intensidad y tiempos de vida del emisor de hasta varios minutos; esto permite efectuar el seguimiento de la reacción con una instrumentación y procedimientos muy simples.

La intensidad de la luz emitida se mide mediante un tubo fotomultiplicador PMT (*photomultiplier tube*). Como habitualmente sólo hay una sustancia en el medio de reacción que emite luz, no se necesita un monocromador para la discriminación de longitudes de onda. Avances recientes en la instrumentación analítica han facilitado la mecanización o automatización de las distintas operaciones: adición del reactivo, adquisición y procesado de datos, el uso de cubetas múltiples, etc. con la mínima modificación del proceso básico.

Existen dos modalidades básicas para realizar medidas de quimioluminiscencia:

- a) Procedimientos en estático .
- b) Procedimientos en flujo, bien sea continuo o segmentado.

1.4.2.1. Procedimientos en estático

En la primera modalidad solamente se mezcla una porción de reactivo(s) quimioluminiscente(s) y de analito. La muestra se coloca en una cubeta que está dentro de una cámara del luminómetro, situada frente a la ventana del PMT y con ayuda de una jeringa se añaden porciones del reactivo quimioluminiscente o bioluminiscente.

En la Figura 1.18 se puede observar la curva de la intensidad de quimioluminiscencia frente al tiempo de reacción. Generalmente, se mide la altura o área de la curva de la intensidad de emisión y se relaciona con la concentración del analito, aunque en algunas ocasiones se utilizan otros valores como la anchura del perfil o la velocidad de decaimiento desde el máximo.

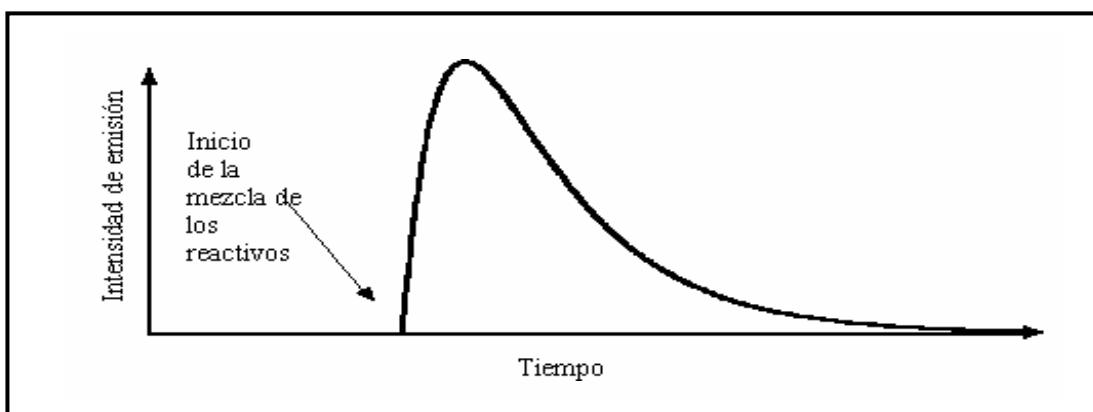


Figura 1.18: Variación temporal de la intensidad de quimioluminiscencia.

1.4.2.2. Procedimientos en flujo continuo

En los métodos en flujo continuo, el reactivo quimioluminiscente y el analito fluyen en continuo por canales separados. Ambos flujos se mezclan en un solo canal (Figura 1.19). La observación se realiza en una posición fijada después de la confluencia. El volumen entre el punto de mezcla y el punto de observación y el caudal del flujo, determinan el tiempo de reacción transcurrido y por tanto el perfil de la intensidad de la emisión quimioluminiscente frente al tiempo de reacción.

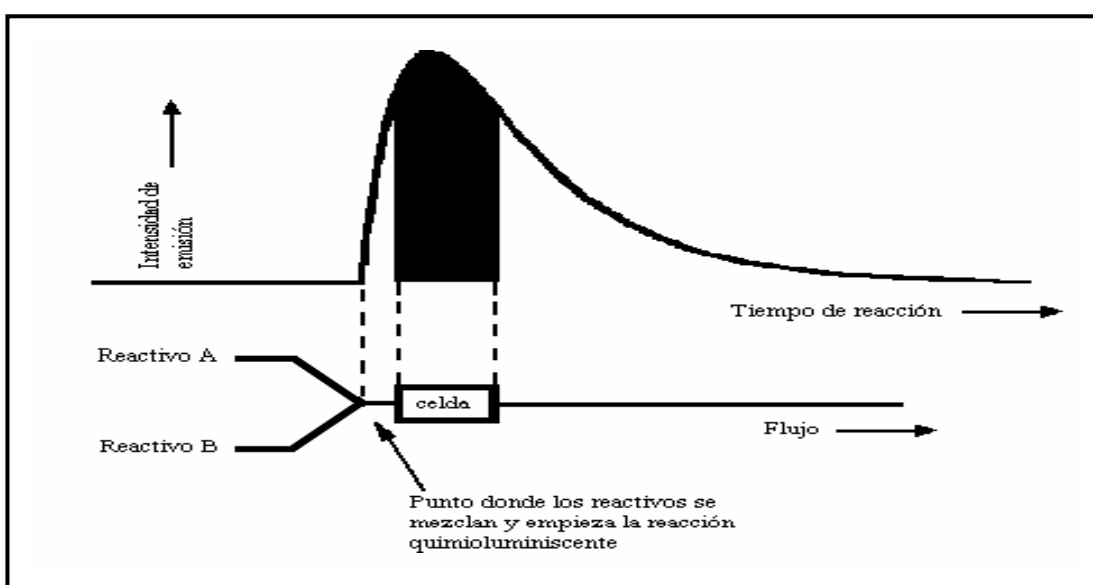


Figura 1.19: Posición de la celda analítica respecto a la intensidad de quimioluminiscencia.

Los elementos esenciales para la determinación quimioluminiscente en flujo continuo son: cámara de mezclado de reactivos, celda de flujo, fotodetector (tubo fotomultiplicador) y un dispositivo electrónico para adquirir y procesar los datos. Muchos instrumentos diseñados para otros propósitos incluyen todos estos elementos y pueden servir para medidas químico y bioluminiscentes. Como resultado de esto, es muy común en el trabajo en F.I.A. el uso de sistemas no específicos modificados adecuadamente, tales como espectrofluorímetros en los que se sustituye el monocromador de emisión por sistemas adecuados para la reflexión total de radiación emitida.

La Figura 1.20 muestra un sistema básico F.I.A. para determinaciones quimioluminiscentes. La muestra se inserta en un portador a un pH apropiado. El reactivo que circula en un canal diferente confluye con el flujo de muestra/portador tan cerca como sea posible de la celda de flujo; una vez en la celda, la emisión resultante de la mezcla de reacción se monotoriza mediante un tubo fotomultiplicador conectado al dispositivo electrónico adecuado.

Experimentalmente, la disposición de los elementos para las determinaciones quimioluminiscentes se optimiza normalmente atendiendo al tipo de conector empleado en la confluencia de flujos y al tamaño y configuración de la celda. Basándose en resultados puramente empíricos, muchos autores indican que las piezas en forma de T son los conectores más eficientes para mezclar dos flujos, mientras que otros opinan que las piezas en forma de Y son igualmente eficientes.

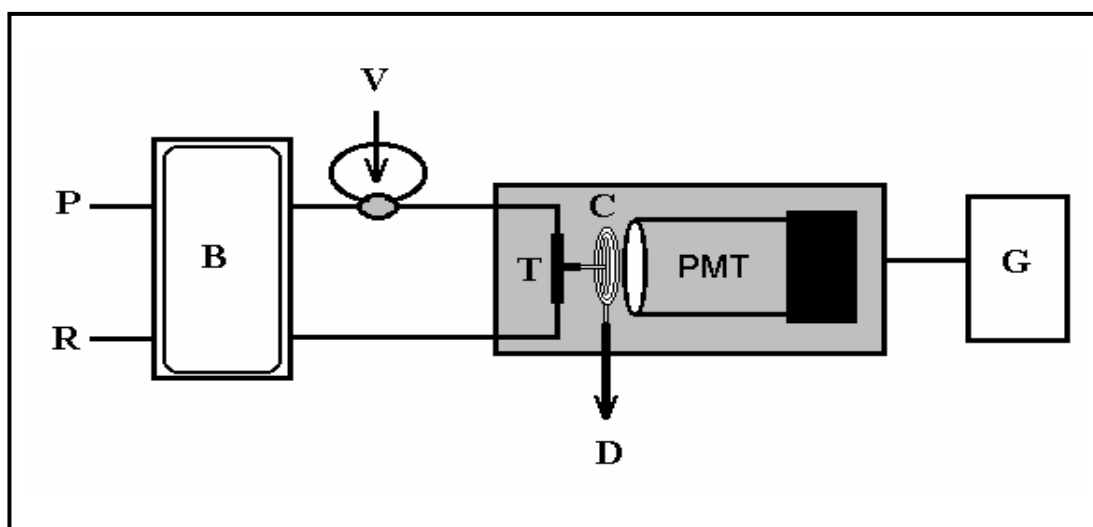


Figura 1.20: Montaje F.I.A. empleado en combinación con detección quimioluminiscente.

P: portador; **R:** reactivos, oxidante y ajuste de medio; **B:** bomba peristáltica; **V:** válvula de inyección de muestra; **T:** conector en forma de T; **C:** celda de flujo; **PMT:** tubo fotomultiplicador; **G:** registrador; **D:** desecho.

1.4.2.3. Reacción muestra-reactivo

La reacción quimioluminiscente en un sistema F.I.A. tiene lugar al confluir dos flujos que contienen la muestra y el reactivo respectivamente. El mezclado debe ocurrir cerca de la celda por razones cinéticas. Las medidas de quimioluminiscencia se pueden hacer unas décimas de segundo inmediatamente después del mezclado, esto es particularmente útil para monitorizar cinéticas (reacción y emisión) rápidas.

Los sistemas heterogéneos en los que alguno de los reactivos que intervienen en el proceso quimioluminiscente se inmoviliza (física o químicamente) sobre un soporte sólido tienen también un gran interés analítico⁹⁵. La emisión quimioluminiscente depende tanto de la cinética de la reacción como de la eficacia de los procesos de transferencia de masas que entran en juego cuando los reactivos se ponen en contacto. Este tipo de sistemas ha sido ampliamente usado para inmovilizar

enzimas sobre soportes sólidos y presentan muchas ventajas como menor consumo de reactivos en ocasiones caros, aumento de la estabilidad del enzima y compatibilidad con sistemas en flujo continuo automatizados.

La modalidad de flujo detenido constituye una técnica valiosa en asociación con el F.I.A. y otras técnicas en flujo. Después de mezclarse la muestra y el reactivo eficientemente, la mezcla de reacción se detiene en la celda de flujo con el fin de realizar medidas basadas en curvas intensidad de emisión frente al tiempo. La información cinética se obtiene de la señal completa (de la velocidad de ascenso y decaimiento) y se puede relacionar con la concentración del analito con una precisión y selectividad mayores que la altura o el área de la curva intensidad de emisión-tiempo¹⁷⁵.

La combinación de la detección quimioluminiscente con cromatografía líquida es potencialmente la mejor opción ya que de esta forma se consigue por un lado la sensibilidad de la detección quimioluminiscente y por otro la selectividad propia de las técnicas cromatográficas. A este respecto cabe decir que el uso de la cromatografía líquida capilar usando sílice fundida empacada es muy prometedor⁸².

1.4.2.4. Celdas de flujo

El diseño de la celda es una de las variables de mayor interés. De hecho, la situación y la distancia al detector debe ser altamente reproducible.

En 1981 Seitz¹⁷⁶ estudió varias celdas para medidas quimioluminiscentes en flujo continuo y determinó cual era la más adecuada para cada tipo de técnica. El diseño más frecuentemente usado en F.I.A. es una espiral plana (Figura 1.21) que se sitúa tan cerca como sea posible del tubo fotomultiplicador (PMT).

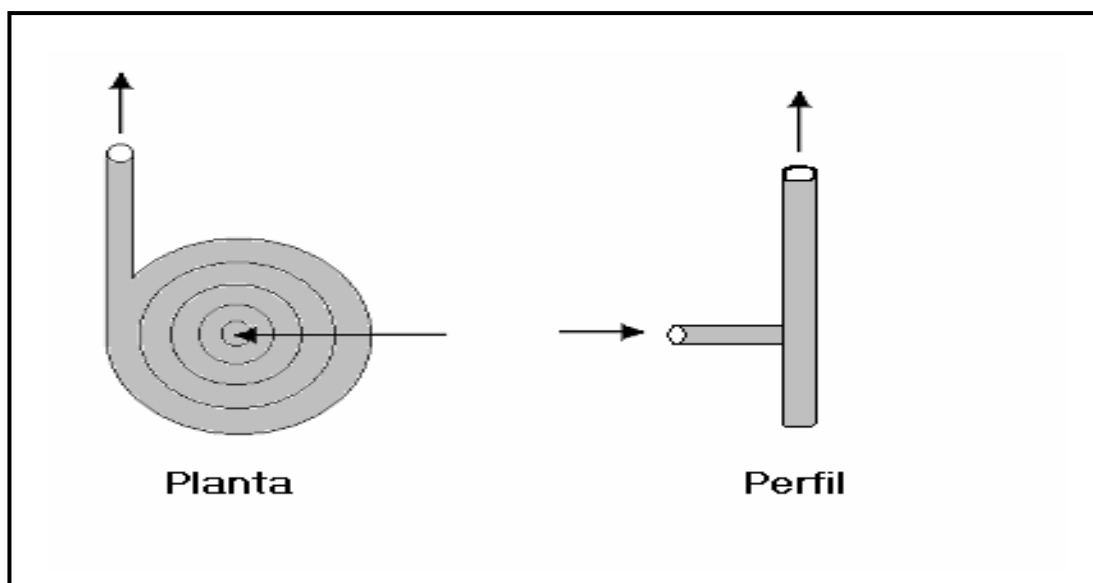


Figura 1.21: Diseño más actual de la celda de flujo en un sistema F.I.A. con detección quimioluminiscente.

La premisa fundamental, en el momento de diseñar una celda, es que la máxima intensidad de luz debe emitirse mientras la mezcla analito-reactivo este delante del detector. Esto exige un mezclado rápido (particularmente en reacciones rápidas) y una celda que tenga un volumen apropiado para que el pico de emisión se pueda medir. La señal analítica se ve incrementada al aumentar la longitud de la espiral; la longitud mínima aceptable vendrá dada por la velocidad de reacción. No se obtiene ninguna ganancia adicional si se utiliza una longitud de tubo innecesaria. Para minimizar la dispersión de la muestra, la válvula de inyección y la celda se deben situar entre sí lo más cerca posible, a menos que el portador tenga funciones de reactivo, en cuyo caso el camino de reacción deberá ser optimizado para obtener el mejor compromiso entre la reacción y la dispersión¹⁷⁷.

En comparación con las celdas de flujo utilizadas en otros métodos espectrofotométricos (absorción y emisión), las celdas de quimioluminiscencia tienen volúmenes muy grandes, debido en parte a la necesidad de recoger una mayor cantidad de luz emitida^{82,178}.

Se han desarrollado nuevos tipos de celdas quimioluminométricas con la finalidad de exponer al tubo fotomultiplicador una gran superficie de reacción con el mínimo volumen de celda posible. Otra celda que se ha utilizado en electroquímica es la de capa fina obtenida al situar en forma de “sandwich” un espaciador delgado (el cual determina el volumen de la celda) entre una delantera transparente de plexiglas y una pieza de teflón en la parte trasera. El área expuesta al detector es de 0.5 x 1.5 cm y el volumen de la celda es de 40 μl ¹⁷⁹. Más recientemente se ha descrito otra celda de flujo que consiste en un disco rotatorio para facilitar la reacción y por tanto la exaltación de la señal¹⁸⁰. El disco y el cuerpo de la celda se elaboran con PTFE; en la parte superior de la misma se ajustan dos entradas y una salida para el paso de la disolución. La superficie del disco se pule suavemente para reducir la dispersión y aumentar la reflexión de la luz.

1.4.2.5. Detectores

Los detectores adecuados para una gran variedad de aplicaciones quimioluminiscentes son los basados en tubos fotomultiplicadores (PMTs) donde los fotones incidentes causan la emisión de electrones por parte del fotocátodo y los electrones emitidos son amplificados en cascada. Aunque los PMTs son menos eficientes que los contadores de centelleo líquido (LSCs), continúan siendo los detectores más utilizados para este propósito. Debido a que la respuesta espectral no es uniforme, el tubo fotomultiplicador usado debe poseer una respuesta apropiada a la longitud de onda o el intervalo de longitudes de onda donde se emite la radiación¹⁸¹.

Cuando se tiene una intensidad de quimioluminiscencia baja, la precisión de la medida depende del tubo fotomultiplicador utilizado. Por este hecho, el PMT escogido debe dar la máxima relación señal-ruido de fondo, la cual a su vez depende de la diferencia de potencial a la que se somete el mismo y que debe ser optimizada.

Con emisiones quimioluminiscentes fuertes la señal del detector incluso se puede medir analógicamente, mediante un polímetro o un registrador adecuado.

Los contadores de centelleo líquido (LSCs) proporcionan mejor relación señal-ruido de fondo y se basan, esencialmente, en dos canales de contadores de fotones provistos de un discriminador variable. La muestra se sitúa entre los dos detectores para asegurar una alta eficiencia óptica. El discriminador se ajusta para la transmisión de los impactos de los fotones y el rechazo de pequeños pulsos del ruido de fondo. Este tipo de detector funciona muy bien con intensidades de quimioluminiscencia bajas, pero da errores de contaje por saturación y proporciona relaciones no lineales entre la intensidad quimioluminiscente y el número de cuentas total. Esta última deficiencia se podría subsanar con una dilución apropiada de reactivos y muestra, por disminución de la velocidad de reacción o reduciendo la fracción de luz que se transmite.

Independientemente del detector empleado, puede surgir un elevado ruido de fondo si se requiere una excesiva amplificación de la señal. Por ejemplo, en la reacción del peroxioxalato, la quimioluminiscencia generada es muy débil en ausencia de sensibilizador¹⁸² y requiere una gran amplificación; esto produce un elevado ruido de fondo y como consecuencia disminuye la relación señal-ruido de fondo. Finalmente, se podría advertir que el ruido de fondo también puede surgir a causa de otras variables experimentales¹⁸³ y del sistema químico.

Tabla I: Oxidación del analito con oxidantes fuertes

Analito	Oxidante / Medio <i>Comentarios</i>	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Clorpromazina Imipramina	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄	Orina	0.79 - 88.8 mg l ⁻¹ (0.63 mg l ⁻¹) 0.17 - 28.0 mg l ⁻¹ (0.14 mg l ⁻¹)	1.2 % (100 h ⁻¹) 1.0 % (85 h ⁻¹)	184
Codeína	KMnO ₄ / ácido polifosfórico	F.F.	5 × 10 ⁻⁵ - 1 × 10 ⁻² mol l ⁻¹ (2 × 10 ⁻⁷ mol l ⁻¹)	1.4 %	185
Morfina	KMnO ₄ / ácido tetrafosfórico	Extracto de alcaloides de la papaverina	3.5 × 10 ⁻⁶ - 3.5 × 10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (5 × 10 ⁻⁸ mol l ⁻¹)	0.4 - 1.4 %	186
(1) Epinefrina (2) Norepinefrina (3) Dopamina (4) L-Dopa	KMnO ₄ / medio ácido <i>Reacción exaltada con formaldehído.</i>	F.F.	(1) 5 × 10 ⁻⁸ - 1 × 10 ⁻⁶ g ml ⁻¹ (3 × 10 ⁻⁸ g ml ⁻¹) (2) 1 × 10 ⁻⁷ - 1 × 10 ⁻⁶ g ml ⁻¹ (5 × 10 ⁻⁸ g ml ⁻¹) (3) 1 × 10 ⁻⁷ - 1 × 10 ⁻⁶ g ml ⁻¹ (4 × 10 ⁻⁸ g ml ⁻¹) (4) 5 × 10 ⁻⁸ - 1 × 10 ⁻⁶ g ml ⁻¹ (3 × 10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)	(1) 1.2 % (2) 1.1 % (80 h ⁻¹) (3) 0.5 % (4) 1.2 %	165
Loprazolam	KMnO ₄ / ácido fórmico	F.F. (tabletas)	1 × 10 ⁻⁵ - 5 × 10 ⁻³ mol l ⁻¹ (7 × 10 ⁻⁶ mol l ⁻¹)		187
Clorhidrato de buprenorfina	KMnO ₄ / ácido polifosfórico	F.F. (tabletas)	1 × 10 ⁻⁸ - 1 × 10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (1 × 10 ⁻⁸ mol l ⁻¹)	0.7 % (>180 h ⁻¹)	188
Morfina	KMnO ₄ / ácido tetrafosfórico	Sangre y orina	1 × 10 ⁻¹⁰ - 1 × 10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (1 × 10 ⁻¹⁰ mol l ⁻¹)	1.8 % (150 h ⁻¹)	94
Tetraciclina	KMnO ₄ / HCl <i>Se emplea octilfenil poliglicol éter (OP) como medio micelar exaltado.</i>	F.F.	1 - 1000 µg ml ⁻¹ (0.40 µg ml ⁻¹) tetraciclina (0.52 µg ml ⁻¹) oxitetraciclina (0.60 µg ml ⁻¹) clortetraciclina	< 2.3 %	189
Ácido ascórbico (Vitamina C)	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄	Zumos y suplementos nutricionales	5 × 10 ⁻⁷ - 1 × 10 ⁻³ mol l ⁻¹		166
Cefadroxil monohidrato	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄ <i>Reacción sensibilizada con quinina.</i>	F.F. (cápsulas, suspensiones) y fluidos biológicos (plasma y orina)	0.1 - 30 µg ml ⁻¹ (0.05 µg ml ⁻¹)	(150 h ⁻¹)	151

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas.

Tabla I: (Continuación)

Analito	Oxidante / Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Medazepam	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄		3.7×10 ⁻⁵ -1.7×10 ⁻³ mol l ⁻¹ (1.85×10 ⁻⁵ mol l ⁻¹)	0.15 % (100 h ⁻¹)	167
Riboflavina	KMnO ₄ / ácido polifosfórico <i>El Na₂S₂O₄ mezclado con la muestra aumenta la intensidad de QL.</i>	F.F. (tabletas e inyecciones)	2×10 ⁻⁷ - 1×10 ⁻⁵ g ml ⁻¹ (6.2×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)	1.49 - 1.62 %	190
Clorhidrato de Piridoxina (Vitamina B ₆)	KMnO ₄ / ácido polifosfórico <i>El Na₂S₂O₄ mezclado con la muestra aumenta la intensidad de QL.</i>	F.F. (tabletas e inyecciones)	1×10 ⁻⁷ - 8×10 ⁻⁵ g ml ⁻¹ (5.8×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)	1.1 %	191
Levodopa	KMnO ₄ / ácido polifosfórico	F.F. (tabletas)	0.4 – 80 mg l ⁻¹ (62 µg l ⁻¹)	1.6 % (120 h ⁻¹)	168
Tetrahidropalmatina	KMnO ₄ / ácido polifosfórico	F.F. (tabletas)	1×10 ⁻⁸ - 8×10 ⁻⁶ g ml ⁻¹ (3.2×10 ⁻⁹ g ml ⁻¹)	1.4 %	169
Reserpina	KMnO ₄ y H ₂ O ₂ / ácido polifosfórico	F.F. (inyecciones)	1×10 ⁻⁶ - 8×10 ⁻⁵ g ml ⁻¹ (3×10 ⁻⁷ g ml ⁻¹)	1.3 %	174
Esteroides			(1) 0.5-20 µg ml ⁻¹ (0.3 µg ml ⁻¹) (2) 0.5- 5 µg ml ⁻¹ (0.3 µg ml ⁻¹) disolvente agua		
(1) Cortisona			(3) 0.5 – 5 µg ml ⁻¹ (0.4 µg ml ⁻¹)	(3) 0.5 - 2.3 %	192
(2) Hidrocortisona	BrO ₃ ⁻ - SO ₃ ²⁻ / H ₂ SO ₄		(4) 0.5 – 6 µg ml ⁻¹ (0.3 µg ml ⁻¹) (5) 0.5 – 6 µg ml ⁻¹ (0.1 µg ml ⁻¹) disolvente acetona 4% (v/v)		
(3) Progesterona					
(5) Testosterona					
(5) Corticosterona					
Amilorida	N-bromosuccinimida / medio básico	F.F.	0.5 – 15 µg ml ⁻¹ (0.16 µg ml ⁻¹) 2 – 30 µg ml ⁻¹ (1.61 µg ml ⁻¹)	0.4 – 3.4 % 0.6 - 2.2 % (250 h ⁻¹) (F.C.)	193
Estreptomicina					
Isoniazida	N-bromosuccinimida / NaOH <i>La emisión se exalta por la presencia de amoníaco.</i>	F.F. (tabletas)	0.050 - 20 µg ml ⁻¹ (0.024 µg ml ⁻¹)	0.9 - 3% (112 h ⁻¹) (F.C.)	164

Ref: Referencia bibliográfica. F.F: Formulaciones farmacéuticas. F.C: Flujo continuo. QL: Quimioluminiscencia.

Tabla I: Continuación

Analito	Oxidante / Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
(1) Sulfato de dihidralazina	N-bromosuccinimida / medio básico	F.F. (cápsulas, tabletas,	(1) 2 - 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1.23 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(1) 0.4 - 1.1 %	162
(2) Rifampicina	La emisión se exalta por la presencia de amoniaco.	suspensiones, inyecciones)	(2) 0.02 - 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.0017 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(2) 1.1 - 2.1 %	
(3) Rifamicina			(3) 0.005 - 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.0005 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(3) 1.5 - 4.0 % (105 h^{-1}) (F.C.)	
Tetraciclinas					
(1) Tetraciclina	N-bromosuccinimida / medio básico	F.F. y miel	(1) 0.05 - 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.0049 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(1) 0.4 - 1.2 %	163
(2) Oxitetraciclina	La emisión se exalta por la presencia de amoniaco.		(2) 0.5 - 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(2) 0.7 - 1.3 %	
(3) Doxiciclina			(3) 0.5 - 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.23 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(3) 1.6 - 4.0 %	
(4) Clortetraciclina			(4) 0.5 - 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.22 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(4) 1.3 - 4.2 %	
(5) Demeclociclina			(5) 0.3 - 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.002 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(5) 0.9 - 3.1 % (130 h^{-1}) (F.C.)	
Pirogalol	N-bromosuccinimida / medio básico Emisión exaltada por cloruro de hidroxil amonio y un tensoactivo catiónico (CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio).		5×10^{-7} - 3×10^{-5} mol l^{-1} (2×10^{-7} mol l^{-1})	1.6 - 2.1 % (60 h^{-1})	194
Tetraciclina Clorhidrato	Br_2 / medio básico		5×10^{-5} - 1×10^{-2} mol l^{-1} (4×10^{-5} mol l^{-1})	0.86 %	195
Tetraciclinas	H_2O_2 / NH_3 Reacción catalizada por ion cobre. Como agente co-oxidante se emplea persulfato.	F.F.	(1) 0.25 - 25 nmol (0.1 nmol) (2) 25 - 2500 pmol (0.01 nmol) (3) 0.25 - 25 nmol (0.1 nmol) (50 μl inyección)		159
Adrenalina (Epinefrina)	O_2 +Mn (II) (catalizador) Oxidación aeróbica del analito.	F.F.	(3×10^6 mol l^{-1})	3.5 %	160
Adrenalina (Epinefrina)	O_2 +Mn (II) (catalizador) / medio básico Oxidación aeróbica del analito exaltada por tensoactivos.	F.F. y orina	1×10^{-8} - 1×10^{-4} mol l^{-1} (1×10^{-9} mol l^{-1})	0.9 % (100 h^{-1})	161

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **F.C:** Flujo continuo.

Tabla I: (Continuación)

Analito	Oxidante / Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Tiamina (Vitamina B ₁)	Fe(CN) ₆ ³⁻ / medio básico	F.F. (tabletas, inyecciones, elixires)	2×10 ⁻⁵ - 5×10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (9×10 ⁻⁶ mol l ⁻¹)	0.7 - 1.8 % (112 h ⁻¹) (F.C.)	196
Tetraciclinas					
(1) Tetraciclina	Fe(CN) ₆ ³⁻ / medio básico	F.F. (tabletas)	(1) 0.1 - 1.2 µg ml ⁻¹ (0.04 µg ml ⁻¹)		
(2) Clortetraciclina	<i>Oxidación después de una degradación ácida.</i>	F.F. (tabletas y cápsulas)	(2) 0.1 - 10 µg ml ⁻¹ (0.2 µg ml ⁻¹)	1 - 1.6 % (70 h ⁻¹) (F.C.)	197
(3) Oxitetraciclina			(3) 1 - 10 µg ml ⁻¹ (0.5 µg ml ⁻¹)		
(4) Doxiciclina			(4) 1 - 10 µg ml ⁻¹ (0.1 µg ml ⁻¹)		
Penicilamina	Ce(IV) / H ₂ SO ₄ <i>Sensibilizada con quinina.</i>	F.F. (tabletas)	2×10 ⁻⁶ - 2×10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (15×10 ⁻¹² mol) (50 µl inyección)	< 4 % (720 h ⁻¹)	153
Captopril	Ce(IV) / H ₂ SO ₄ <i>Sensibilizada con rodamina 6G.</i>	F.F. (tabletas)	1×10 ⁻⁶ - 2×10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (2×10 ⁻⁷ mol l ⁻¹)	2.8 % (500 h ⁻¹)	154
Ácido fólico	Ce(IV) / medio ácido <i>Sensibilizada con rodamina B.</i>	F.F.	1×10 ⁻⁸ - 1×10 ⁻⁵ mol l ⁻¹ (1×10 ⁻⁸ mol l ⁻¹)	0.54 % (180 h ⁻¹)	156
Hydroclorotiazida	Ce(IV) / H ₂ SO ₄ <i>Sensibilizada con rodamina 6G.</i>	F.F. (tabletas)	0.33 - 130 µmol l ⁻¹ (0.15 µmol l ⁻¹)	2.4 % (200 h ⁻¹)	155
Tiopronina	Ce(IV) / H ₂ SO ₄ <i>Se emplea rodamina 6G y quinina como sensibilizadores.</i>	F.F.	1×10 ⁻⁷ - 7×10 ⁻⁵ mol l ⁻¹	(80 h ⁻¹)	158
Fenotiazinas					
(1) Clorhidrato de flufenazina	Ce(IV)/ HClO ₄ <i>Sensibilizada por rodamina B.</i>	F.F. (tabletas) y fluidos biológicos (plasma y orina)	(1) 0.5 - 90 µg ml ⁻¹ (0.01 µg ml ⁻¹) (2) 0.1 - 6.5 µg ml ⁻¹ (0.1 µg ml ⁻¹) (3) 0.1 - 6.5 µg ml ⁻¹ (0.1 µg ml ⁻¹)	(1) (180 h ⁻¹) (2) (129 h ⁻¹) (3) (138 h ⁻¹)	157

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **F.C:** Flujo continuo.

Tabla I: (Continuación)

Analito	Oxidante / Medio Comentarlos	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr-%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Captopril	Ce(IV) / H ₂ SO ₄ <i>Sensibilizada por rodamina 6G.</i>	F.F. (tabletas)	0.1 – 6 µmol l ⁻¹ (0.037 µmol l ⁻¹)		198
Tiopronina	Ce(IV) / H ₂ SO ₄ <i>Sensibilizada por quinina.</i>	F.F.	1- 400 µmol l ⁻¹ (0.34 µmol l ⁻¹)	< 2 %	152
Hidrocortisona Progesterona	Ce(IV) / H ₂ SO ₄		0.28 – 8.0 µg ml ⁻¹ (0.1 µg ml ⁻¹) 0.5 – 8.0 µg ml ⁻¹ (0.26 µg ml ⁻¹)		199
Paracetamol	Ce(IV) / HClO ₄	F.F. (tabletas)	1×10 ⁻⁶ - 1×10 ⁻⁵ g ml ⁻¹ (7×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)	0.2 - 0.7 % (F.C.)	200
Ciclamato sódico (endulzante)	Ce(IV)-sulfito / H ₂ SO ₄		1 – 50 µg ml ⁻¹ (1 µg ml ⁻¹)	1.0 - 2.8 % (100 h ⁻¹)	201
Acetato de prednisona	Ce(IV)-sulfito / H ₂ SO ₄	F.F. (tabletas)	0.2 – 20 mg l ⁻¹ (0.031 mg l ⁻¹)	1.8 %	170
Clorhidrato de ciprofloxacina	Ce(IV)-sulfito / H ₂ SO ₄	F.F. (tabletas y cápsulas)	1 – 20 mg l ⁻¹ (0.27 mg l ⁻¹)		171
Alcaloides Cinchona					
(1) Quinina	Ce(IV)-sulfito / H ₂ SO ₄		(1) 4×10 ⁻⁸ - 1×10 ⁻⁴ g ml ⁻¹ (1×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)		172
(2) Quinidina			(2) 1×10 ⁻⁷ - 1×10 ⁻³ g ml ⁻¹ (4×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)		
(3) Cinchonina			(3) 1×10 ⁻⁶ - 8×10 ⁻⁴ g ml ⁻¹ (6×10 ⁻⁷ g ml ⁻¹)		
Esteroides					
(1) Cortisona			(1) 0.1- 1 µg ml ⁻¹ (0.04 µg ml ⁻¹)	(1) 1.3 - 4.9 %	202
(2) Hidrocortisona			(2) 0.1 - 1 µg ml ⁻¹ (0.028 µg ml ⁻¹)		
(3) Prednisona			(3) 0.1 - 1 µg ml ⁻¹ (0.016 µg ml ⁻¹)	(3) 1.6 - 6.2 % (40 h ⁻¹) (F.C.)	
(4) Metilprednisona			(4) 0.1 - 1 µg ml ⁻¹ (0.021 µg ml ⁻¹)		
(5) Dexametasona			(5) 0.5 - 5 µg ml ⁻¹ (0.16 µg ml ⁻¹)		
(6) Betametasona			(6) 0.5 - 5 µg ml ⁻¹ (0.3 µg ml ⁻¹)		
Proflavina Acriflavina	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄	Agua	0.05-12 µg ml ⁻¹ (10 ng ml ⁻¹)	0.9 % (48 h ⁻¹)	203

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **F.C:** Flujo continuo.

Tabla I: (Continuación)

Analito	Oxidante / Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Esteroides			(1) 0.02 - 0.5 µg ml ⁻¹ (0.013 µg ml ⁻¹) (2) 0.02 - 1.0 µg ml ⁻¹ (0.019 µg ml ⁻¹) (3) 0.2 - 5.0 µg ml ⁻¹ (0.17 µg ml ⁻¹) disolvente agua	(1) 0.011 - 0.75 % (100 h ⁻¹)	
(1) Cortisona					
(2) Hidrocortisona					
(3) Dexametasona					
(4) Prednisolona	Ce(IV)-sulfito / H ₂ SO ₄	F.F.	(4) 1.0 - 20.0 µg ml ⁻¹ (0.59 µg ml ⁻¹) (5) 1.0 - 20.0 µg ml ⁻¹ (0.59 µg ml ⁻¹) (6) 1.0 - 20.0 µg ml ⁻¹ (0.96 µg ml ⁻¹) (7) 1.0 - 20.0 µg ml ⁻¹ (0.6 µg ml ⁻¹) (8) 1.0 - 20.0 µg ml ⁻¹ (0.63 µg ml ⁻¹) (9) 2.0 - 20.0 µg ml ⁻¹ (0.3 µg ml ⁻¹) disolvente acetonitrilo 2% (v/v)		204
(5) Metilprednisolona					
(6) Progesterona					
(7) Corticosterona					
(8) Testosterona					
(9) Betametasona					
Clortetraciclina	H ₂ O ₂ / medio básico Reactivo catalítico Cu(II) - carbonato amónico - bromuro de cetiltrimetil amonio.	Orina	40 nmol l ⁻¹ - 4 µmol l ⁻¹	1.7 - 4.1 %	205
Tetraciclina	H ₂ O ₂ -Cu(II) (catalizador) / NH ₃ Degradación del analito en medio básico. La intensidad QL puede incrementarse de 6-8 veces añadiendo CTMAB a la disolución.	F.F. (tabletas)	2 × 10 ⁻⁷ - 8 × 10 ⁻⁵ mol l ⁻¹	(F.C.)	150
Adrenalina	Mn(III)-tetraakis-(4-sulfonatofenil)-porfirina / medio básico. Oxidante inmovilizado en una membrana de cloruro de adioctadecil-dimetilamonio incorporada dentro de una película de PVC.	F.F.	3 × 10 ⁻⁶ - 3 × 10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (3 × 10 ⁻⁶ mol l ⁻¹) (20 µl inyección)	1 % (40 h ⁻¹)	206
Dipiridamol	Hipoclorito/ medio ácido La presencia de Triton X-100 exalta la señal quimioluminiscente.	F.F. (inyecciones y tabletas)	0.04 - 10 µg ml ⁻¹ (11 ng ml ⁻¹)	2.7 %	207
Tirosina	Fe(CN) ₆ ³⁻ / medio básico. Rección exaltada con ácido fórmico y β-ciclodextrina.	F.F. (inyecciones)	1-10 mg l ⁻¹ (50.0 µg l ⁻¹)	3.14% (98 h ⁻¹)	208

Ref: Referencia bibliográfica. F.F: Formulaciones farmacéuticas. F.C: Flujo continuo. QL: Quimioluminiscente.

Tabla I: (Continuación)

Analito	Oxidante / Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Salicilamida	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄ <i>El sistema se termostatiza a 80°C.</i>	F.F. y Orina	0.03-8 µg ml ⁻¹ (0.02 µg ml ⁻¹)	0.7% (142 h ⁻¹)	209
Fenilefrina	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄ <i>El sistema se termostatiza a 80°C.</i>	F.F.	0.03-1 µg ml ⁻¹ (0.02 µg ml ⁻¹) 1-8 µg ml ⁻¹	1.5% (136 h ⁻¹)	210
Trimipramina	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄	F.F.	0.02-0.22 mg ml ⁻¹		211
Salbutamol	KMnO ₄ / medio ácido	F.F.	50 nmol l ⁻¹ -0.1 mmol l ⁻¹ (25 nmol l ⁻¹) log-log	2.7%	212
Maleato de ergonovina	Fe (CN) ₆ ³⁻ / NaOH <i>La emisión se exalta con el tensioactivo HD.</i>	F.F.	70 pg ml ⁻¹ - 1 µg ml ⁻¹ (70 pg ml ⁻¹)	0.8% (118 h ⁻¹)	213
Dipirona Analgin ®	Ce(IV) / H ₂ SO ₄ Sensibilizada con rodamina 6G.	F.F. (tabletas)	0.05-10 µg·ml ⁻¹ (0.02 µg·ml ⁻¹)	2.1%	214
Amidopirina	KMnO ₄ / HCl <i>Sensibilizada con formaldehído.</i>	F.F. (inyectables)	0.1-80 µg ml ⁻¹ (30 ng ml ⁻¹)	1.6-2%	215
Aminopirina	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄ <i>EL Na₂S₂O₄ mezclado con la muestra aumenta la intensidad de QL.</i>	F.F. (tabletas)	200 ng ml ⁻¹ -80 µg ml ⁻¹ (60 ng ml ⁻¹)	1.8%	216
Lincomicina	NaIO ₄ / medio ácido	F.F. (inyectables)	0.1-90 µg ml ⁻¹ (36 ng ml ⁻¹)	1-1.1%	217
Dipiridamol	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄	F.F. (tabletas e inyectables)	0.2-80 µg ml ⁻¹ (58 ng ml ⁻¹)	1.2-1.4%	218
Perfenacina	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄	F.F.	50-350 mg l ⁻¹	2.3% (110 h ⁻¹)	219
Iproniázida	Ce (IV)/H ₂ SO ₄ <i>Reacción exaltada con sulfito sódico.</i>	Orina	0.1-4 mg l ⁻¹ (3 µg l ⁻¹)	3.1% (121 h ⁻¹)	220
Reserpina	KIO ₄ / H ₂ SO ₄	F.F. (tabletas)	1 µmol l ⁻¹ -10 mmol l ⁻¹ (0.27 µmol l ⁻¹)	2.36%	221
Maltol	KMnO ₄ / H ₂ SO ₄ <i>Reacción exaltada con ácido fórmico y HD.</i>	Alimentos	0.5-4 mg l ⁻¹ (10 µg l ⁻¹)	2.9% (153 h ⁻¹)	222

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **QL:** Quimioluminiscente. **HD:** Cloruro de hexadecilpiridinio.

Tabla II: Determinaciones indirectas basadas en la oxidación del luminol

Análito	Luminol-oxidante(s)/ Medio Comentarlos	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Nitroprusiato sódico	Luminol-H ₂ O ₂ / medio básico	F.F. (ampollas)	5×10 ⁻⁸ - 1×10 ⁻⁵ g ml ⁻¹ (5×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)	1.18 % (40 h ⁻¹)	105
Nitroprusiato sódico	Luminol-H ₂ O ₂ / medio básico	F.F. (inyecciones)	0.2 μmol l ⁻¹ - 0.1 mmol l ⁻¹ (9 nmol l ⁻¹)	1 - 1.2 % (40 h ⁻¹)	106
Príndoxina clorhidrato (Vitamina B ₆)	Luminol-H ₂ O ₂ / medio básico <i>El analito actúa como sensibilizador.</i>	F.F. (tabletas) y alimentos	10 - 250 μg ml ⁻¹ (6 μg ml ⁻¹)	< 5% (124 h ⁻¹)	111
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol - H ₂ O ₂ -clorhidrato de hemina / medio básico	F.F. (tabletas)	20 nmol l ⁻¹ - 40 μmol l ⁻¹ (8.6 nmol l ⁻¹)	0.8 - 0.9 %	113
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol - K ₇ Cu(IO ₆) ₂ (catalizador) / KOH	F.F. (tabletas)	50 nmol l ⁻¹ - 10 μmol l ⁻¹ (15 nmol l ⁻¹)	2 - 7 %	114
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol - Cu(II)(catalizador) / medio básico	F.F. (cápsulas de vitaminas, tabletas de vitamina C y bebidas)	2×10 ⁻⁶ - 6×10 ⁻⁵ mol l ⁻¹ (0.62×10 ⁻⁶ mol l ⁻¹)	1.1 % (F.C.)	223
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol-K ₃ Fe(CN) ₆ /medio básico <i>Reactor en fase sólida con luminol y K₃Fe(CN)₆ inmovilizados en una resina de intercambio aniónico. Se mide la inhibición QL causada por el ácido ascórbico.</i>	Píldoras de vitaminas y tabletas de extractos vegetales	1×10 ⁻⁸ - 8×10 ⁻⁷ g ml ⁻¹ (5.5×10 ⁻⁹ g ml ⁻¹)	5 % (60 h ⁻¹) (r-FIA)	116
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol - K ₃ Fe(CN) ₆ / medio básico y EDTA <i>Se mide la inhibición QL causada por el ácido ascórbico.</i>	F.F. (tabletas) y sangre	4×10 ⁻⁸ - 1×10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	0.5 %	115
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol -H ₂ O ₂ -Fe(II) (catalizador) <i>Reducción del Fe(III) a Fe(II) por el analito; el Fe(II) cataliza la oxidación del luminol por el H₂O₂.</i>	F.F. (tabletas, cápsulas y jarabes) y zumos de frutas	1×10 ⁻¹¹ - 1×10 ⁻⁷ mol l ⁻¹ (1×10 ⁻¹² mol l ⁻¹)	1.4 % (2 - 56 h ⁻¹)	107

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **F.C:** Flujo continuo. **r-FIA:** FIA inverso. **QL:** Quimioluminiscencia.

Tabla II: (Continuación)

Analito	Luminol-oxidante(s)/ Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr-%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol-Fe(II) Reactor en fase sólida con luminol y Fe(II) inmovilizados en una resina de intercambio iónico. Se eluyen con sulfato sódico.	Hortalizas	1×10^{-9} - 1×10^{-6} g ml ⁻¹ (4×10^{-10} g ml ⁻¹)	< 5 % (>60 h ⁻¹) (El sensor se usa 100 veces) (r-FIA)	117
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol-KMnO ₄ / medio ácido Sensor formado por los reactivos inmovilizados en una columna de intercambio aniónico; se eluyen con HCl. La señal QL producida entre el luminol y permanganato disminuye en presencia de ácido ascórbico.	Bebidas	1×10^{-5} - 4×10^{-3} g l ⁻¹	2.3 % (el sensor se utiliza hasta 100 veces)	118
Cianocobalamina (Vitamina B ₁₂)	Luminol - H ₂ O ₂ - Co (II) (catalizador)/ medio básico Sensor basado en la acidificación del analito para liberar Co(II) que tiene un efecto catalítico en la reacción del luminol - H ₂ O ₂ . El luminol está inmovilizado en una columna de intercambio aniónico y el H ₂ O ₂ se genera electroquímicamente del oxígeno disuelto.	F.F.	0.001 - 10 mg l ⁻¹ (0.35 µg l ⁻¹)	2.0 - 3.2 % (sistema estable hasta 500 determinaciones)	109
Cianocobalamina (Vitamina B ₁₂)	Luminol - H ₂ O ₂ - Co (II) (catalizador) / medio básico Analito acidificado para liberar Co(II).	F.F.	5×10^{-8} - 5×10^{-6} g (1×10^{-9} g) (50 µl inyección)	0.9 - 1.2 %	110
Ácido tánico	Luminol - H ₂ O ₂ - Cu(II) (catalizador) Inhibición de la señal quimioluminiscente.	Farmacopea tradicional China y lúpulo	7×10^{-8} - 1×10^{-5} mol l ⁻¹ (9×10^{-9} mol l ⁻¹)	2.5 %	224
Prometazina	Luminol - H ₂ O ₂ - Cr(III) / medio básico Inhibición de la QL.	F.F. (tabletas y jarabes)	3×10^{-9} - 1×10^{-4} mol l ⁻¹ (3×10^{-9} mol l ⁻¹)	1.3 %	225
Isoniazida	Luminol - H ₂ O ₂ - Fe(CN) ₆ ³⁻ / medio básico Inhibición de la QL por el Mn(II) desprendido por el analito de un reactor sólido de MnO ₂ .	F.F.	5 - 15 mg l ⁻¹	4 % (43 h ⁻¹)	119
Isoniazida	Luminol-IO ₄ ⁻ -Mn(II)/ medio básico	F.F.	0.1 - 10 µg ml ⁻¹ (30 ng ml ⁻¹)	< 2 %	226

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **QL:** Quimioluminiscencia.

Tabla II: (Continuación)

Analito	Luminol-oxidante(s)/ Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
(1) Morfina	Luminol-H ₂ O ₂ -sal de Reinecke/medio básico		(1) 1×10 ⁻⁷ - 1×10 ⁻⁵ g ml ⁻¹ (6×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)	(1) 2.0 %	227
(2) Codeína	Los alcaloides reaccionan con la sal de Reinecke e inhiben la QL.	F.F.	(2) 1×10 ⁻⁷ - 1×10 ⁻⁵ g ml ⁻¹ (6×10 ⁻⁷ g ml ⁻¹)	(2) 2.6 %	
(3) Sinomenina			(3) 1×10 ⁻⁷ - 1×10 ⁻⁵ g ml ⁻¹ (7×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹)	(3) 1.8 %	
Etamsilato	Luminol - hipoclorito El hipoclorito es electrogenerado. Se produce inhibición de la QL.	F.F.	1×10 ⁻⁹ - 8×10 ⁻⁹ g ml ⁻¹ (6×10 ⁻¹⁰ g ml ⁻¹)	3.1 %	228
Catecolaminas	Luminol - hipoclorito				229
(1) Dopamina	Inhibición de la QL del sistema; el hipoclorito es electrogenerado on-line por una corriente	F.F. (inyecciones)	(1) 1×10 ⁻⁹ - 2×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹ (6×10 ⁻¹⁰ g ml ⁻¹)	(1) 2.4 %	
(2) Adrenalina			(2) 2×10 ⁻⁹ - 2×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹ (1×10 ⁻⁹ g ml ⁻¹)	(2) 2.8 %	
(3) Isoprenalina	electrolítica constante.		(3) 2×10 ⁻⁹ - 2×10 ⁻⁸ g ml ⁻¹ (1×10 ⁻⁹ g ml ⁻¹)	(3) 2.6 %	
Catecolaminas					230
(1) Dopamina		F.F.	(1) 0.01 - 1 µg ml ⁻¹ (4 ng ml ⁻¹)	1.6 - 2.5 %	
(2) Adrenalina		(inyecciones)	(2) 0.04 - 2 µg ml ⁻¹ (20 ng ml ⁻¹)		
(3) Isoprenalina			(3) 0.04 - 2 µg ml ⁻¹ (16 ng ml ⁻¹)		
Citrato	Luminol - O ₂ disuelto - Fe(II) (catalizador)/ medio básico. Descomposición fotoquímica del complejo Fe(III) - citrato; detección del Fe(II) que cataliza la reacción del luminol.	F.F. y refrescos	2×10 ⁻⁷ - 1×10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (2×10 ⁻⁷ mol l ⁻¹)	0.45 - 1.5 % (30 h ⁻¹)	108
(1) Riboflavin (Vitamina B ₂)	Luminol-H ₂ O ₂ -hematina (catalizador)/ medio básico. Los analitos se foto-reducen e inhiben el sistema anterior.	F.F., alimentos y tejidos animales	1×10 ⁻⁷ - 3×10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ 1×10 ⁻⁷ - 3×10 ⁻⁶ mol l ⁻¹	1.2 - 1.3 % 0.9 - 1.1 %	231
5'-fosfato					232
Antibióticos					
β-lactámicos (9 antibióticos)	Luminol-H ₂ O ₂ -Fe(CN) ₆ ³⁻ /NaOH	F.F.	0.2-200 ng (60 pg-4.5 ng)	1-2.5 %	
Atropina	Luminol/medio básico Se basa en la formación de pares iónicos entre el analito y el tetracloroaurato (III). Se emplea un medio micelar formado por CTAB.	F.F. y orina artificial	10 ng· ml ⁻¹ -100 µg·ml ⁻¹ (1 ng· ml ⁻¹)	3% (r-FIA)	233

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **QL:** Quimioluminiscencia. **CTAC:** Cloruro de cetiltrimetilamonio.

Tabla II: (Continuación)

Analito	Luminol-oxidante(s)/ Medio Comentarios	Tipo de muestra	Límite de detección (L.D.)	Intervalo de linealidad	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
D-aminoácidos (1) D-Alanina	Luminol-H ₂ O ₂ -Fe (CN) ₆ ³⁻ Se emplea un biosensor con D-Amino oxidasa que produce el H ₂ O ₂ . El luminol y el ferricianuro se inmovilizan en una columna de intercambio aniónico.	Suero sanguíneo	1.1x10 ⁻⁶ -1.1x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (4.5x10 ⁻⁷ mol l ⁻¹)			234
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Luminol-K ₃ Fe(CN) ₆ /medio básico Se emplea un reactor en fase sólida donde se inmoviliza la L-ascorbato oxidasa.	Zumos de fruta	10-1000 µmol l ⁻¹ (5 µmol l ⁻¹)		3.13% (4 h ⁻¹)	235
(1) Cisteína (2) Penicilamina (3) 2-tiouracil (4) N-acetilcisteína (5) 2-mercapto propionilglicina (tioptonin)	Luminol - H ₂ O ₂ - Cu(II) (catalizador) / medio básico. El Cu(II) es complejoado por el grupo tiol de los analitos. Inhibición de la QL.		(1) 1x10 ⁻⁴ - 1x10 ⁻² mol l ⁻¹ (2) 1x10 ⁻⁴ - 1x10 ⁻² mol l ⁻¹ (3) 1x10 ⁻⁴ - 1x10 ⁻² mol l ⁻¹ (4) 2x10 ⁻⁴ - 1x10 ⁻² mol l ⁻¹ (5) 2x10 ⁻⁴ - 1x10 ⁻² mol l ⁻¹		1.2 - 2.1 %	236
Fenotiazinas (1) Clorpromazina (2) Trimeprazina (3) Trifluoperazina	Luminol-H ₂ O ₂ -Fe(II) (catalizador) Reducción del Fe(III) a Fe(II) por el analito. El Fe(II) cataliza la reacción de oxidación del luminol por el H ₂ O ₂ . Se realizó el análisis para dos fototubos de 800 y 500 v, respectivamente.	F.F.	(1) 2-20 µmol l ⁻¹ (2) 3-16 µmol l ⁻¹ (3) 3-15 µmol l ⁻¹ (Fototubo 800 V)		(1) 2.3% (2) 2.6% (3) 2.9% (Fototubo 800 V)	237
Dipiridanol (Persatin®)	Luminol - BrO ⁻ / medio básico El BrO ⁻ se genera por electrolisis galvanostática a partir de KBr.	F.F. (tabletas)	0.01-2 mg l ⁻¹ (4 µg l ⁻¹)		2%	238
Isoniazida	Luminol oxidado electroquímicamente/ medio tampón borax.	F.F. y sangre	40 nmol l ⁻¹ 8.0 µmol l ⁻¹ (28 nmol l ⁻¹)		<5%	239

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **QL:** Quimioluminiscencia.

Tabla II: (Continuación)

Analito	Oxidante / Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Antibióticos β -Lactámicos (1) Aztreonam (2) Penicilina G (3) Cefalotina (4) Ácido 6- amino penicilánico (5) Ácido 7- aminocefalosporánico (6) Latamoxef (7) Faropenem (8) Panipenem	Luminol- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ / NaOH		(1) (20 ng μl) (2) (12 ng μl) (3) (8 ng μl) (4) (4 ng μl) (5) (0.8 ng μl) (6) (0.4 ng μl) (7) (0.2 ng μl) (8) (0.2 ng μl)	1-2.5%	240
Ácido fólico	Luminol - $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ <i>Reactor en fase sólida con luminol- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ inmovilizados en una resina polimérica tipo Amberlyst A-27. Se eluyen con fosfato sódico.</i>	F.F.	0.01-15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (3.5 ng ml^{-1})	< 2.5 %	241
Isoniazida	Luminol- $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$ / medio básico <i>Inhibición de la señal QL causada por la isoniazida.</i>	F.F.	1.4 ng ml^{-1} -5.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.48 ng ml^{-1})	<3.5 %	242
Resorcinol	Luminol- $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$ / medio básico. <i>Reactor en fase sólida con luminol y $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$ inmovilizados en una resina de intercambio aniónico. Se mide la inhibición de la señal QL causada por el resorcinol mediante un sensor quimiluminiscente.</i>	F.F. (tinturas)	9.2-920 ng ml^{-1} (3.5 ng ml^{-1})	<2.5 %	243
Paracetamol	Luminol-KMnO ₄ / medio básico <i>Se mide la inhibición de la QL causada por el paracetamol.</i>	F.F.	25 nmol.l ⁻¹ - 0.25 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (10 nmol l ⁻¹)	2.3 %	244

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **QL:** Quimiluminiscencia.

Tabla II: (Continuación)

Analito	Luminol-oxidante(s)/ Medio Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr-%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Riboflavina	Luminol-NaIO ₄ - medio básico La Riboflavina exalta la emisión QL tras reacción fotoquímica en medio alcalino.	F.F.	2.4x10 ⁻⁸ -1.0x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ (1x10 ⁻⁸ mol l ⁻¹)		245
Paracetamol	Luminol/H ₂ O ₂ /Fe(CN) ₆ ³⁻ Oxidación del analito con Fe(CN) ₆ ³⁻ e inhibición de la señal QL del sistema Luminol-H ₂ O ₂ .	F.F.	2.5-12.5 µg ml ⁻¹	87 h ⁻¹	246
Galio	Luminol/Fe(II) EDTA/ medio básico	Medicina tradicional china	0.14-14 µmol.l ⁻¹ (30 nmol.l ⁻¹)	2.6%	247
Isoniazida	Luminol-IO ₄ ⁻ Reactor en fase sólida luminol y IO ₄ ⁻ inmovilizados en una resina de intercambio aniónico. Sensor quimioluminiscente.	F.F.	8x10 ⁻⁹ -1x10 ⁻⁶ mol l ⁻¹ (4.2x10 ⁻⁹ mol l ⁻¹)	2%	248
Isoniazida	Luminol -Fe(CN) ₆ ³⁻ Luminol y Fe(CN) ₆ ³⁻ inmovilizados en una resina de intercambio aniónico. Inhibición de la señal quimioluminiscente en presencia de la isoniazida. Sensor quimioluminiscente.	F.F.	1-1000 nmol l ⁻¹ (0.35 ng ml ⁻¹)	4.1%	249
Epinefrina	Luminol-H ₂ O ₂ Se emplea la polifenol oxidasa (obtenida a partir de zumo de manzana).	F.F.	1-10 mg l ⁻¹ 10-25 mg l ⁻¹	0.2 mg.l ⁻¹	250
Cloranfenicol	Luminol-Co (II) Degradación fotoquímica del analito en línea.	F.F.	(3 nmol l ⁻¹)	1.8% (60 h ⁻¹)	251
Sulfuro, cisteína y tiol contenidos en compuestos tiólicos con (-SH)	Luminol-hipoclororito Supresión de la QL del sistema por el sulfuro o por compuestos conteniendo el grupo tiol.	F.F.	1x10 ⁻³ -0.1 mol l ⁻¹ S ²⁻ 1x10 ⁻⁴ -0.1x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹ (cisteína, N-acetilcisteína, N-penicilamina, tiopronina, 2-tiouracil)		112

Ref: Referencia bibliográfica. F.F: Formulaciones farmacéuticas. QL: Quimioluminiscencia.

Tabla III: Determinaciones indirectas basadas en la oxidación del tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II)

Analito	Reacción quimioluminiscente Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
(1) Codeína (2) Heroína (3) Dextrometorfano	$Ru(bipi)_3^{3+}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ electrolíticamente.</i>	F.F. (tabletas)	(1) 32 - 320 ng ml ⁻¹ (4.76 ng ml ⁻¹) (2) 37 - 370 ng ml ⁻¹ (16.6 ng ml ⁻¹) (3) 27 - 270 ng ml ⁻¹ (16.3 ng ml ⁻¹)	(1) 1.02 - 2.20 % (2) 2.51 - 3.75 % (3) 3.87 - 4.73 %	252
Oxprenolol	$Ru(bipi)_3^{3+}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ electrolíticamente.</i>	F.F.	30- 12000 ng ml ⁻¹ (11 ng ml ⁻¹)		253
(1) Bupivacaína (2) Lignocaina (3) Procaina	$Ru(bipi)_3^{3+}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ electrolíticamente.</i>	F.F.	(1) 5×10^{-8} - 5×10^{-3} mol l ⁻¹ (5×10^{-8} mol l ⁻¹) (2) 7×10^{-8} - 5×10^{-3} mol l ⁻¹ (7×10^{-8} mol l ⁻¹) (3) 5×10^{-8} - 5×10^{-3} mol l ⁻¹ (5×10^{-8} mol l ⁻¹) (F.C.)	(1) 2.52 % (2) 2.31 % (3) 1.79 % (F.C.)	254
Amitriptilina	$Ru(bipi)_3^{3+}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ Electrolíticamente.</i>	F.F.	(3×10^{-4} mol l ⁻¹ , 94 ppb)		255
Codeína	$Ru(bipi)_3^{3+}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ mediante un reactor de PbO₂ en fase sólida.</i>	Extractos de la papaverina y muestras sintéticas	1×10^{-8} - 1×10^{-6} mol l ⁻¹ (5×10^{-9} mol l ⁻¹)	0.9 % (240 h ⁻¹)	256
Eritromicina	$Ru(bipi)_3^{+3}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ electrolíticamente.</i>	F.F. (tabletas, cápsulas)	3 - 24 µg ml ⁻¹	0.7 - 4.6 %	257
Tiazidas (1) Hidroclortiazida (2) Hidroflumetiazida (3) Clorotiazida (4) Clorotiazida (5) Triclometiazida	$Ru(bipi)_3^{3+}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ electrolíticamente.</i>	F.F. (cápsulas)	(1) (13 ng ml ⁻¹) (2) (1 ng ml ⁻¹) (3) (41 ng ml ⁻¹) (4) (a niveles de µg ml ⁻¹) (5) (a niveles de µg ml ⁻¹)	(1) 1.1 -4.4 %	141

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **F.C:** Flujo continuo.

Tabla III: (Continuación)

Analito	Reacción quimioluminiscente <i>Comentarios</i>	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr-%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Complejo emetina ditiocarbamato Cu (II)	$\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ electrolíticamente. FIA-electroforesis capilar.</i>		1 - 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ del complejo (0.1 nmol l^{-1} , 65 fg) de Cu(II)		258
Ranitidina	$\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ - analito / medio ácido <i>El oxidante se genera in situ electrolíticamente.</i>	F.F.	1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ - 1 mmol l^{-1} (0.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$)	1.7%	212
Fluoroquinolonas					
(1) Ofloxacin (2) Norfloxacin (3) Ciprofloxacina	$\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ - Ce(IV) - analito / medio ácido	F.F y fluidos biológicos	(1) 0.003-0.7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (5.5 nmol l^{-1}) (2) 0.05-0.7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (31 nmol l^{-1}) (3) 0.05-6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (26 nmol l^{-1})		259
(1) Ácido Flufenámico (2) Ácido Mefenámico	$\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ - Ce(IV)- analito/ medio ácido	F.F y fluidos biológicos	(1) 0.07-6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (3.6 nmol l^{-1}) (2) 0.05-6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0.21 $\mu\text{mol l}^{-1}$)		260
Cefadroxilo	$\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$ - analito <i>Oxidación a 1.1 voltios. Se mide la electroquimioluminiscencia generada.</i>	F.F.	0.05-1 $\mu\text{mol l}^{-1}$		261

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas.

Tabla IV: Reacciones indirectas basadas en la oxidación de la lucigenina

Análito	Reacción quimioluminiscente <i>Comentarios</i>	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Lucigenina-Fe(III) (catalizador) / medio básico <i>Se emplea un medio micelar (tensoactivo iónico Brij 35).</i>	F.F.	$2 \times 10^{-7} - 6 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ($2 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$)	1.9 % (30 h ⁻¹)	125
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Lucigenina -análito foto-oxidado / medio básico <i>Foto-oxidación del ácido ascórbico sensibilizada con azul de toluidina.</i>	F.F., zumos de frutas, refrescos y suero sanguíneo	$1.1 \times 10^{-9} - 3 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ($2 \times 10^{-10} \text{ mol l}^{-1}$)	0.43 - 1.65 % (80 h ⁻¹)	262
Isoprenalina	Lucigenina / medio básico <i>La QL se exalta con tensoactivos no iónicos (Brij 35)</i>	F.F.	($5 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$)		126
Isoprenalina sulfato	Lucigenina / medio básico	F.F. (inyecciones)	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ($1 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$)	0.9 %	263
Kanamicina	Lucigenina - H ₂ O ₂ - Co(II) / medio básico <i>Inhibición de la QL.</i>	F.F.	$1 \times 10^{-13} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ($1 \times 10^{-13} \text{ mol l}^{-1}$)	1.91 %	127

Ref: Referencia bibliográfica. **F.F:** Formulaciones farmacéuticas. **QL:** Quimioluminiscencia.

Tabla V: Varios

Analito	Sistema Quimioluminiscente Comentarios	Tipo de muestra	Intervalo de linealidad Límite de detección (L.D.)	Reproducibilidad (dsr-%) (Velocidad de muestreo)	Ref
Trazas de Co(II) en Vitamina B ₁₂	3,5-dibromosalicilfluorona -H ₂ O ₂ - Co(II) (catalizador) / medio básico. La QL se exalta por bromuro de hexadeciltrimetilamónio.		0.5 - 200 ng ml ⁻¹ (0.3 ng ml ⁻¹)	0.9 %	264
Co(II) en Vitamina B ₁₂	Lofina - H ₂ O ₂ - Co(II) (catalizador) / medio básico La QL se exalta por cloruro de hidroxilamina.	F.F. (colirios)	2×10^{-7} - 2×10^{-5} mol l ⁻¹ (4.5×10^{-8} mol l ⁻¹)		100
Porfirinas	Reacción del DNPO y TCPO con H ₂ O ₂	Orina		1.5 %	138
Menadiona (Vitamina K ₃)	Sensor quimioluminiscente Se inmoviliza rodamina G en una columna de intercambio iónico; el analito se mezcla con Tween.	F.F. (tabletas)	0.5-10 µg ml ⁻¹ (2.6 µg l ⁻¹)	3.4 %	265
Captopril	Ag (II)/ medio ácido El oxidante Ag (II) se genera in situ electrolíticamente.	F.F.	0.02 -10 µg ml ⁻¹ (6×10^{-9} µg ml ⁻¹)		266
Captopril	Mn (III)/medio ácido El oxidante Mn (III) se genera in situ electrolíticamente a partir de MnSO ₄ en medio H ₂ SO ₄ .	F.F.	0.3-100 µg mol l ⁻¹ (80 nmol l ⁻¹)		267
(1) Tetraciclina (2) Oxitetraciclina (3) Clortetraciclina	H ₂ O ₂ /Bromuro (generado in situ electrolíticamente) La señal QL es exaltada por las tetraciclinas.	F.F.	(1) 3×10^{-8} - 5×10^{-5} g ml ⁻¹ (10^{-8} g ml ⁻¹) (2) 2×10^{-7} - 2.4×10^{-5} g ml ⁻¹ ($7 \cdot 10^{-8}$ g ml ⁻¹) (3) 1×10^{-7} - 5×10^{-5} g ml ⁻¹ ($1.5 \cdot 10^{-7}$ g ml ⁻¹)	(1) < 5%	268
Benzamidas (1) Sulpirida (2) Sultoprida (3) Tiaprida	Ce(IV)- SO ₃ ²⁻ Las bezamidas exaltan la señal QL.	F.F. y fluidos biológicos	(1) 0.05-2.5 µg ml ⁻¹ (2) 0.01-2.5 µg ml ⁻¹ (3) 0.01-1.5 µg ml ⁻¹	0.01 µg ml ⁻¹	269
Sodio fosfato dexametasona	Co(III)/H ₂ SO ₄ El oxidante se genera electrolíticamente in situ a partir de una disolución de CoSO ₄ .	F.F. (inyectables)	1-20 mg l ⁻¹	0.32 µg ml ⁻¹	270

Ref: Referencia bibliográfica. F.F: Formulaciones farmacéuticas. QL: Quimioluminiscencia.

1.5. PREDICCIÓN DE QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA POR CONECTIVIDAD MOLECULAR

El interés analítico que la quimioluminiscencia en fase líquida ha despertado en las dos últimas décadas y la falta de predicciones teóricas seguras sobre si un sistema va o no a tener un comportamiento quimioluminiscente, hace necesario la búsqueda de nuevos métodos o estrategias que sean capaces de predecir esta actividad.

En los sistemas específicos de quimioluminiscencia, la búsqueda de analitos que den lugar a reacciones quimioluminiscentes, lleva asociado unos procedimientos de barrido sistemático ensayo-error entre el analito y un amplio intervalo de oxidantes fuertes y a veces reductores en diferentes medios, que consumen mucho tiempo y exigen disponer de un considerable número de sustancias a ensayar, con el propósito de incrementar la probabilidad de encontrar una reacción positiva. Además, de un gran desembolso económico en el caso de que se estudien sustancias de elevado coste.

Aunque como se ha indicado anteriormente existen reglas empíricas que intentan predecir este comportamiento, éstas presentan muchas excepciones y, muy a menudo, las reacciones quimioluminiscentes no se pueden predecir.

Es posible aplicar métodos de predicción teóricos o modelos matemáticos, para determinar la actividad de una sustancia. El postulado principal de cualquier método de diseño molecular es que tanto la propiedad como la actividad dependen de su estructura, lo que se conocen como métodos QSPR (*Quantitative Structure-Property Relationship*) o QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*).

Los métodos convencionales de diseño molecular, emplean variables físicas (como energías, cargas, momentos, etc.) o geométricas como (las distancias métodos

interatómicas, ángulos de enlace, etc.) para describir la estructura de una molécula. Sin embargo, la topología molecular, calcula variables topológicas.

1.5.1. Conectividad Molecular

La topología puede definirse como aquella parte del análisis matemático que estudia las posiciones e interconexiones de los elementos dentro de un conjunto. Aplicada a las moléculas, estudia las posiciones e interconexiones de los átomos dentro de ellas, es lo que se conoce como “*topología molecular*”. Desde este punto de vista, la cuestión fundamental es qué átomo está ligado a cualquier otro y cuál es el camino para ir de un átomo a otro dentro de la molécula, sin necesidad de estudiar aspectos como la estructura tridimensional del compuesto, tipos de enlace, ángulos entre ellos, etc.

El método topológico, emplea los llamados *índices topológicos o descriptores topológicos (TDs)*, para caracterizar estructuralmente a un compuesto, es decir, aportan información sobre el número de átomos, los enlaces, las insaturaciones y el ensamblaje topológico o la *conectividad de la molécula*.

Para definir dichos índices, el primer paso es representar a los átomos por puntos llamados *vértices* y a los enlaces por segmentos a los que se denomina *ejes o aristas*, eliminándose los átomos de hidrógeno. De esta manera se obtiene el *grafo* de la molécula. Dichos grafos fueron ya estudiados en 1871 por el ruso Flavitzky²⁷¹ y en 1875 por el inglés Cayley²⁷², constituyendo hoy en día la base de una disciplina matemática llamada “teoría de grafos”²⁷³.

Una vez dibujado el grafo, se numeran aleatoriamente los distintos vértices o átomos del grafo y se construye la llamada *matriz topológica*, cuyos elementos t_{ij} valen un número entero o cero dependiendo de que el átomo “i” esté enlazado al “j” o no. Es importante destacar que la numeración del grafo es totalmente aleatoria, por

lo que los índices topológicos no dependerán del orden de numeración, por esta razón los matemáticos los conocen como invariantes de grafo.

Tras una manipulación adecuada de la matriz topológica y utilizando diversos algoritmos, se obtiene un índice o un conjunto de ellos que caracterizan de manera única la estructura molecular. Si se establecen correlaciones entre ellos y diferentes propiedades físicas, químicas o biológicas para grupos de compuestos más o menos homogéneos, se obtienen ecuaciones que relacionan tales propiedades o actividades con la estructura molecular, caracterizada a través de sus índices. Estas ecuaciones se conocen como “Funciones de predicción” también llamadas de conectividad. Por otro lado, si las funciones están destinadas a clasificar los compuestos en función de su actividad se obtienen las “Funciones de discriminación”.

Si se calculan entonces los valores de los índices de moléculas que no hayan sido utilizadas en la obtención de la función y se sustituyen en la ecuación, se puede predecir el valor de la propiedad o la actividad correlacionada para ese compuesto, que puede incluso no tener aún una existencia física. Se trata por tanto, de usar las características topológicas de las moléculas conocidas para predecir las propiedades o la actividad de moléculas desconocidas.

1.5.1.1. La matriz topológica

El primer paso para aplicar el método de predicción de quimioluminiscencia directa por conectividad molecular, consiste en expresar de forma numérica las estructuras moleculares mediante la matriz topológica. En 1874, el matemático Sylvester²⁷⁴ demostró que una molécula podía ser representada por una matriz de dos dimensiones a la que llamó Matriz Topológica de Adyacencia.

La obtención de dicha matriz a partir de la estructura de la molécula a estudiar comprende los siguientes pasos:

- ❖ Dibujar el grafo de la molécula suprimiendo los átomos de hidrógeno.
- ❖ Numerar los átomos (vértices) del grafo, sin importar el orden en que se realice.
- ❖ Construir la matriz topológica, de forma que cada término t_{ij} tendrá el valor 1, 2, 3, o 4 cuando haya uno, dos, tres o cuatro enlaces entre el vértice “i” y el vértice “j” respectivamente, y tendrá el valor 0 cuando no haya enlace entre ellos.

La matriz topológica de adyacencia es cuadrada y esta formada por n filas y n columnas, siendo n el número de átomos o vértices del grafo. Además, es simétrica respecto a su diagonal principal. El grado topológico o la *valencia de cada vértice* δ_i , equivale a la suma de los valores que hay en la fila o en la columna, o lo que es lo mismo el número de ejes que convergen a él.

A continuación en la Figura 1.22 se ilustra la construcción de la matriz topológica para el isopentano y el ciclohexano, junto con los valores obtenidos para las valencias de los diferentes átomos.

MOLÉCULA	GRAFO	MATRIZ TOPOLÓGICA
		$\begin{array}{c c} \begin{matrix} 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{matrix} & \begin{matrix} \delta_1 \\ 1 \\ 3 \\ 1 \\ 2 \\ 1 \end{matrix} \end{array}$
		$\begin{array}{c c} \begin{matrix} 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \end{matrix} & \begin{matrix} \delta_1 \\ 2 \\ 2 \\ 2 \\ 2 \\ 2 \end{matrix} \end{array}$

Figura 1.22: Transformación de un grafo en una matriz de adyacencia.

1.5.1.2. Índices topológicos

Desde el momento que las estructuras químicas quedan representadas a través de matrices, se obtienen mediante una serie de algoritmos adecuados los llamados índices topológicos.

Estos índices topológicos, son por tanto, descriptores numéricos de la estructura molecular y su principal ventaja es que permiten establecer correlaciones entre ellos y algunas propiedades físicas, químicas o biológicas de las moléculas a estudiar.

El primer índice topológico fue propuesto por Wiener^{275,276} en 1947. Este índice se basa en el concepto topológico de la distancia, entendida como el número de ejes entre dos vértices por el camino más corto. El número de Wiener, que se representa por W , se define como el número total de enlaces entre todos los pares de átomos en el grafo. Para su cálculo se construye la matriz de distancia D , cuyos elementos δ_{ij} se definen como el número de enlaces por el camino más corto desde el vértice i al vértice j .

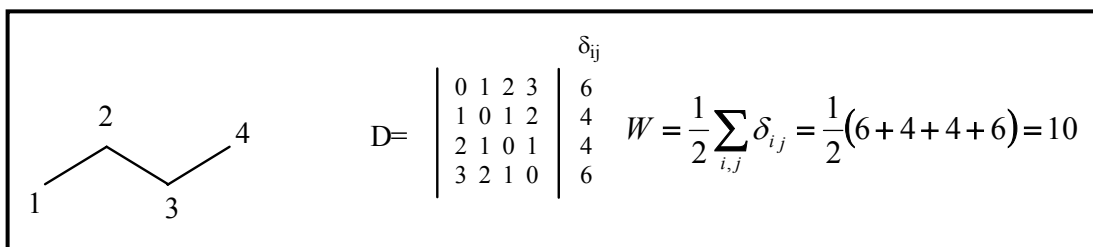


Figura 1.23: Obtención del número de Wiener para el butano.

Otros muchos índices se han definido desde finales de 1940, entre los que destacan los de Gordon y Scantlebury²⁷⁷, Hosoya²⁷⁸, Balaban²⁷³, Randić²⁷⁹, Bonchev²⁸⁰, por citar algunos de los más difundidos. Sin embargo de estudios realizados por Amidon y Anik²⁸¹ y completados por Kier y Hall y col.²⁸² se desprende que los que han demostrado mayor eficacia en diferentes aplicaciones, han sido los índices de conectividad molecular, introducidos por Kier y Hall²⁸³, como generalización del índice de Randić²⁷⁹.

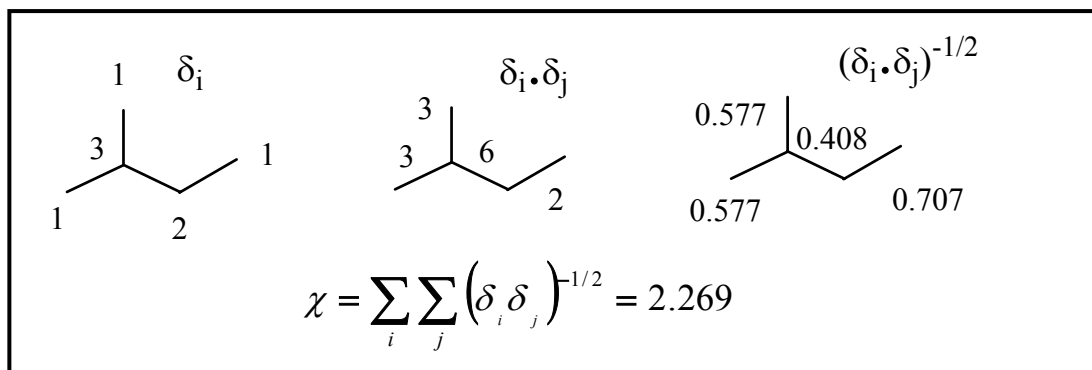


Figura 1.24: Cálculo del índice de Randić para el metilbutano. Una vez obtenido el grafo, se sitúan en sus vértices sus valencias topológicas y se multiplican las dos que limitan cada eje del grafo. El índice es la suma de las inversas de las raíces cuadradas de esos productos.

Para el estudio de la predicción de quimioluminiscencia directa por conectividad molecular, se han utilizado índices de conectividad molecular de Kier y Hall de orden 10 ${}^m\chi_t$, índices electrotopológicos S_i e índices de carga J_i , cuyo tratamiento matemático excede al contenido de la presente memoria.

1.5.2. Tratamiento informático

La utilización de métodos informáticos es imprescindible para desarrollar las diferentes etapas del estudio de la predicción de quimioluminiscencia directa por conectividad molecular.

1. Cálculo de los índices topológicos.
2. Obtención de las funciones discriminantes, mediante el análisis lineal discriminante (ALD).
3. Representación de los correspondientes diagramas de distribución de las funciones discriminantes.

1.5.2.1. Obtención de los índices topológicos

El cálculo de los índices se realiza utilizando el programa Desmol 11, desarrollado por R. García-Domenech²⁸⁴ y el programa Molconn²⁸⁵, realizado por el equipo del Profesor. Hall (Eastern Nazarene College Quincy, Massachusetts).

La obtención de estos índices se lleva a cabo introduciendo en el programa el grafo completo de cada molécula a estudiar, incluyendo los heteroátomos y a partir de él, se obtienen los descriptores topológicos, utilizados en el estudio de la predicción de quimioluminiscencia directa que fueron los siguientes: índices de conectividad de Kier y Hall hasta orden 10 (incluyendo descriptores tipo path, cluster, path-cluster y cahn), índices topológicos de carga hasta orden 5 e índices electrotopológicos atómicos.

1.5.2.2. Obtención de las funciones discriminantes

Las funciones discriminantes se obtienen empleando un programa del paquete estadístico denominado *BMDP* (Biomedicine Department Program), creado bajo la dirección de W. J. Dixon²⁸⁶ en la Universidad de California, con el propósito de realizar un análisis de los datos, tanto para una simple descripción de los mismos como para describir técnicas estadísticas complejas y sofisticadas.

Concretamente en los estudios de predicción de quimioluminiscencia directa se utiliza el programa *BMDP 7M*, para la obtención de las funciones de clasificación o discriminación.

1.5.2.2.1. Análisis lineal discriminante

Existen propiedades que no están cuantificadas numéricamente, es decir que presentan valores discretos (activo, no activo; alto, medio, bajo etc.) de un parámetro determinado, como puede ser la actividad farmacológica o quimioluminiscente para cada uno de los compuestos de un grupo de estudio. En estos casos se utiliza el *análisis lineal discriminante* (ALD).

Éste método clasifica un conjunto de objetos numéricamente descriptibles mediante una combinación lineal de variables. Dicha ecuación es capaz de predecir la categoría a la cual pertenece cada objeto.

Entre las operaciones estadísticas realizadas se incluyen:

❖ La lambda de Wilks o U estadística (Wilk' λ), que corresponde a un análisis multivariante de la varianza estadística, para comprobar la igualdad de las medias de grupo para la variable o variables de la función discriminante.

❖ La F (Snedecor) estadística, que es una transformación de la Lambda de Wilks. La selección de variables se realiza por etapas; en la primera, se calculan los parámetros estadísticos F de cada variable y se selecciona aquella que proporciona un valor más alto de F y fuera del intervalo prefijado para su exclusión. El proceso se repite adicionando otras variables a la ecuación de manera que ninguna de las restantes supere la barrera estadística impuesta.

El resultado final en cada caso incluye parámetros tales como la F estadística para las variables elegidas, la lambda de Wilks, D^2 de Mahalanobis para las media de los grupos, las funciones de clasificación, la matriz de clasificación, la clasificación de Jacknife, porcentajes de clasificación correctos y probabilidades posteriores.

En el análisis lineal discriminante se debe de realizar una validación de la función discriminante, para evaluar la bondad y la calidad del ajuste, aplicándola a

un grupo de moléculas no utilizadas previamente. En nuestro caso, utilizamos dos categorías de compuestos: activos e inactivos. Cada categoría se divide aleatoriamente en un grupo de trabajo o de entrenamiento, con el que se obtendrá la función discriminante y otro test o validación cuyos porcentajes de clasificación correcta nos dará una estimación empírica de la bondad del análisis lineal discriminante.

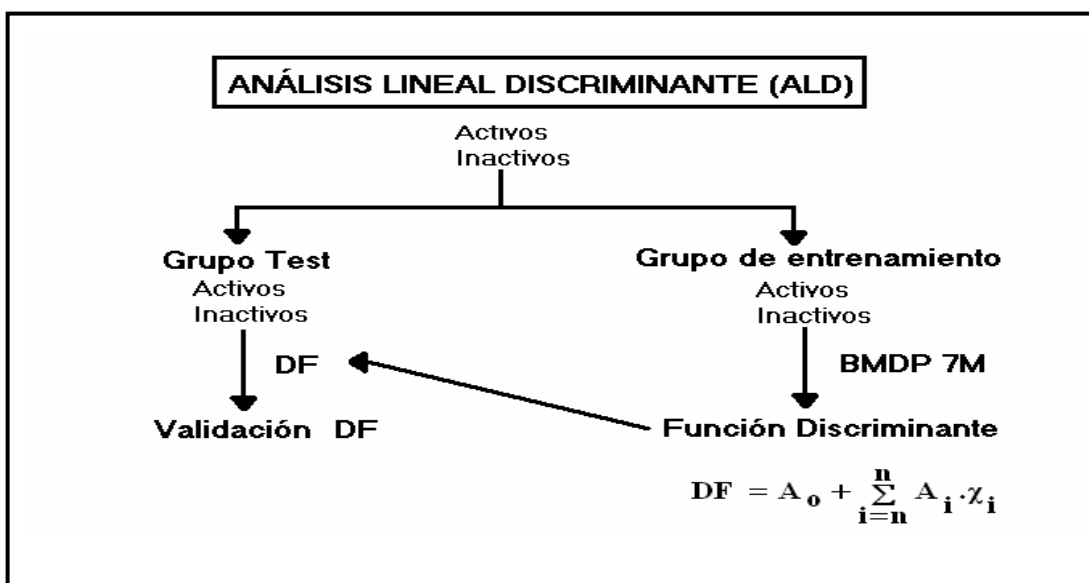


Figura 1.25: Estrategia del análisis lineal discriminante.

1.5.2.3. Diagramas de distribución

Los diagramas de distribución desarrollados en la unidad de investigación de Conectividad Molecular y Diseño de Fármacos de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València²⁸⁷ son representaciones en forma de histograma que aportan información sobre la eficacia de la función discriminante y permiten evaluar la expectativa o la probabilidad de actividad para un compuesto en un intervalo de la función discriminante. Estos diagramas de actividad han sido útiles para revelar la actividad farmacológica en diversos fármacos como broncodilatadores, antimicrobianos y antimaláricos.

Dado un intervalo arbitrario de la función discriminante podemos definir en él la expectativa o la probabilidad de actividad quimioluminiscente como:

$$E_a = \frac{a}{i+1}$$

Donde “a” es el cociente resultante de dividir el número de compuestos activos en dicho intervalo por el número total de compuestos activos, mientras que i es el cociente entre el número de compuestos inactivos en el intervalo estudiado y el número total de compuestos inactivos.

Análogamente se puede definir la expectativa de inactividad quimioluminiscente para un determinado intervalo de la función discriminante como:

$$E_i = \frac{i}{a+1}$$

Dado que se trabaja con un grupo de entrenamiento y otro de test o validación, se puede definir de idéntica manera la expectativa de actividad e inactividad para el grupo test, E_{ta} y E_{ti} respectivamente.

Los diagramas de distribución son diagramas de distribución de frecuencias de una variable dependiente, en cuya ordenada se representa la expectativa de una actividad para cada intervalo de la función discriminante.

La principal ventaja de éstos diagramas es que permiten determinar visualmente aquellos intervalos de la función donde la probabilidad de encontrar nuevos compuestos activos sea máxima frente a la posibilidad de dar un falso positivo. En la Figura 1.26 se refleja un diagrama de distribución tipo.

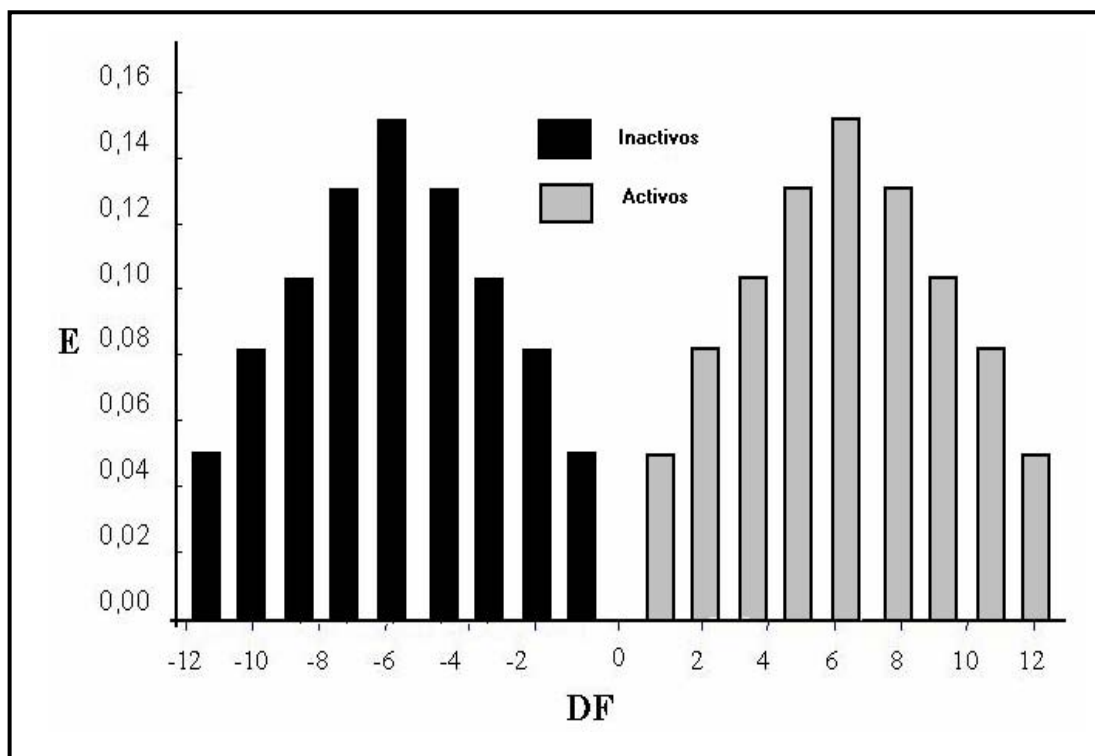


Figura 1.26: Diagrama de distribución “tipo”.

Capítulo segundo

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

Las experiencias presentadas en esta memoria responden a los siguientes objetivos fundamentales:

- La aplicación de métodos de conectividad molecular para predecir el comportamiento quimioluminiscente de fenoles y polifenoles cuando reaccionan con oxidantes comunes en fase líquida.

- El empleo de reactores en fase sólida sin reacción química, para preconcentrar el analito y separar o eliminar interferentes de la muestra, con el propósito de incrementar la sensibilidad y selectividad del método analítico.

- Desarrollo de nuevos sistemas quimioluminiscentes por oxidación directa del analito empleando la metodología de análisis por inyección en flujo (F.I.A.) y la más reciente modalidad, como es el análisis en flujo por multiconmutación.

- La implementación de nuevas estrategias de análisis en flujo por multiconmutación mediante válvulas solenoide de tres puertos, que permiten el diseño de sistemas en flujo activos, disminuir el consumo de muestra y reactivos, sustituir los “volúmenes” de inserción por “tiempos de inserción”, y un mejor control de la dispersión de la muestra y de los reactivos, lo cual favorece el desarrollo de modalidades de gradiente de difícil ejecución en la metodología F.I.A., incrementando enormemente las posibilidades analíticas del análisis en flujo, estimulado por el F.I.A. en los últimos años.

- La aplicación analítica de los métodos desarrollados a la determinación del analito en formulaciones farmacéuticas, así como en muestras de interés medioambiental como el agua, ya que las disposiciones legales en cuanto a la calidad de los productos farmacéuticos y de las aguas son cada vez más estrictas.

- Se pretende llevar a cabo los objetivos anteriores empleando técnicas de detección robustas, fácilmente disponibles y muy asequibles para cualquier laboratorio de análisis, como la espectrofotometría de absorción UV-visible y la quimioluminiscencia.

2.2. PLAN DE TRABAJO

Los métodos analíticos presentados en esta memoria se basan en el estudio previo de predicción de la quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles por conectividad molecular y la posterior realización de un “barrido experimental” con oxidantes fuertes inorgánicos en un montaje en flujo continuo, para estudiar la posibilidad de obtener una señal quimioluminiscente a partir del producto de una reacción de oxidación.

Tras una etapa de revisión bibliográfica se escogieron de entre todos los compuestos ensayados, el fenol, el ácido tánico y la hidroquinona con el propósito de desarrollar nuevos sistemas por quimioluminiscencia directa para su determinación.

2.2.1. Determinación de fenol en aguas con preconcentración por quimioluminiscencia directa

En este trabajo en primer lugar se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica sobre los distintos métodos analíticos descritos para la determinación de fenol en

aguas. Atendiendo a criterios de simplicidad, robustez, selectividad y sensibilidad, se seleccionó con el objeto de proponer un nuevo sistema de análisis por inyección en flujo para la determinación de fenol en aguas por quimioluminiscencia directa, un método espectrofotométrico⁵⁶ basado en la preconcentración-separación con un reactor en fase sólida acoplado en línea a un sistema F.I.A., donde la preconcentración tenía lugar en una columna rellena de resina polimérica no polar tipo Amberlite XAD-4, que presentaba un buen comportamiento en cuanto a selectividad (únicamente se retenía el fenol a un cierto pH) y sensibilidad (preconcentraba el analito).

A partir de este trabajo, se desarrolló un nuevo sistema de análisis por inyección en flujo para la determinación de fenol por quimioluminiscencia directa, donde se acoplaba en línea este reactor en fase sólida, con el objeto de separar y preconcentrar el analito.

La estrategia seguida para el desarrollo del nuevo método analítico se dividió en cuatro etapas distintas:

1ª-Estudio de la preconcentración-separación con detección por absorción en el ultravioleta-visible. En este apartado se optimizaron mediante el método univariante variables propias de la etapa de preconcentración-separación, como longitud, diámetro interno y naturaleza del reactor, caudal del eluyente, tiempo de preconcentración, de acondicionamiento del reactor, de elución etc.

2ª-Desarrollo y estudio de la reacción quimioluminiscente. Se llevaron a cabo un serie de ensayos en un sistema en flujo continuo dirigidos a la obtención de información cualitativa y semicuantitativa sobre la reacción quimioluminiscente. Posteriormente se adecuaron las variables establecidas a un sistema F.I.A.

3ª-Estudio conjunto de la preconcentración-separación con detección quimioluminiscente. En esta etapa se realizaron una serie de experiencias para acoplar la etapa de preconcentración-separación, al montaje F.I.A. establecido para la determinación de fenol por quimioluminiscencia directa. Finalmente se reoptimizaron mediante el método univariante las variables químicas y algunas variables F.I.A. que se consideraron necesarias.

4ª-Aplicaciones Analíticas. En este apartado se determinaron, en primer lugar, las características analíticas del método como son el intervalo de linealidad, el límite de detección, la frecuencia de inserción, la repetitividad y la reproducibilidad.

Seguidamente, se realizó un estudio de la influencia de los posibles interferentes, lo cual permitió conocer la tolerancia del método frente a compuestos comúnmente presentes en las muestras de estudio y por último, se procedió a la determinación del analito en las muestras reales.

2.2.2. Determinación de ácido tánico e hidroquinona por quimioluminiscencia directa

La estrategia general seguida en estos dos trabajos se traduce en las siguientes etapas:

1ª-Ensayos previos. Consistió en la realización de experiencias encaminadas a la obtención de información cualitativa y semicuantitativa sobre el sistema quimioluminiscente empleado.

Todos los ensayos de esta etapa se realizaron en un sistema en flujo continuo (Figura 2.1), midiendo a tiempo fijo, dado que la intensidad de señal quimioluminiscente depende del tiempo transcurrido desde el inicio de la reacción.

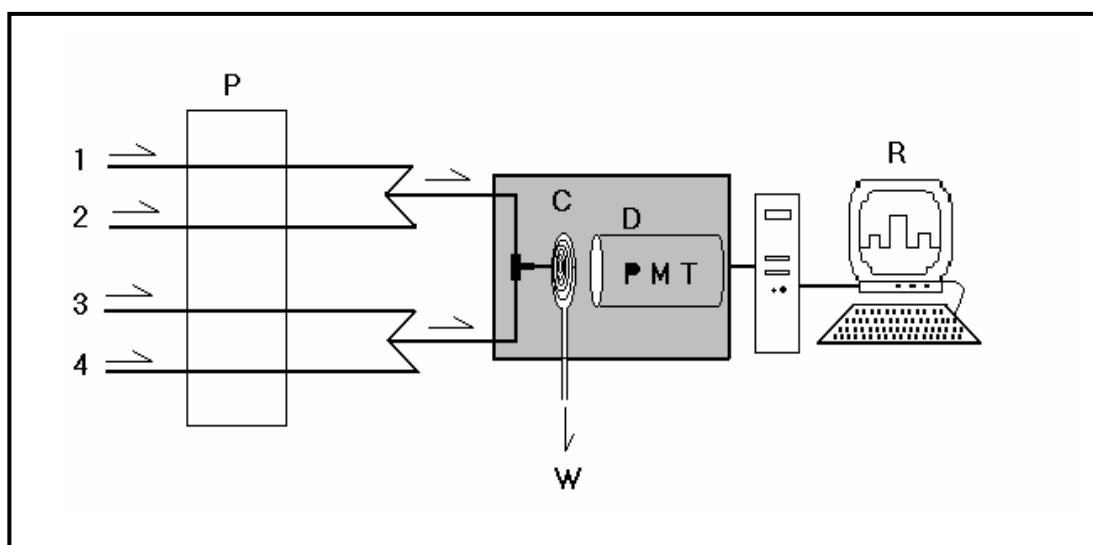


Figura 2.1: Montaje en flujo continuo para los ensayos previos.

1: Disolución acuosa de analito (blanco, agua desionizada); **2 y 3:** Disolución para ajustar el medio de reacción; **4:** Oxidante; **P:** Bomba peristáltica; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de datos.

En esta etapa se seleccionó el sistema oxidante y se estudió la influencia de variables tales como concentración del oxidante, medio de reacción, y la temperatura.

2^a-Estudios y optimización en un sistema de análisis en flujo (F.I.A. y multiconmutación)

Para la determinación del *ácido tánico*, se estableció un montaje F.I.A. lo más parecido al sistema en flujo continuo, se adecuaron las variables químicas a este nuevo sistema de análisis y se procedió a la optimización de las variables propias del sistema F.I.A. mediante el método multivariante *Simplex Modificado*.

A continuación, se estudió y optimizó la influencia de variables como presencia y concentración de sensibilizadores, tensoactivos y la temperatura, optimizándose mediante una secuencia de optimizaciones consecutivas atendiendo a

criterios de sensibilidad, reproducibilidad y velocidad de inserción. Una vez establecido el montaje F.I.A. definitivo, se procedió a la reoptimización de las variables químicas mediante el método univariante.

En el caso de la *hidroquinona*, en primer lugar se adecuaron las variables químicas establecidas en los ensayos previos a un sistema en flujo por multiconmutación. A continuación se estudiaron posibles montajes y para cada uno de ellos se optimizaron las variables propias de la multiconmutación, mediante el método multivariante *Simplex Modificado*. Finalmente se seleccionó el montaje óptimo atendiendo a criterios de sensibilidad y reproducibilidad.

Una vez seleccionado el montaje, se estudiaron la influencia de variables como la temperatura, velocidad de flujo, presencia y concentración de sensibilizadores y tensoactivos, optimizándose mediante el método univariante. Por último, se reoptimizaron todas las variables experimentales mediante el método multivariante *Simplex Modificado*, siendo necesario la reoptimización de algunas variables por el método univariante.

3ª- Aplicaciones analíticas. Esta etapa es totalmente análoga a la descrita en el apartado 2.2.1 para la determinación del fenol, únicamente se incluyó el estudio de la robustez química, con el fin de comprobar que la utilización de reactivos procedentes de distintas casas comerciales no afectan a la emisión quimioluminiscente.

Capítulo tercero

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Instrumentación analítica

El instrumental analítico empleado en las distintas etapas del trabajo experimental fue el que se describe a continuación:

- Espectrofotómetro de fila de diodos modelo 8452 A; Hewlett Packard, para el estudio de la etapa de preconcentración-separación del fenol, el control de la estabilidad de las disoluciones de analito y otros ensayos espectrofotométricos. Celda de cuarzo con 1 cm de camino óptico.
- Luminómetro de fabricación propia para el estudio de la quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles y para la determinación de fenol, ácido tánico e hidroquinona. El luminómetro está constituido por una caja absolutamente hermética a la luz en cuyo interior se mezclan las disoluciones de reactivos mediante una confluencia en forma de T, adecuada para conectar tornillos F.I.A. y de volumen muerto mínimo. El producto de reacción quimioluminiscente alcanza inmediatamente una celda de flujo de fabricación artesanal, que consiste en un tubo de cuarzo de 1.0 mm de diámetro interno, arrollado en forma de espiral plana sin dejar huecos entre las espiras, que presenta un diámetro total de 3 cm. La espiral plana se dispone entre la ventana de un tubo fotomultiplicador situado a 2 mm de distancia y un espejo perforado, para lograr una mayor intensidad de luz. En la determinación de fenol, se empleó un tubo fotomultiplicador EMI-Torn (modelo 9902, de Electron Tubes Limited) que se alimentaba con una fuente de alto voltaje programable (PHV-40 de Acton Research Corporation) a -1273V. La señal resultante podía leerse mediante un voltímetro, un registrador o un

convertidor analógico digital de (KPS Measurement System) conectado a un equipo de “*software*” adecuado. En este sistema se empleó un “*software*” (KPS Measurement System), en el que las señales analíticas se obtuvieron en μA . Para el estudio de la quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles y en las determinaciones de ácido tánico e hidroquinona se utilizó un tubo fotomultiplicador de Electron Tubes (tipo 9125B16) que incluía un paquete fotodetector P30CWAD5F-29 y un sistema de adquisición de datos basado en un tarjeta CT1, de Electron Tubes Limited (Middlesex, U.K.). En este caso se empleó un nuevo “*software*” (KPS Measurement System), en el que las señales analíticas se obtuvieron en kHz.

- Balanza analítica modelo BP110S, de Sartorius.
- pH-metro con electrodo de vidrio Ag/AgCl modelo 2002, Crison.
- Centrifuga, Selecta.

3.1.2. Material para los montajes en flujo

En los montajes en flujo realizados durante el desarrollo del trabajo experimental, se empleó el siguiente material:

- Bomba peristáltica modelos Miniplus 2 y 3, de Gilson.
- Válvula de inyección modelo 5020 de volumen variable, de Rheodyne.
- Válvula solenoide de tres puertos modelo HP161T031, de Neptune Research.
- Conectores artesanales en forma de punta de flecha de metacrilato.
- Tuercas, conexiones y roscas de PTFE, de Omnifit.
- Tubos de PTFE, de Omnifit.
- Tubo de Tygon® para bomba peristáltica, de Omnifit.
- Columnas cromatográficas, de Omnifit.
- Celda de flujo Hellma de 1 cm de camino óptico, para la absorción.

- Celda de flujo artesanal de cuarzo, en espiral plana, para la quimioluminiscencia.

3.1.3. Reactivos

El agua empleada en la preparación de las disoluciones acuosas fue purificada por ósmosis inversa y posteriormente desionizada con un sistema de cartuchos de intercambio iónico, modelo Nanopure II, de Barnstead. Los reactivos utilizados en el desarrollo experimental, todos ellos de calidad analítica, fueron los que se detallan a continuación:

❖ Estudio de la quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles

Las disoluciones de fenoles y polifenoles se prepararon en medio acuoso. Las sustancias ensayadas fueron: ácido β -resorcílico y vanillina (Acros); ácido gálico y resorcinol (U.C.B.); ácido tánico, rutina y eugenol (Guinama); fenol (Probus); hidroquinona (Panreac); ácido protocatechuico, 2,5-dihidroxibenzaldehído, 3-hidroxibenzaldehído, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido γ -resorcílico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ellágico, ácido ferrúlico, ácido gentísico, ácido *o*-coumárico, ácido *p*-coumárico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido vaníllico, aloína, catecol, floroglucinol, isovanillina, narangin, *o*-vanillina, pirogalol, protocatechualdehído, quercetina y salicilaldehído (Aldrich).

Como oxidantes se emplearon KMnO_4 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, N-Bromosuccinimida, H_2O_2 33 % (Panreac); $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ (Probus) y como medio de reacción H_2SO_4 96 % y NaOH (Panreac).

❖ Determinación de fenol

Para la preparación del reactor en fase sólida, se inmovilizó de forma natural una resina polimérica no polar tipo Amberlite XAD-4 (Fluka), de un tamaño de malla 20-50, con una superficie específica de $750 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ y un diámetro de poro de 100 (Å).

Las disoluciones de fenol (Probus) se prepararon en medio acuoso. Como oxidante se empleó KMnO_4 (Panreac) y como medio de reacción H_2SO_4 96 % (Panreac). El sensibilizador utilizado fue HCOOH 85 % (Panreac). Para la etapa de acondicionamiento y lavado del reactor se empleó HCl (Merck 37 %) y como eluyente NaOH (Panreac).

En el estudio de interferentes se ensayaron: cisteína (Fluka); leucina, tirosina, 1-naftol, resorcinol, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (U.C.B.); fenilalanina, lisina y $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (Merck); serina, asparagina, histidina, ácido aspártico y Na_2SO_4 (Guinama); 4-cloro-2-nitrofenol, 4-cloro-3-metilfenol y pentaclorofenol (Aldrich); *m*-cresol, *p*-clorofenol y KNO_3 , (Scharlau); $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NaNO_3 y Na_2SO_3 , (Probus); Na_2CO_3 , NH_4NO_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NaH_2PO_4 y NaNO_2 (Panreac).

Otros reactivos utilizados en el desarrollo del trabajo experimental fueron: H_3PO_4 85-88 %, dodecilsulfato sódico (SDS), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, K_2HPO_4 y KH_2PO_4 (Panreac); cloruro de hexadecilpiridinio, β -ciclodextrina y Na_2SO_3 (Fluka); NaIO_4 , naranja de acridina, 8-hidroxiquinoleina (oxina), $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (U.C.B.); $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, (Merck); Rodamina B (Sigma); NaClO , H_2O_2 33 %, HNO_3 60 % y CHCl_3 (Scharlau); metanol, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y NH_3 25% (Probus); HClO_4 70 % (Mallinckrodt); sulfato de quinina (Guinama); 4-aminoantipirina (Riedel-deHaen); NH_4Cl y $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (Merck).

❖ Determinación de ácido tánico

Reactivos

Las disoluciones de ácido tánico (Guinama) se prepararon en medio ácido HClO₄ 60 % (Panreac) junto con el sensibilizador sulfato de quinina (Guinama). Como oxidante se empleó el KMnO₄ (Panreac) y como medio de reacción HClO₄ 60 % (Panreac).

Los reactivos empleados para el estudio de la robustez química del sistema quimioluminiscente, fueron: HClO₄ (U.C.B.), sulfato de quinina (Scharlau) y KMnO₄ (Probus).

En el estudio de interferentes se ensayaron: ácido gálico y Cd(NO₃)₂ (U.C.B.); Ca(NO₃)₂, KH₂PO₄, Mg(NO₃)₂, NaNO₃, Ni(NO₃)₂, Na₂SO₃, MgCl₂ y sal de aluminio-potasio-fosfato (Probus); KCl, KNO₃, Na₂SO₄, Al(NO₃)₃, Co(NO₃)₂, Cu(NO₃)₂, Fe(NO₃)₃, Hg(NO₃)₂, ácido bórico, ácido pícrico, etanol, neomicina sulfato y novocaína (Panreac); glucosa, KI, ácido cítrico, ácido salicílico, citrato sódico, cloruro de benzalconio, dexametazona, difenhidramina, hidrocortisona, metilparaben, nicotinamida, MgO, sacarosa, MgBr₂ y mentol (Guinama); alcohol de romero y glicerina (Duc Química); benzocaína y calamina (Acofarma); ZnCl₂ (Scharlau); fenol (Doesder); ZnO, ZnSO₄ y sulfatiazol (Aldrich); sulfanilamida (Fluka).

Otros reactivos utilizados durante el trabajo del laboratorio fueron: K₃Fe(CN)₆, H₂SO₄ 96 %, HNO₃ 60 %, H₃PO₄ 85 %, HCl 37 %, dodecilsulfato sódico (SDS), 8-hidroxiquinoleína (oxina), dioxano 20 %, etanol, HCOOH 85 %, Triton X-100 y dimetilformamida (Panreac); β-ciclodextrina (Fluka); acetona (Duc Química); acetonitrilo (Certified); naranja de acridina y ácido fosfomolibdico (U.C.B.); Na₂SO₃ (Probus); Na₂CO₃ (Prolabo); Na₂WO₄ (Scharlau); rodamina 6G y rodamina B (Sigma); cloruro de hexadecilpiridinio (HDPC).

Formulaciones farmacéuticas

- Antihemorroidal Cinfa (Pomada, Via tópica rectal)
Laboratorios Cinfa, S.A.
Huarte. Pamplona
- Depurativo de Richelet (Suspensión oral)
Vitafarma
Hernani. Guipúzcoa

Muestras galénicas

- Solución de ácido tánico

❖ Determinación de hidroquinona

Reactivos

Las disoluciones de hidroquinona (Panreac) se prepararon en medio ácido H₂SO₄ 96 % (Panreac) junto con el sensibilizador sulfato de quinina (Guinama) y el tensoactivo cloruro de benzalconio (Guinama). Como oxidante se empleó el KMnO₄ (Panreac) y como medio de reacción H₂SO₄ 96 % (Panreac).

Los reactivos que se utilizaron en el ensayo de la robustez química fueron H₂SO₄ (Merck), KMnO₄ (Probus), sulfato de quinina (Fluka), KMnO₄ (Probus) y hidroquinona (Merck).

En el estudio de las interferencias químicas se ensayaron: acetona (Scharlau); β-ciclodextrina (Fluka); ácido ascórbico (Vitamina C) y ácido cítrico (Panreac); ácido glicólico (Acofarma); ácido retinoico (vitamina A), aloe vera, glicerina, lauril sulfato sódico, metilparaben, propilenglicol, sulisobenzona y trietanolamina 99 % (Guinama); Na₂EDTA, NH₃ 25 %, Na₂SO₃, KBr, acetato sódico, KH₂PO₄, NaNO₂,

Na₂SO₄, Na₂SO₃, Ca(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂, Mn(NO₃)₂, Ni(NO₃)₂ y Zn(NO₃)₂ (Probus); etanol (Merck); metabisulfito sódico, NaCl, ácido bórico, NaOH, metol, tetraborato sódico, NaNO₃, Al(NO₃)₃, NH₄Cl, Co(NO₃)₂, Cu(NO₃)₂, Cr(NO₃)₃, Fe(NO₃)₃, Hg(NO₃)₂, Pb(NO₃)₂ y KNO₃ (Panreac); Urea, Na₂CO₃ y AgNO₃ (Prolabo); Ba(NO₃)₂ y Cd(NO₃)₂ (U.C.B).

Otros reactivos empleados a lo largo del trabajo fueron: HNO₃ 60 %, H₃PO₄ 85 %, HClO₄ 60 %, HCl 37 %, Triton X-100, dioxano 20 %, HCOOH 85 %, 8-hidroxiquinoleína (oxina) y dimetilformamida (Panreac); Tween 80, cloruro de benzalconio 50 % (BAC), etanol y eugenol (Guinama); dodecilsulfato sódico (SDS), cloruro de hexadecilpiridinio y β-ciclodextrina (Fluka); naranja de acridina y resorcinol (U.C.B.); rodamina 6G y rodamina B (Sigma); acetona (Scharlau); acetonitrilo (Certified); CTAB (cetil trimetilamonibromuro) (Merck); Na₂SO₃ y metanol (Probus); floroglucinol, catecol, ácido 4-hidroxibenzoico y quercetina (Aldrich).

Formulaciones farmacéuticas

- Nadona 2% (Crema)
Laboratorios Medea, S.A.
Sant Joan Despí. Barcelona
- LicoStrata (Gel)
Cantabria, S.A.
Santander

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Proceso de optimización

En todos los trabajos se utiliza una secuencia de optimizaciones consecutivas en las que se combina el método univariante con el método *Simplex Modificado*.

Cada trabajo experimental se inicia con la optimización de las variables físico-químicas del sistema mediante el método univariante. Con la información obtenida se emplea el método Simplex Modificado; el cual se aplica más de una vez, ajustando los límites del siguiente simplex en función de los resultados anteriores. A continuación, se preseleccionan varios vértices atendiendo a criterios de sensibilidad, reproducibilidad y velocidad de inserción; de entre ellos se elige aquel que proporciona un mejor compromiso entre dichos parámetros. Finalmente se reoptimizan los parámetros químicos u otras variables que influyan en el sistema, mediante el método univariante o con el método multivariante *Simplex Modificado*, como en el caso de la determinación de hidroquinona.

Método Simplex Modificado

Si bien su origen está en el método “Simplex secuencial” introducido por Spendley²⁸⁸, ha sufrido varias modificaciones con el tiempo, siendo las introducidas por Nedler y Mead²⁸⁹ las que mayor aceptación han tenido.

Desde el punto de vista matemático²⁹⁰ el método simplex es un algoritmo para la resolución del problema de optimización sin restricciones de \mathbb{R} (números reales), y pertenece a los denominados *métodos secuenciales de búsqueda directa*, basados en el examen secuencial de las soluciones ensayadas y no en la utilización de derivadas de la función objeto.

Aunque la mayoría de los métodos de optimización de búsqueda directa no poseen demostraciones de convergencia, está generalmente probado en la práctica que raramente fallan en el cálculo del óptimo, resultando muy eficientes particularmente en aquellos casos en que la función objeto está sujeta a errores aleatorios, condición que se da en la mayoría de los casos en Química Analítica.

El objeto del método simplex secuencial es forzar una figura geométrica, “simplex” regular en el método de Spendley, con un número de vértices igual al de las n variables más una ($n+1$), que correspondería a un triángulo equilátero en un espacio en dos dimensiones $n=2$, un tetraedro para $n=3$ y así sucesivamente, a moverse a la región donde la respuesta sea óptima. Para conseguirlo deben de cumplirse las siguientes reglas:

1. Se realiza un movimiento después de cada observación.
2. El nuevo simplex resulta de descartar el vértice que da peor valor de la función que se va a optimizar y reemplazarlo por su imagen especular a través de la hipercara definida por los restantes vértices.
3. Si la respuesta en el punto reflejado es la peor del nuevo simplex, en vez de aplicar la segunda regla debe descartarse el vértice que da el segundo peor valor y continuar.
4. Debe reobservarse la respuesta de cualquier punto que haya sido retenido ($n+1$) simplex.
5. Si el vértice cae fuera de los límites establecidos para las variables independientes, se le asigna el peor valor de respuesta, para que un nuevo movimiento devuelva el simplex a la zona de valores aceptables para las variables consideradas.

La modificación propuesta por Nedler y Mead consiste en permitir al simplex además de la reflexión, la dilatación hacia la región que le es favorable o la contracción en la que le es desfavorable. Este método, conocido como “Simplex

modificado” (MSM), es más eficiente y se ha propuesto para trabajar con un número de variables que no exceda de 5 ó 6.

La elección del simplex inicial, tanto en lo que se refiere a su posición , como a su tamaño, debe de ser la adecuada. Yabro y Deming²⁹¹ recomiendan comenzar con un simplex de tamaño grande, ya que de este modo puede explotarse una zona extensa. Estos autores proponen comenzar con un simplex equilátero, de lado “S” y con un vértice situado en el origen de coordenadas de un espacio de n dimensiones, siendo n y S el tamaño del lado.

La principal ventaja de su utilización frente al método clásico univariante es la posibilidad de observar al mismo tiempo el efecto de todas las variables y sus posibles interacciones.

Si las coordenadas que proporciona el simplex fueran de un máximo local, es necesario asegurarse de que, dicho máximo, es el absoluto mediante un segundo rastreo a partir de simplex iniciales diferentes, o bien tomando estos de forma que abarquen la mayor superficie posible de trabajo. En cualquier caso, dentro del campo de la Química Analítica, no existe un solo conjunto de valores para los parámetros experimentales en que se obtenga un valor máximo de la función. En estas circunstancias, se escogen aquellos valores que experimental y analíticamente convengan más, siendo además interesante complementar con estudios previos y/o posteriores, el proceso de optimización.

Posteriormente, se han publicado otros trabajos referentes a la optimización automatizada de métodos de análisis por inyección en flujo (F.I.A.), presentados por Betteridge y col.²⁹², de los cuales se ha publicado una revisión recientemente⁴.

Procedimiento

El simplex inicial se obtuvo según el método de Yabro y Deming con un tamaño inicial uno. El primer vértice se situó en el origen de coordenadas. La región de variables se normalizó según la modificación propuesta por Morgan y Deming²⁹³.

El método operativo consistió en introducir los datos iniciales en el programa MSM: tamaño de simplex, número de variables e intervalo aceptado de las mismas. Éste proporcionaba los valores a ensayar experimentalmente y solicitaba el resultado obtenido para la función en esas condiciones. Este valor se tomó como la media de diversos picos menos la altura media de los picos de “blanco”, en caso de que fuera necesario. Con la altura media corregida se alimentaba el programa MSM, el cuál volvía a proponer un nuevo conjunto de valores a ensayar. El proceso continuaba hasta que las alturas eran considerables y similares en experiencias distintas, y el programa iba centrándose en una determinada zona. Además, durante todo el estudio se mantuvieron constantes las variables químicas optimizadas anteriormente.

3.2.2. Preparación y activación del reactor en fase sólida

La preparación del reactor a incorporar en el sistema de análisis por inyección en flujo, se obtiene inmovilizando de forma natural una resina polimérica no polar tipo Amberlite XAD-4 en una columna cromatográfica de vidrio, de 10 cm de longitud y 2.8 mm de diámetro interno.

Para ello, las partículas de resinas se sumergen en una suspensión ácida (HCl 0.01 M) durante 2 ó 3 horas para que se hinchen y alcancen su superficie máxima. A continuación, se procede al relleno del reactor mediante la aspiración de la resina en la suspensión ácida con ayuda de una trompa de vacío, agitando el reactor tras cada adición de reactivo para asegurar un buen empaquetamiento y una distribución uniforme de las partículas, así como la ausencia de burbujas de aire en su interior.

Para la activación del reactor se hacen fluir a su través a un caudal de 3 ml·min⁻¹ diferentes disoluciones: metanol, agua, HCl 0.01 M, agua, NaOH 0.01 M y agua, durante 5 minutos cada una y sin alterar el orden.

3.2.3. Preparación de muestras reales

Aunque posteriormente se expondrá en cada parte experimental la preparación de las muestras reales correspondientes, a continuación se describe, de forma general, el tratamiento previo a que se sometieron las distintas muestras analizadas como preparaciones farmacéuticas, orina, reveladores fotográficos y aguas tanto residuales como superficiales.

- En el caso de la suspensión oral, se transfirió una alícuota de la disolución comercial y se realizaron las diluciones necesarias.

- Para la crema y el gel se pesó en un vaso de precipitados una porción de muestra y se efectuó una extracción sólido-líquido con 35 ml de agua durante 2 horas, para finalmente pipetear del sobrenadante una alícuota y transferirla a un matraz aforado y llevarla a volumen.

- La pomada se pesó en un vaso de precipitados y se realizó una extracción sólido-líquido a 60°C con 35 ml agua con agitación simultánea durante 30 minutos. A continuación, la disolución resultante se centrifugó y del sobrenadante se tomó el volumen de muestra necesario para obtener la concentración deseada.

- Las preparaciones galénicas se elaboraron de forma adecuada²⁹⁴, y por ser soluciones bastante viscosas, se pesó una cierta cantidad de las mismas y se llevaron a cabo las correspondientes diluciones.

- La muestra de orina se filtró con una placa del número 4, se añadió una cantidad de analito y se llevó a volumen con la orina filtrada. A partir de esta disolución se hizo la dilución oportuna para obtener una concentración dentro del intervalo de linealidad del método propuesto.

- Las muestras de agua se filtraron con una placa de número 4, posteriormente se adicionó una cantidad de analito o una alícuota de una disolución concentrada del mismo y se llevaron a volumen con la muestra filtrada. Para posteriormente realizar las diluciones oportunas con el propósito de obtener una concentración final dentro del intervalo de aplicabilidad del método. Hay que destacar que para el análisis del agua de manantial no fue necesario filtrarla, ya que no presentaba materia en suspensión.

- El revelador fotográfico se preparó en el laboratorio según la composición descrita²⁹⁵, y al tratarse de una disolución acuosa requirió de una serie de diluciones hasta obtener una concentración dentro del intervalo de linealidad del método. Además, de calentar la muestra en medio ácido a 80°C durante 30 minutos, para eliminar la presencia del sulfito sódico.

Cada una de estas muestras se preparó por triplicado repitiendo los procesos descritos anteriormente.

Capítulo cuarto

CONECTIVIDAD MOLECULAR APLICADA A LA
PREDICCIÓN DE QUIMIO-LUMINISCENCIA DIRECTA
DE FENOLES Y POLIFENOLES

4.1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de la conectividad molecular para la predicción del comportamiento quimioluminiscente de las moléculas cuando reaccionan con oxidantes fuertes en fase líquida, ha sido desarrollada por nuestro grupo de investigación²⁹⁶. Para llevar a cabo este estudio se aplicó el análisis lineal discriminante (ALD) a moléculas con comportamiento quimioluminiscente y a otras sin el comportamiento.

Para la búsqueda y clasificación de las mismas, se realizó una revisión bibliográfica a través de la literatura analítica y un barrido experimental con un montaje en flujo continuo, ya que, los métodos en flujo continuo son la mejor manera de monitorizar las reacciones en fase líquida.

La búsqueda de moléculas quimioluminiscentes fue sencilla, se encontraron (76) sustancias^{89,94,122,197,202,297} que presentaban este comportamiento. El problema fue encontrar moléculas no quimioluminiscentes, debido a que los investigadores que trabajan en este campo no suelen publicar las moléculas encontradas como no quimioluminiscentes (resultados negativos). Afortunadamente se encontraron algunas de ellas, concretamente (8) sustancias en un libro⁸⁹ y (24) en algunos artículos publicados^{94,197,297}. Además, con el propósito de incrementar el número de sustancias quimioluminiscentes se realizó un barrido experimental con fármacos y pesticidas, en total 92 compuestos.

4.2. BARRIDO EXPERIMENTAL

El barrido experimental se realizó en el sistema en flujo continuo que se describe en la Figura 4.1, con el objeto de obtener una señal quimioluminiscente a partir del producto de una reacción de oxidación.

Este montaje constaba de cuatro canales que confluían dos a dos en sendas conexiones en punta de flecha. Por el canal 1 circulaba la disolución acuosa del analito o bien el blanco (agua desionizada) y por el canal 2 la disolución para el ajuste del medio de la reacción, confluyendo ambos en un conector en forma de punta de flecha. Por el canal 3 fluía la misma disolución de ajuste del medio y finalmente por el canal 4 circulaba el oxidante fuerte responsable de la reacción, emergiendo ambos en una confluencia en punta de flecha.

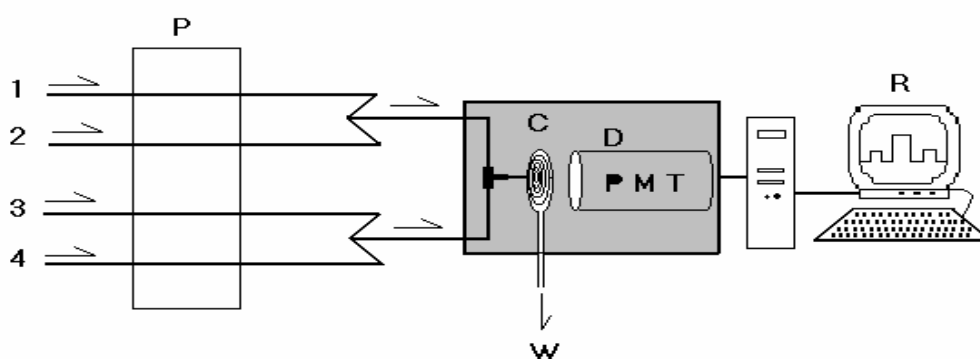


Figura 4.1: Montaje empleado para el barrido experimental.

Canal 1: Disolución acuosa de sustancia ensayada (blanco, agua destilada); **Canal 2 y Canal 3:** Disolución para ajustar el medio de reacción; **Canal 4:** Disolución oxidante; **P:** Bomba peristáltica; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho; **R:** Recolección, tratamiento y representación de los resultados.

Todas las disoluciones eran impulsados a una velocidad de $2.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ hacia una conexión en forma de T, que desembocaba en la celda de flujo en espiral, donde finalmente se producía la señal quimioluminiscente detectada por el tubo fotomultiplicador.

Se estudiaron los siguientes oxidantes fuertes: Ce (IV), KMnO_4 , en medio ácido sulfúrico y el H_2O_2 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en medio hidróxido sódico. Las concentraciones de las disoluciones acuosas empleadas para los ensayos fueron de 400.0 ppm para las sustancias ensayadas, $0.02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ para los oxidantes y $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ para los medios.

La señal analítica se calculó por diferencia entre la presentada por la muestra y la generada por el blanco, considerando no quimioluminiscente la sustancia cuando la señal analítica de la muestra menos el blanco era menor que dos veces el valor medio del ruido de fondo, para cualquier oxidante y medio.

4.3. CONECTIVIDAD MOLECULAR

4.3.1. Cálculo de los descriptores o índices topológicos

En el trabajo descrito anteriormente²⁹⁶ se han utilizado índices de carga J_i^{298} , índices electrotopológicos atómicos S_i^{299} y los índices de conectividad de Kier y Hall hasta orden $10^m \chi_t^{283}$.

4.3.2. Análisis lineal discriminante

El análisis lineal discriminante (ALD), permite obtener ecuaciones lineales capaces de distinguir entre dos grupos de poblaciones, es decir, clasificar correctamente una molécula como activa o no activa y en este caso, como quimioluminiscente o no quimioluminiscente. Para ello, se utiliza el programa informático BMDP 7M, que aplicado a dos grupos de moléculas, uno con actividad quimioluminiscente probada y otro sin actividad quimioluminiscente reconocida y previo cálculo de los índices topológicos de cada una de las moléculas, es posible establecer una función discriminante.

Concretamente para realizar este estudio se utilizaron 200 compuestos que se dividieron en dos grupos; un grupo de entrenamiento (formado por 96 compuestos activos y no activos) utilizado para el cálculo de la función discriminante y un grupo test (constituido por 104 compuestos activos y no activos) cuya única misión era validar la calidad de la función discriminante obtenida.

La bondad de la función discriminante se puede realizar por dos métodos diferentes:

❖ Determinar el porcentaje de acierto en la clasificación de los grupos de moléculas activas e inactivas utilizadas en el estudio, es decir, del grupo de entrenamiento activo y del grupo de entrenamiento inactivo respectivamente.

❖ Predicción de la clasificación de moléculas activas e inactivas no incluidas en el grupo de estudio (grupo test activo y grupo test inactivo), este procedimiento se conoce como validación cruzada.

De todas las correlaciones efectuadas por el programa informático BMDP 7M, se escogerá aquella ecuación que presente los mejores resultados para los dos criterios de selección detallados anteriormente. Sabiendo que la ecuación discriminante clasifica las moléculas como activas o quimioluminiscentes para valores positivos de la misma (**DF>0**), y como inactivas o no quimioluminiscentes para valores negativos (**DF<0**).

La función discriminante elegida fue:

$DF = -87.98^7 \chi_{CH} - 276.127 \chi_{CH}^V + 1.224S_{(-CH=)} - 35.38J_3^V + 66.81J_4^V - 0.20$		
$N = 96$	$F = 19.5$	$U - statistics (Wilks' \lambda) = 0.427$

En la Tabla 4.1 y 4.2 se resumen los resultados y las clasificaciones obtenidas con la función discriminante para el grupo de entrenamiento y el test. Así mismo, en las tablas se detallan:

❖ Los resultados obtenidos por aplicación de la ecuación discriminante a los correspondientes grupos de moléculas activas e inactivas (DF) para los dos subgrupos de trabajo (entrenamiento y test).

❖ El valor de la probabilidad de clasificación para cada compuesto (Prob).

❖ Para todos los grupos de moléculas en el apartado de clasificación (C), se asignará el signo “+” para las moléculas clasificadas como activas al aplicar la ecuación y el signo “-” para las catalogadas como no activas.

Tabla 4.1: Resultados obtenidos del ALD para el grupo *test* (activos e inactivos).

Compuesto	DF	Prob	C	Compuesto	DF	Prob	C
GRUPO ACTIVO							
Pirogalol	0.373	0.592	+	Clorfeniramina	1.591	0.831	+
Noradrenalina	1.314	0.788	+	Bromhexina	1.573	0.828	+
Sulfamerazina	2.975	0.951	+	Acetilcisteína	-0.199	0.450	-
Captopril	-1.995	0.120	-	Amitriptilina	1.169	0.763	+
Metoclopramida	2.817	0.944	+	Isoluminol derivado (18)	1.530	0.822	+
Isoluminol	1.410	0.804	+	Isoluminolderivado (26)	2.879	0.947	+
Tirosina	-1.350	0.206	-	Oxitetraciclina	3.453	0.969	+
Proflavina	1.883	0.868	+	Ácido pipemídico	1.459	0.811	+
Isoniazida	-0.498	0.378	-	Guafenesina	-0.027	0.493	-
6-Monoacetilmorfina	4.605	0.990	+	Acridina derivado (5)	2.358	0.914	+
Nalorfina	6.178	0.998	+	Acridina derivado (1)	2.231	0.903	+
Buprenorfina	0.412	0.602	+	Histamina	2.289	0.908	+
Clortetraciclina	3.229	0.962	+	Benzidamina	0.008	0.502	+
Ácido gálico	0.458	0.613	+	Isoxicam	2.250	0.905	+
Indol	3.912	0.980	+	Hidrocortisona	2.551	0.928	+
3-Metilindol	-0.442	0.391	-	Propifenazona	1.569	0.828	+
Isoluminol derivado (17)	1.735	0.850	+	Penicilina G	0.317	0.579	+
Isoluminol derivado (19)	1.919	0.872	+	Tetracaína	2.570	0.929	+
Isoluminol derivado (20)	1.718	0.848	+	Sulfanilamida	0.173	0.543	+
Ácido mefenámico	0.164	0.541	+	Prometazina	2.967	0.951	+
Indometacina	0.634	0.653	+	Piramidon	3.185	0.960	+
Hidrocortiazida	-0.299	0.426	-	Penicilamina	1.040	0.739	+
Ácido fólico	2.159	0.896	+	Novocaína	2.352	0.913	+
Ácido fenoximetil penicílico	-0.017	0.496	-	Loprazolam	1.562	0.827	+
Flufenazina	2.522	0.926	+	Tartrazina	-1.569	0.172	-
Emetina	5.093	0.994	+	Sulfametoxazol	0.151	0.538	+
GRUPO INACTIVO							
Ácido aspártico	-2.912	0.948	-	Urea	-0.196	0.549	-
Arginina	-1.659	0.840	-	p-Benzoquinona	-4.671	0.991	-
Alanina	-7.557	0.999	-	Glucosa	-1.514	0.820	-
Uracilo	-3.814	0.978	-	Tirosina	-1.350	0.794	-
Timina	-5.170	0.994	-	DMCTC	5.622	0.996	+
Lorazepan	-2.668	0.935	-	Vitamina B ₁	-0.848	0.700	-
Temazepan	-2.641	0.933	-	Veronal	-5.028	0.993	-
Flunitrazepan	-2.419	0.918	-	Clorhexidina	0.292	0.428	+
Isoluminol derivado (2)	2.224	0.098	+	Sucrosa (sacarosa)	-1.302	0.786	-
Isoluminol derivado (8)	2.193	0.100	+	Treonina	-1.919	0.872	-
Tolazamida	-4.833	0.992	-	Asparagina	-3.055	0.955	-
Estearato	-0.191	0.548	-	Valina	-0.931	0.717	-
Cloramina T	-0.483	0.619	-	Isoluminol derivado (7)	1.407	0.197	+
Riboflavina	0.452	0.389	+	Isoluminol derivado (5)	1.755	0.147	+

Tabla 4.2: Resultados del ALD para el grupo de *entrenamiento* (activos e inactivos).

Compuesto	DF	Prob	C	Compuesto	DF	Prob	C
GRUPO ACTIVO							
Luminol	1.787	0.857	+	Codeína	4.429	0.988	+
Dietilisoluminol	1.814	0.860	+	Oxitetraciclina	3.453	0.969	+
Isoluminol derivado	0.851	0.701	+	Doxiciclina	3.453	0.969	+
Isoluminol derivado	1.376	0.798	+	Siringaldazina	6.703	0.999	+
Acriflavina derivado	0.775	0.685	+	Lucigenina	2.333	0.912	+
Acriflavina derivado	0.502	0.623	+	Lofina	1.579	0.829	+
Acriflavina derivado	2.677	0.936	+	Normorfina	2.245	0.990	+
DMAL	1.279	0.782	+	Morfina	3.709	0.976	+
TDE	0.728	0.674	+	Ondansetron	0.866	0.704	+
Ácido flufenámico	0.117	0.529	+	TCPO	0.283	0.570	+
Epinefrina	2.490	0.923	+	DNPO	0.602	0.646	+
Skatole	-0.442	0.391	-	2,3-dimetilindol	-3.185	0.040	-
Amoxicilina	0.158	0.540	+	Triptofano	-0.546	0.367	-
Dihidromorfina	-0.825	0.305	-	L-Dopa	-0.627	0.348	-
Ninhidrina	-3.847	0.021	-	Trimetoprim	3.455	0.969	+
Sulfadiazina	2.098	0.891	+	Antipirina	1.995	0.880	+
Sulfametoxipiridazina	0.321	0.580	+	Benzoftalazina 1,4-diona	1.899	0.870	+
Naloxona	1.438	0.808	+	Eskacina	2.308	0.910	+
Tetraciclina	2.915	0.949	+	Clorpromazina	2.061	0.887	+
Triptamina	1.246	0.777	+	Tioridazina	1.819	0.860	+
Resorcinol	0.184	0.546	+	Hidroquina	1.742	0.851	+
Floroglucinol	0.090	0.522	+	Catecol	0.347	0.586	+
Ácido 3-Indoliacético	0.687	0.665	+	Dopamina	1.556	0.826	+
Acridina derivado (2)	-0.385	0.405	-	Probutol	5.806	0.997	+
Adrenalina	2.490	0.923	+	Normetanefrina	1.661	0.840	+
GRUPO INACTIVO							
Ácido glutámico	-3.611	0.955	-	Tetradifon	1.152	0.240	+
Mentol	1.133	0.244	+	Metomil	-3.920	0.981	-
Xantina	-4.207	0.985	-	Lindano	-3.001	0.953	-
Carnitina	1.468	0.187	+	Fenilpropanolamina	-0.315	0.578	-
Inositol	-4.162	0.985	-	Nortriptilina	1.223	0.227	+
Neomicina	-0.859	0.703	-	Ácido nicotínico	-2.209	0.901	-
Biguanina	-1.293	0.785	-	Levamisol	-8.765	1.000	-
Vitamina K ₃	-1.778	0.855	-	Fenobarbital	-1.961	0.877	-
Sorbitol	-0.996	0.730	-	Cistina	-4.292	0.987	-
Sacarina	-0.475	0.617	-	Ciclohexilamina	-2.248	0.904	-
Prolina	-0.380	0.530	-	Atropina	-4.290	0.986	-
Pirazinamida	-1.102	0.751	-	Ampicilina	-0.247	0.561	-
Nicotinamida	-2.048	0.886	-	Ácido oxálico	-3.735	0.977	-
Moroxidina	-0.538	0.631	-	Ácido mucónico	5.973	0.003	+
Metilnicotinato	-2.416	0.918	-	Ácido pirúvico	-7.159	0.999	-
Metformin	-6.111	0.998	-	Ácido tartárico	-2.620	0.932	-
Lisina	-1.385	0.800	-	Vitamina B ₆	0.121	0.470	+
Fenilalanina	-2.515	0.925	-	Vitamina K ₃	-1.778	0.855	-
Dextrometorfano	-0.108	0.527	-	Ciprofloxacina	4.575	0.010	+
Cloranfenicol	-0.588	0.643	-	Xantina	-4.207	0.985	-
Cafeína	-4.733	0.991	-	Ácido úrico	-4.278	0.986	-
Alprazolam	-3.561	0.972	-	Triazolam	-2.828	0.944	-
Nitrazepan	-3.412	0.968	-	Lormetazepan	-1.892	0.869	-

En las Tablas 4.1 y 4.2, se aprecia que en el grupo de entrenamiento se obtiene un acierto del 86% para los activos y del 84% para los inactivos, mientras que en el grupo test el porcentaje de acierto es de un 83% para los activos y del 75% para los inactivos, lo que demuestra la calidad de predicción, que se corrobora cuando observamos el grupo de las benzodiazepinas, ya que, es sabido que no poseen emisión quimioluminiscente excepto el loprazolan¹⁸⁷.

Con los datos obtenidos de la aplicación de la función discriminante a los compuestos anteriores se realizan los diagramas de distribución, que permiten evaluar la expectativa o la probabilidad de actividad para un compuesto en un intervalo de la función discriminante.

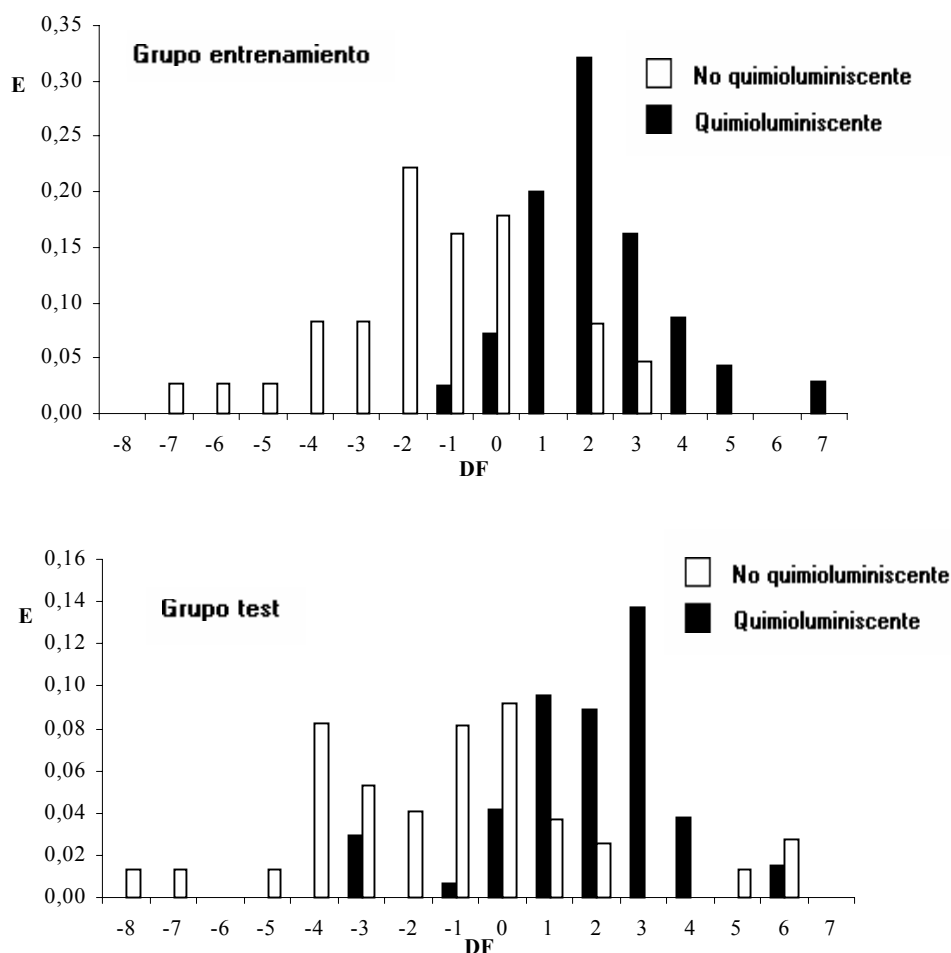


Figura 4.2: Diagramas de distribución de la actividad quimioluminiscente.

4.3.3. Predicción de la quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles por conectividad molecular

Una vez establecida la función discriminante se seleccionaron diversos fenoles y polifenoles³⁰⁰⁻³⁰⁴, muchos de ellos con aplicación farmacológica conocida, para predecir el comportamiento quimioluminiscente de los mismos cuando reaccionan con oxidantes fuertes. Para un total de 88 compuestos se calcularon sus índices topológicos y se les aplicó la función discriminante descrita en el apartado 4.3.2.

De los 88 fenoles y polifenoles ensayados teóricamente con la ecuación discriminante, 78 fueron predichos como quimioluminiscentes $DF > 0$.

Dada la bondad de las predicciones teóricas se eligieron de manera aleatoria 35 de los compuestos que fueron clasificados como positivos y se realizó un barrido experimental con el montaje en flujo continuo descrito en la Figura 4.1, con el objeto de estudiar la posibilidad de obtener una señal quimioluminiscente a partir del producto de una reacción de oxidación.

Las reacciones fueron monitorizadas con la sustancia ensayada (canal 1; a una concentración de 200.0 ppm), con diferentes medios (canal 2 y 3; H_2SO_4 o $NaOH$, ambos $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) y distintos oxidantes fuertes a una concentración $0.02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (canal 4; $Ce(IV)$, $KMnO_4$, en medio ácido sulfúrico; H_2O_2 , $K_3Fe(CN)_6$ en medio hidróxido sódico; N-Bromosuccinimida tanto en medio ácido como sulfúrico) y una velocidad de flujo de $2.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para todos los canales.

En la Tabla 4.3, se encuentran detallados los DF para los compuestos ensayados, la probabilidad y los resultados de las señales analíticas obtenidas empíricamente con cada compuesto y los diferentes oxidantes.

Sustancia	DF	Prob	Señal Quimioluminiscente (kHz)					
			KMnO ₄	Ce(IV)	N-Bromo succinimida		K ₃ Fe(CN) ₆	H ₂ O ₂
					H ₂ SO ₄	NaOH		
2,5-dihidroxibenzaldehído	2.20	0.900	374.50	0.00	0.00	0.42	9.24	0.42
3-hidroxibenzaldehído	0.54	0.633	339.37	0.00	0.00	1.19	24.32	0.15
4-hidroxibenzaldehído	2.20	0.900	225.13	0.00	0.02	0.00	2.15	0.00
Ácido 4-hidroxibenzoico	1.29	0.784	262.91	0.00	0.00	0.61	0.44	0.00
Ácido γ-resorcíclico	1.67	0.836	290.42	2.39	0.00	0.00	22.79	0.00
Ácido β-resorcíclico	1.93	0.876	480.15	3.93	0.00	0.00	53.70	0.00
Ácido cafeico	3.63	0.970	230.45	0.00	0.00	3.75	27.67	0.23
Ácido clorogénico	1.85	0.867	61.67	0.00	0.00	1.71	33.02	0.05
Ácido ellágico	3.13	0.950	14.85	0.00	0.00	113.14	198.10	1.53
Ácido ferrúlico	4.19	0.980	59.68	0.00	0.00	0.24	64.84	0.00
Ácido gálico	0.46	0.610	178.83	9.81	0.00	0.56	70.83	0.00
Ácido gentísico	1.60	0.830	320.23	0.00	0.00	10.55	3.13	0.03
Ácido orto-coumárico	2.94	0.948	267.04	0.00	0.00	2.38	84.06	0.08
Ácido para-coumárico	3.94	0.982	206.61	0.00	0.00	1.44	15.34	1.44
Ácido protocatechuico	0.89	0.710	186.02	0.00	0.00	0.15	10.35	0.00
Ácido sinápico	5.00	0.993	20.65	0.00	0.00	0.05	7.55	0.04
Ácido siríngico	2.07	0.890	67.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10
Ácido tánico	2.34	0.910	44.41	0.40	0.00	16.20	419.90	2.55
Ácido vanílico	1.30	0.786	84.66	0.00	0.00	1.95	5.18	0.00
Aloína	2.95	0.947	20.15	1.50	0.00	162.84	151.60	14.88
Catecol	0.34	0.590	335.99	0.00	0.00	8.80	2.66	0.00
Eugenol	3.93	0.976	740.41	0.02	0.00	0.00	11.56	0.00
Fenol	0.13	0.534	757.27	0.00	0.00	0.15	2.10	0.04
Floroglucinol	0.09	0.522	266.75	2.75	0.00	0.11	5.10	0.09
Hidroquinona	1.74	0.854	487.90	0.00	0.00	0.84	3.00	0.84
Isovanillina	1.45	0.806	86.62	0.00	0.00	0.00	25.94	0.00
Narangin	1.06	0.742	42.11	0.00	0.00	0.37	3.34	0.15
Orto-vanillina	1.73	0.850	94.94	0.00	0.00	7.23	1.95	7.23
Pirogalol	0.37	0.592	291.92	3.58	0.00	3.50	127.05	0.37
Protocatechualdehído	1.73	0.850	163.50	0.00	0.00	0.00	8.68	0.00
Quercetina	2.18	0.898	152.19	77.69	0.02	13.54	24.78	0.00
Resorcinol	0.18	0.550	710.80	0.02	0.00	0.00	114.6	0.00
Rutina	1.50	0.818	34.53	0.60	0.00	0.00	13.54	0.00
Salicilaldehído	1.35	0.794	234.46	0.00	0.00	0.10	0.65	0.00
Vanillina	2.30	0.909	59.56	0.01	0.02	0.00	8.08	0.00

Tabla 4.3: Estudio de la quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles. Prob: Probabilidad. En negrita se destacan las sustancias objeto de posteriores estudios.

Como se observa en la Tabla 4.3, los 35 compuestos presentaron un comportamiento quimioluminiscente frente a oxidantes fuertes, lo que corroboraba las predicciones teóricas establecidas.

4.4. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS FENOLES Y POLIFENOLES FRENTE AL PERMANGANATO POTÁSICO EN MEDIO ÁCIDO

Era de destacar que todas las sustancias ensayadas presentaban quimioluminiscencia al reaccionar con el KMnO_4 en medio ácido (Tabla 4.3). Por esta razón, y con el propósito de obtener una mayor información del comportamiento de las mismas frente al permanganato potásico, se decidió realizar un estudio exhaustivo de la influencia de la concentración del oxidante en la señal quimioluminiscente, por ser una variable de suma importancia en este sistema de detección.

Para llevar a cabo esta experiencia, se seleccionaron de la Tabla 4.3 aquellas sustancias que presentaban una emisión quimioluminiscente superior a 100.00 kHz, excepto el ácido gálico y el pirogalol, puesto que ya existían métodos de quimioluminiscencia directa para su determinación. En el caso del ácido tánico aunque el valor de la señal analítica era menor se decidió estudiarlo, debido a que mostraba una elevada quimioluminiscencia con el ferricianuro potásico.

Para un total de 21 compuestos (destacados en negrita en la Tabla 4.3) y con el montaje descrito en la Figura 4.1, se obtuvieron las señales analíticas con concentraciones de 50.0 y 100.0 ppm de las sustancias ensayadas y con 5 concentraciones de KMnO_4 preparadas diariamente, comprendidas entre 1.0×10^{-4} y $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Este intervalo se seleccionó considerando los resultados obtenidos en otros trabajos^{209,210,222} realizados por nuestro grupo de investigación, en los que intervenían reacciones de oxidación de características similares. En las Figuras 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7 se muestran los resultados obtenidos en esta experiencia.

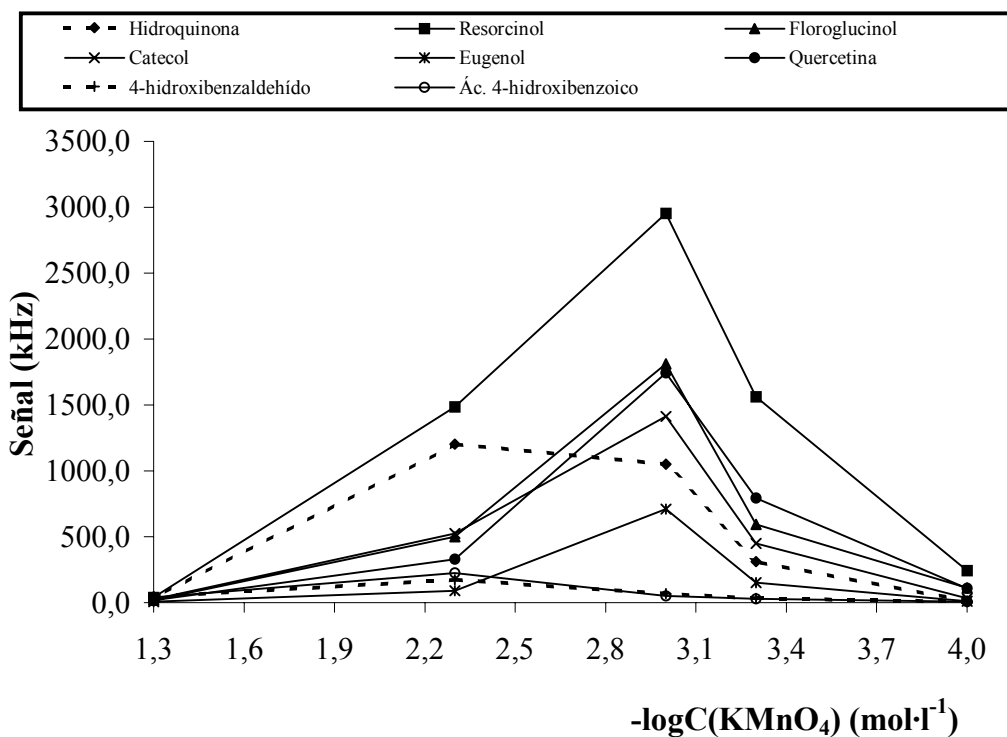


Figura 4.3: Influencia de la concentración de KMnO₄ para 100.0 ppm de analito.

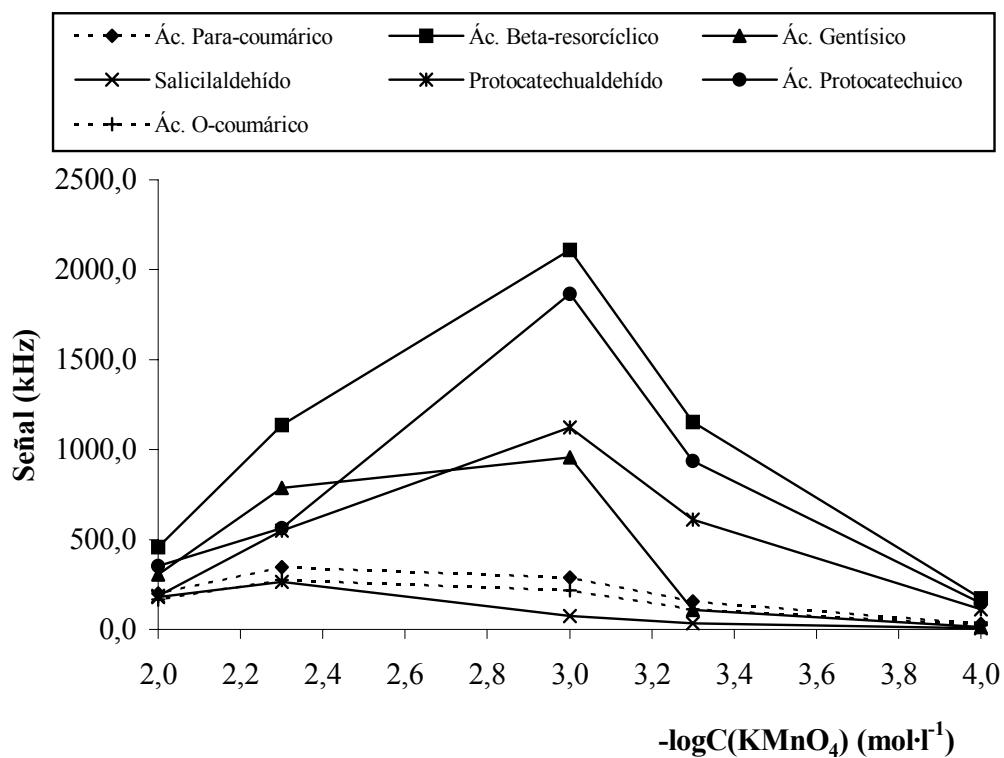


Figura 4.4: Influencia de la concentración de KMnO₄ para 100.0 ppm de analito.

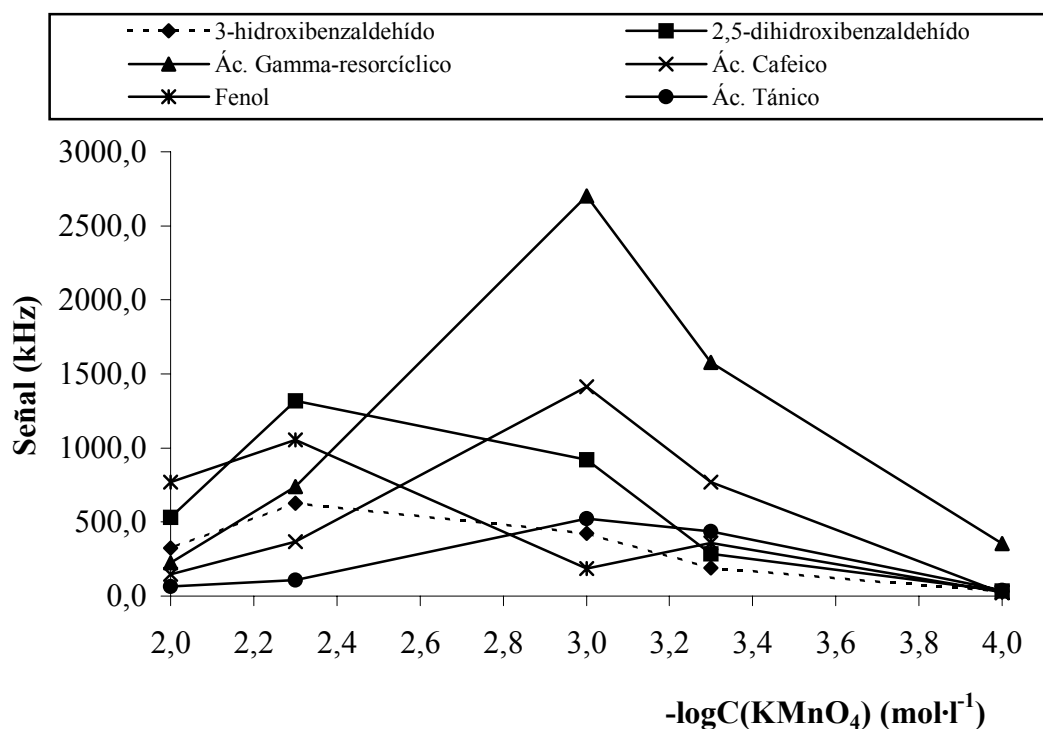


Figura 4.5: Influencia de la concentración de KMnO₄ para 100.0 ppm de analito.

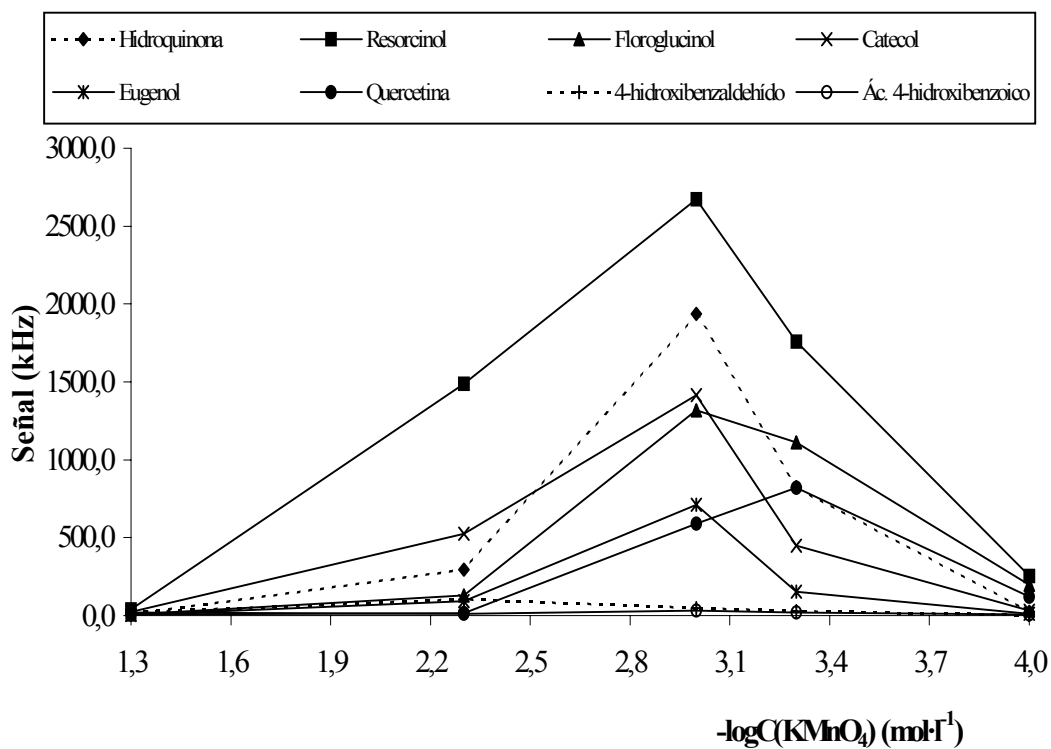


Figura 4.6: Influencia de la concentración de KMnO₄ para 50.0 ppm de analito.

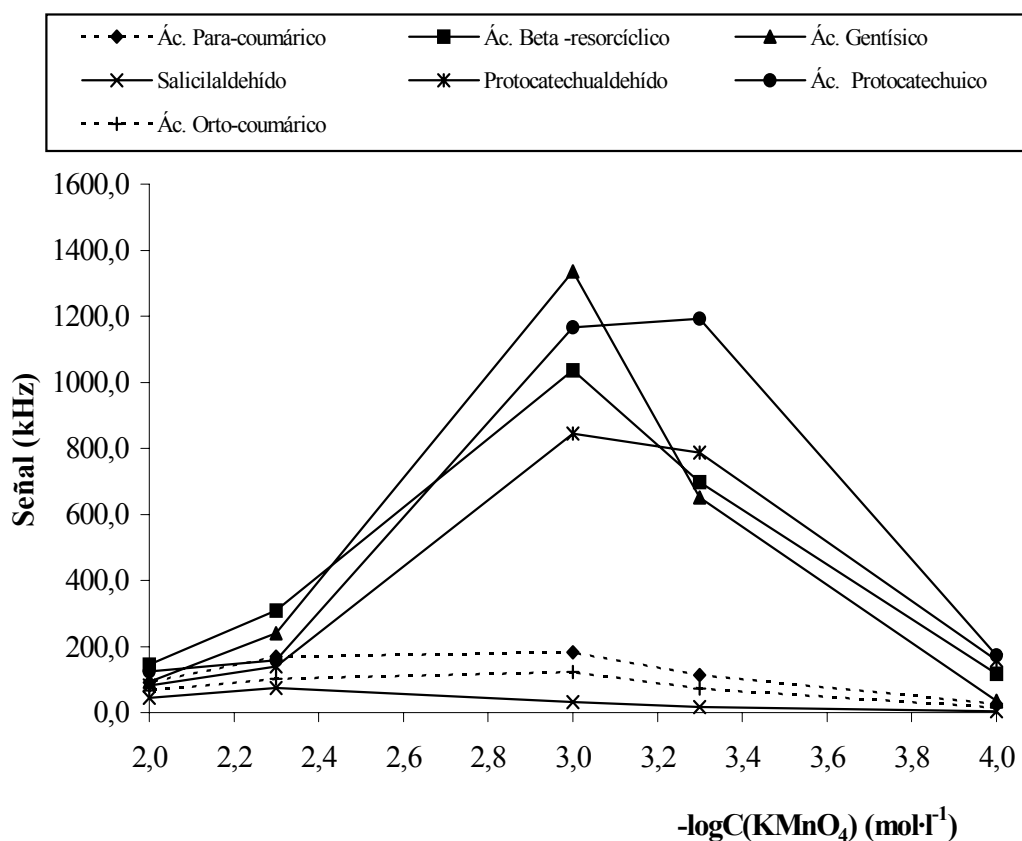


Figura 4.7: Influencia de la concentración de KMnO₄ para 50.0 ppm de analito.

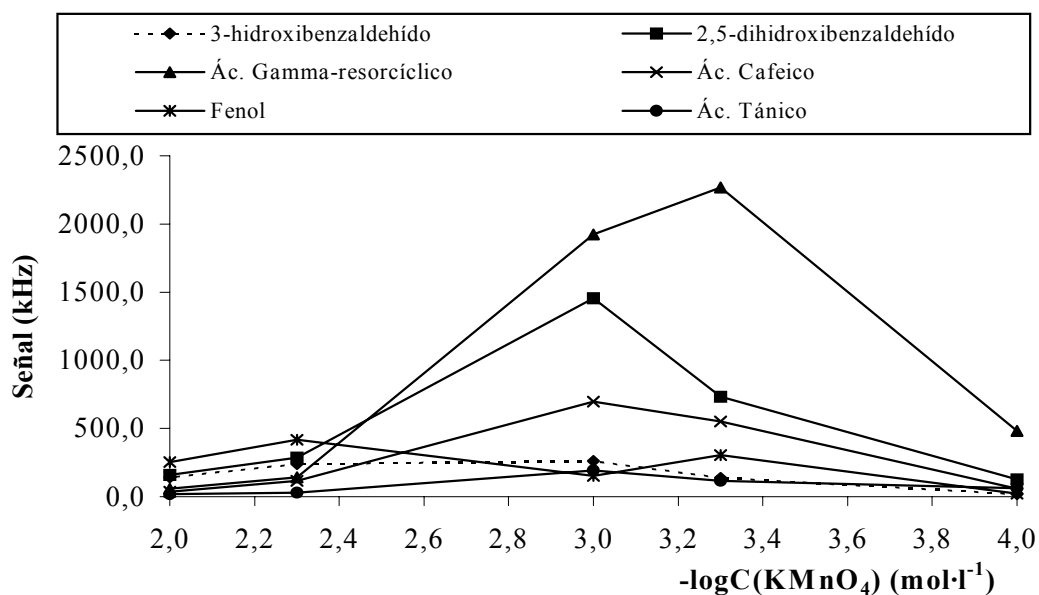


Figura 4.8: Influencia de la concentración de KMnO₄ para 50.0 ppm de analito.

Como se observa en las Figuras, la mejor sensibilidad se obtuvo con concentraciones de KMnO_4 comprendidas entre 5.0×10^{-4} y $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C = 3.3$ a $-\log C = 2.3$) y en la mayoría de los casos la concentración óptima de oxidante fue 1.0×10^{-3} ó $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C = 3.0$ ó $-\log C = 2.3$).

4.5. CONCLUSIONES

El comportamiento quimioluminiscente de un conjunto de fenoles y polifenoles teóricamente predicho, ha sido empíricamente confirmado mediante un sistema en flujo continuo, donde todos los compuestos generan una señal quimioluminiscente al reaccionar con oxidantes inorgánicos fuertes. Por lo que se puede afirmar que la función discriminante presenta un éxito del 100% en cuanto a la predicción de la actividad quimioluminiscente.

Cabe destacar, que el permanganato potásico y el ferricianuro potásico son los que producen una intensidad de quimioluminiscencia más elevada y que no existe una correlación entre los valores de DF y la señal quimioluminiscente. El permanganato potásico es el oxidante más adecuado para la determinación de fenoles y polifenoles y en la mayoría de los casos para una concentración de 1.0×10^{-3} ó $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Finalmente, de los 35 fenoles y polifenoles ensayados, se seleccionaron únicamente aquellos que tenían actividad farmacológica y que estuvieran presentes en formulaciones farmacéuticas como la hidroquinona, el resorcinol, el eugenol, la quercetina, el floroglucinol, el ácido tánico y el fenol por su interés medioambiental. Tras una revisión bibliográfica sobre los distintos métodos existentes en la literatura para su determinación con detección quimioluminiscente, se escogió *el fenol, el ácido tánico y la hidroquinona* con el propósito de desarrollar con cada uno de ellos un nuevo método de análisis por quimioluminiscencia directa.

Capítulo quinto

DETERMINACIÓN DE FENOL CON
PRECONCENTRACIÓN
POR QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA

INTRODUCCIÓN

5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL FENOL

5.1.1. Descripción y propiedades físicas

El fenol es un hidroxiderivado del benceno que se utiliza para la fabricación de resinas sintéticas, colorantes, medicamentos (como antisépticos y anestésicos locales), plaguicidas, curtientes sintéticos, sustancias aromáticas, aceites lubricantes, plásticos, reactivos químicos y antioxidantes. Es un compuesto orgánico de fórmula empírica C_6H_6O y peso molecular $94.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Su estructura molecular es la que se muestra en la Figura 5.1.

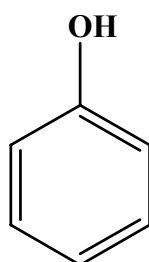


Figura 5.1: Estructura molecular del fenol.

El nombre de la I.U.P.A.C. del fenol es el 1-hidroxibenceno; y otros nombres asignados a este compuesto son: ácido fénico, ácido carbólico, hidroxibenceno, monohidroxibenceno, hidróxido de fenilo y oxibenceno³⁰⁵.

Es un sólido cristalino incoloro o blanco rosado, de olor dulzón y sabor amargo, que funde a 40.85°C , con tendencia a adquirir una coloración rojiza en presencia de luz y aire que se acelera en medios alcalinos. Es soluble en agua (1 g en 15 ml), en benceno (1 g en 12 ml) y muy soluble en alcohol, cloroformo, éter,

glicerol, en disoluciones acuosas de hidróxidos alcalinos y es prácticamente insoluble en éter de petróleo.

El fenol presenta una absorbancia³⁰⁴ máxima en el UV a una longitud de onda de 272 nm cuando se encuentra disuelto en metanol y a 287 nm para disoluciones de fenol NaOH 0.1 M en metanol.

El fenol se presenta en la naturaleza en la madera y agujas de pino, en la orina de los herbívoros (como fenolsulfato) y en el alquitrán de hulla. Los fenoles sintéticos se obtienen a partir de la destilación del alquitrán de hulla (1 tonelada de hulla =0.25 kg de fenol), aunque actualmente predomina la producción sintética por disociación del hidroperóxido de cumeno, obteniéndose acetona como producto secundario y en parte aún se recurre a la síntesis a partir del benceno, utilizando ácido benzenosulfónico o clorobenceno.

5.1.2. Toxicidad del fenol y efecto contaminante en las aguas

El fenol es tóxico para los seres vivos. En los humanos y otros mamíferos los vapores y los líquidos pueden ingresar fácilmente al cuerpo por vía cutánea. Los vapores inhalados ocasionan lesiones en las vías respiratorias y en el pulmón, mientras que el contacto con los líquidos produce severas quemaduras en la piel y en los ojos. Además, una exposición prolongada paraliza el sistema nervioso central, pudiendo provocar la muerte. En las plantas inhibe la permeabilidad pasiva y el crecimiento.

La biodegradación de los fenoles naturales es en general muy buena, de modo que casi no hay acumulación en las plantas o animales, ya que, la acción bacteriana provoca la descomposición del mismo en dióxido de carbono. Sin embargo, los fenoles sintéticos se degradan con menos facilidad, puesto que muchos de ellos son

tóxicos para los microorganismos, permaneciendo por esta razón en el medio ambiente.

Las aguas naturales contienen pequeñas concentraciones de fenol, pero estas cantidades pueden verse incrementadas por la contaminación con aguas residuales industriales y domésticas, así como por la degradación de pesticidas, fungicidas o herbicidas. El fenol, en las aguas cloradas contribuye a la formación de clorofenoles que comunican al agua un sabor y olor extremadamente desagradable incluso para concentraciones bajas, además de transmitir cierta toxicidad, que puede ser más o menos aguda para la vida acuática y los mamíferos dependiendo a la concentración en que se encuentren.

Por esta razón, *la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos* clasifica como contaminantes medioambientales al fenol y sus derivados fenólicos, aumentando su toxicidad a medida que se incrementa el número de átomos de cloro o de nitrógeno incorporados al fenol, siendo el pentaclorofenol el más tóxico de los clorofenoles y el trinitrofenol (ácido pícrico) el más tóxico de los nitrofenoles.

5.1.3. Legislación sobre la calidad de las aguas

Como consecuencia de la toxicidad del fenol y de sus derivados, surge la necesidad de disminuir urgentemente las emisiones de estos compuestos y legislar las cantidades máximas permitidas. Estos niveles dependen del tipo de agua y varían según en el país.

Legislación española

En las *aguas residuales*, se establecen unos límites de vertido cuantitativos que no se podrán sobrepasar. Estos parámetros de vertido dependen de la actividad

de la industria y se encuentran legislados en la Tabla 1, 2, 3 del Título IV del Real Decreto 849/1986 de la “Ley de aguas”³⁰⁶. Los límites están fijados entre 0.5 y 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

En las *aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable*, se fijan unos niveles de calidad clasificados en tres grupos según el tratamiento que vayan a recibir para su potabilización. Estos parámetros se establecen en el Real Decreto 927/1988 de la “Ley de aguas”³⁰⁷ (anexo 1).

- Tratamiento físico simple y desinfección, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.
- Tratamiento físico normal, tratamiento químico y desinfección, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.
- Tratamiento físico-químico intensivos y desinfección, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

En las *aguas dulces superficiales destinadas a ser aptas para el baño*, los parámetros de calidad se establecen en el Real Decreto 927/1988 de la “Ley de aguas”³⁰⁷ (anexo 2). Para los fenoles el valor máximo es de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, siempre y cuando no presenten un olor específico.

En las *aguas de abastecimiento o consumo público*, la concentración máxima admisible se detalla en una normativa específica, que surge como consecuencia de la adhesión de España a la Comunidad Económica Europea, en el que se hace necesario armonizar la legislación española a las disposiciones comunitarias, concretamente a la Directiva 80/778/CEE, relativa a la calidad de las aguas de consumo humano. El Real Decreto 1138/1990³⁰⁸ aprueba la “Reglamentación técnico sanitaria” que regula las normativas para el abastecimiento y control de las aguas potables de consumo humano, en la que se define a la fenoles como sustancias no deseables y fija su concentración máxima admisible en 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

5.2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS

5.2.1. Métodos cualitativos

Se han descrito³⁰⁹ tres ensayos colorimétricos que permiten la determinación cualitativa de fenol en aguas.

1) *Método del reactivo de Millon*, donde tras la destilación de la muestra acidificada con ácido sulfúrico y la mezcla a ebullición del destilado con ácido acético y el reactivo de Millon, en presencia de fenol el líquido se colorea del rojo amarillento al rojo oscuro dependiendo de su contenido.

2) *Método de la paranitronilina*, que consiste en mezclar la muestra con una disolución saturada de paranitronilina, ácido clorhídrico y una disolución saturada de nitrito potásico. En presencia de fenol, la disolución transcurridos 10 minutos y después de adicionar unas gotas de potasa, toma un coloración amarillo anaranjada.

3) *Método de la 4-aminoantipirina*, en el que al mezclar la muestra con la 4-aminoantipirina, amoníaco y ferricianuro potásico, la presencia de fenol se verifica por la aparición de una coloración rojiza.

5.2.2. Métodos cuantitativos

1) Método de la 2,6-dibromoquinona cloroimida

Se trata de un método³⁰⁹ colorimétrico que requiere de una etapa de extracción previa de la muestra con éter, para eliminar interferentes como sulfuros y sustancias orgánicas animales o vegetales que alteran el desarrollo de la coloración

final. De forma que en medio alcalino y tras la extracción, el fenol reacciona con el indicador (2,6-dibromoquinona cloroimida) para dar lugar a los indofenoles, que pueden ser detectados espectrofotométricamente a 625 nm. Este método ofrece buenos resultados para concentraciones de fenol comprendidas entre 0.01 y 2 mg·l⁻¹.

2) Método de la 4-aminoantipirina

Es el método normalizado³¹⁰ para la determinación de fenol en aguas. Este método se basa en la oxidación del fenol en medio básico con el K₃Fe(CN)₆ y la posterior condensación con la 4-aminoantipirina para formar una imina coloreada que puede ser detectada espectrofotométricamente. Es necesario también un proceso de destilación previa de la muestra en medio ácido, con el propósito de eliminar las impurezas no volátiles, como las aminas aromáticas e incrementar la selectividad. Una vez destilada la muestra, el método de la 4-aminoantipirina se puede desarrollar de dos formas según la sensibilidad deseada:

- a) Extracción con cloroformo, para el análisis de aguas cuyo contenido en fenol sea inferior a 1 mg·l⁻¹.
- b) Fotometría directa, adaptable a aguas con cantidades de fenol superiores a 1 mg·l⁻¹.

3) Otros métodos

Debido a la inmensa cantidad de métodos analíticos descritos para la determinación de fenol en agua, se efectuó una revisión en la literatura analítica para conocer la frecuencia de utilización de diversos detectores, aplicados a la determinación de fenol en este tipo de muestra. El periodo en el que se ha llevado a cabo la búsqueda comprende desde 1980 hasta octubre de 2002. Ésta se ha realizado sobre el *Analytical Abstracts* efectuando rastreos a partir de las entradas “Phenol and Water” y los distintos detectores. En la Figura 5.2 se muestran los resultados.

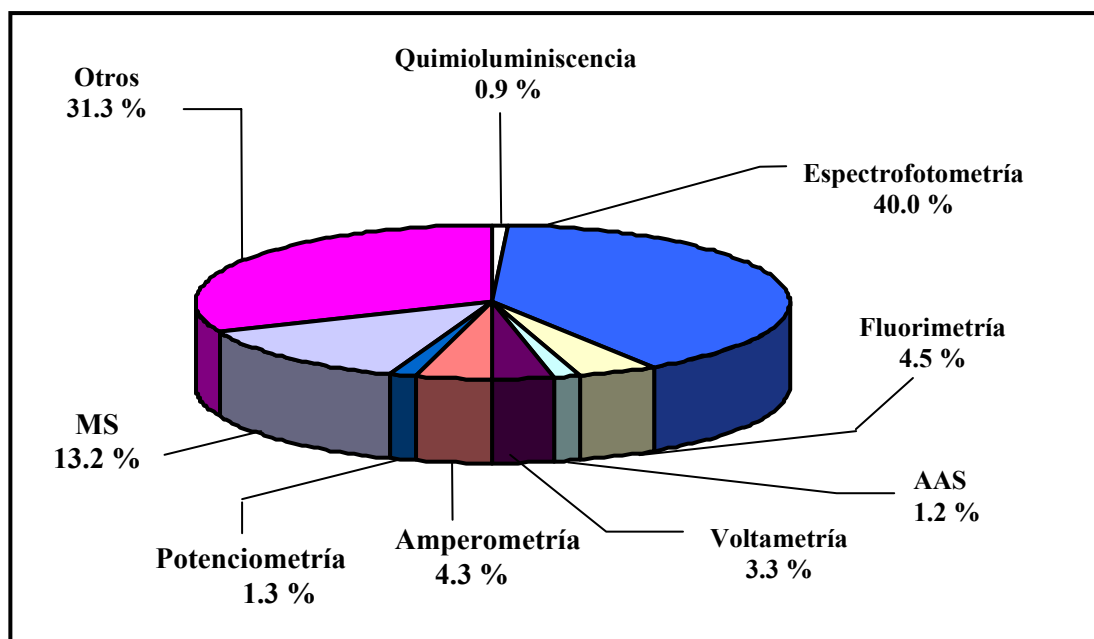


Figura 5.2: Proporción entre los tipos de detectores utilizados para la determinación de fenol en agua.

AAS, Atomic Absorption Spectrometry: Espectrometría de Absorción Atómica.

MS, Mass Spectrometry: Espectrometría de Masas.

5.2.3. Métodos de análisis en flujo con preconcentración

Tras esta revisión bibliográfica se seleccionaron algunos métodos analíticos para la determinación de fenol en aguas que incluyen una etapa de preconcentración en línea acoplada a un sistema de análisis en flujo.

Moskvin y col.³¹¹ han descrito un nuevo método de análisis que permite en un sistema F.I.A. realizar un pretratamiento en línea de la muestra mediante una extracción-separación cromatográfica del analito, para posteriormente, separar la fase orgánica de la acuosa de manera automatizada con una membrana de separación cromatográfica, siendo determinado fluorimétricamente en la fase orgánica la cantidad de analito presente en aguas naturales. El intervalo de linealidad se establece entre 0.5 y 30.0 ppb.

Se ha desarrollado un trabajo para la determinación quimioluminiscente de fenoles en aguas naturales mediante análisis en flujo por multiconmutación⁷⁹. La cantidad de reactivos necesarios son dispensados según el tiempo en el que un conjunto de válvulas solenoide se encuentran en posición OFF/ON controladas a través del “software”. Básicamente se trata de la oxidación de los fenoles con permanganato potásico en medio ácido, en donde se incluye en línea un reactor relleno de una resina polimérica no polar tipo XAD-4 con una gran superficie de contacto, que permite preconcentrar el analito y eliminar interferencias de la matriz, aumentando la sensibilidad y selectividad del método. El límite de detección establecido es de 5.0 ppb.

Según datos bibliográficos el método más utilizado para la determinación de fenoles en aguas es el de la *4-aminoantipirina*, por ser el que mayores ventajas presenta en cuanto a la velocidad de muestreo, precisión y reproducibilidad. Para ello, es necesario que los compuestos fenólicos tengan la posición para desbloqueada, de forma que pueda producirse una reacción de oxidación del analito en medio alcalino y una posterior condensación con la 4-aminoantipirina, para formar una imina coloreada que puede ser detectada espectrofotométricamente. La adaptación del método de la 4-aminoantipirina fue trasladada al análisis por inyección en flujo (F.I.A.) por Möller y Martin³¹² en 1988. Este método ha sido automatizado con éxito y existen diversos trabajos donde el oxidante utilizado para la determinación del fenol, puede ser el ferricianuro potásico o el persulfato potásico.

Erxleben y col.³¹³ incluyen una membrana cromatográfica en la celda de flujo para preconcentrar el fenol y realizar un pretratamiento de la muestra totalmente automatizado mediante una extracción líquido-líquido. Con este propósito la solución acuosa de muestra se inyecta en una corriente de cloroformo durante 4 minutos, para reaccionar posteriormente con la 4-aminoantipirina y con el oxidante $K_2S_2O_8$. Finalmente mediante la formación de un complejo coloreado en la fase orgánica es posible medir espectrofotométricamente a 460 nm la cantidad de fenol

presente en aguas naturales y de consumo. En este caso el límite de detección alcanzado es de 5 ppb.

Li y col.³¹⁴ incorporan una columna de intercambio catiónica a un sistema de análisis por inyección en flujo para la determinación de fenol en agua de lago contaminada. En primer lugar la disolución de muestra a 40 °C y a pH 8 se inyecta en el portador y se transporta al reactor donde se produce una preconcentración en línea de la misma, a continuación el analito eluído con NaCl reacciona con la 4-aminoantipirina y posteriormente con ferricianuro potásico, formando un derivado coloreado que puede ser detectado espectrofotométricamente a 510 nm. El intervalo de linealidad comprende entre 0.01 y 1.4 mg·l⁻¹.

Zheng-Liang⁵⁵ determina la cantidad de fenol en agua mediante un sistema en flujo continuo, que conlleva un proceso de separación en fase sólida con una resina XAD-4 y una extracción líquido-líquido con cloroformo. La muestra a un determinado pH circula continuamente por la columna durante 5 minutos, de forma que el fenol es preconcentrado y se eliminan al mismo tiempo interferentes de la matriz. Tras la elución con KOH, el fenol eluído reacciona con la 4-aminoantipirina y el oxidante K₂S₂O₈, formándose un derivado coloreado que es extraído con cloroformo, con el propósito de incrementar la selectividad del método. Además, antes del detector se incorpora una membrana hidrofóbica para separar ambas fases y determinar espectrofotométricamente la cantidad de fenol en el extracto orgánico. El intervalo de linealidad se establece con este método desde 0.5 a 60.0 ppb.

Esta misma resina XAD-4 ha sido incorporada por Wen-Lu y col.⁵⁶ a un sistema F.I.A. para la separación-preconcentración de fenol en aguas residuales. En este caso se combina exclusivamente el reactor en fase sólida y la reacción de la 4-aminoantipirina para obtener una adecuada sensibilidad, omitiéndose la extracción líquido-líquido, que requiere el uso de disolventes orgánicos altamente contaminantes. Para llevar a cabo este método analítico se necesita una válvula conmutadora, donde se incluyen dos columnas rellenas de XAD-4, de forma que

mientras una columna está en la posición de preconcentración la otra está en elución. Así que, la muestra a pH 2 se preconcentra durante 5 minutos y posteriormente se eluye el analito con la disolución alcalina, para seguidamente reaccionar con la 4-aminoantipirina y el ferricianuro potásico. La cantidad de fenol presente en las aguas residuales se determina espectrofotométricamente a 490 nm. El intervalo de linealidad se establece entre 0.01 a 1 ppm y el límite de detección alcanzado es de 4 ppb.

PARTE EXPERIMENTAL

5.3. ESTUDIO DE LA PRECONCENTRACIÓN-SEPARACIÓN CON DETECCIÓN POR ABSORCIÓN EN EL ULTRAVIOLETA-VISIBLE

El primer paso consistió en estudiar la etapa de preconcentración-separación mediante el empleo de un reactor en fase sólida relleno de Amberlite XAD-4, integrado en el sistema en inyección en flujo. De este modo, en ausencia de reacción química y tras un proceso físico-químico de adsorción, se conseguía separar el fenol del resto de la matriz, eliminando las posibles interferencias (como las aminas aromáticas), al mismo tiempo que el analito era preconcentrado con objeto de incrementar la respuesta analítica.

Para ello, mediante un método ampliamente descrito, se hacía reaccionar el fenol con el ferricianuro potásico y la 4-aminoantipirina (4-AATP). Esta reacción (Figura 5.3) consiste básicamente en la oxidación del analito en medio alcalino y la posterior condensación con la 4-aminoantipirina para formar una imina de color amarillo, que puede ser detectada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 506 nm.

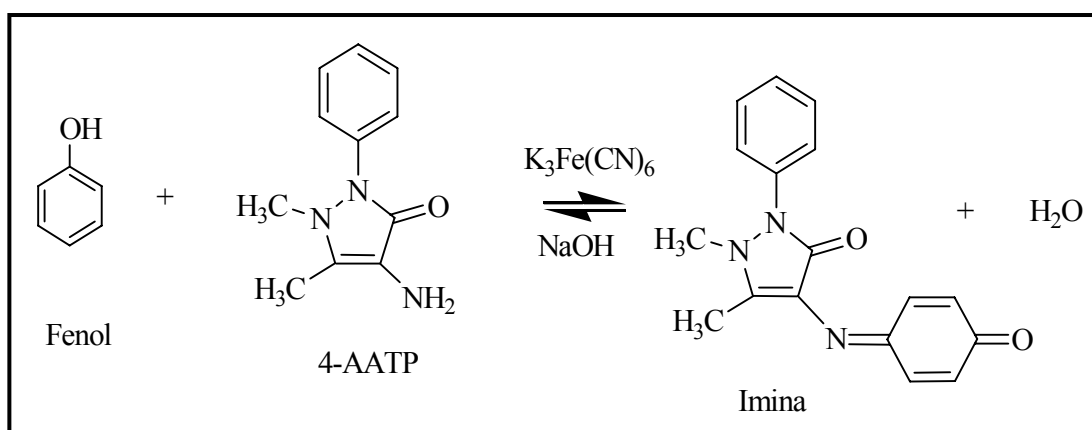


Figura 5.3: Reacción de derivatización para la determinación espectrofotométrica del fenol.

Dicha reacción³¹⁵ es posible gracias a la capacidad de los fenoles para experimentar reacciones de sustitución electrófila aromática, debido a que los electrones del anillo aromático reaccionan con especies deficientes de electrones, como los agentes oxidantes, que como electrófilos son aceptores de electrones y reaccionan fácilmente con los fenoles para formar quinonas tras la oxidación. Para llevar a cabo una determinación selectiva del fenol es de suma importancia eliminar la presencia de las aminas aromáticas, ya que también pueden reaccionar con especies oxidantes, para formar quinonas tras su oxidación. El mecanismo de esta reacción se detalla a continuación en la Figura 5.4.

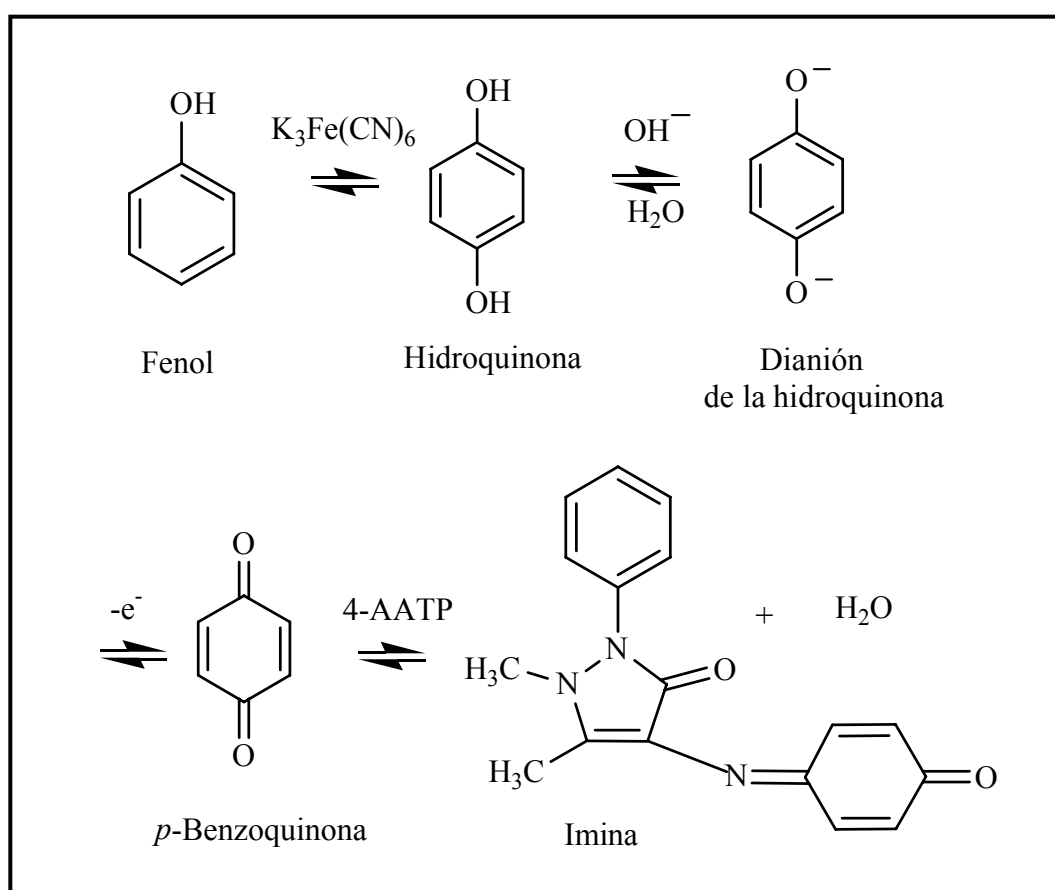


Figura 5.4: Mecanismo de reacción.

A partir del método analítico descrito por Wen-lu Song y col.⁵⁶ se desarrolló un montaje por inyección en flujo que reproducía el citado trabajo.

En la Figura 5.5 y en Tabla 5.1 se encuentra descrito el montaje así como variables químicas y F.I.A. establecidas.

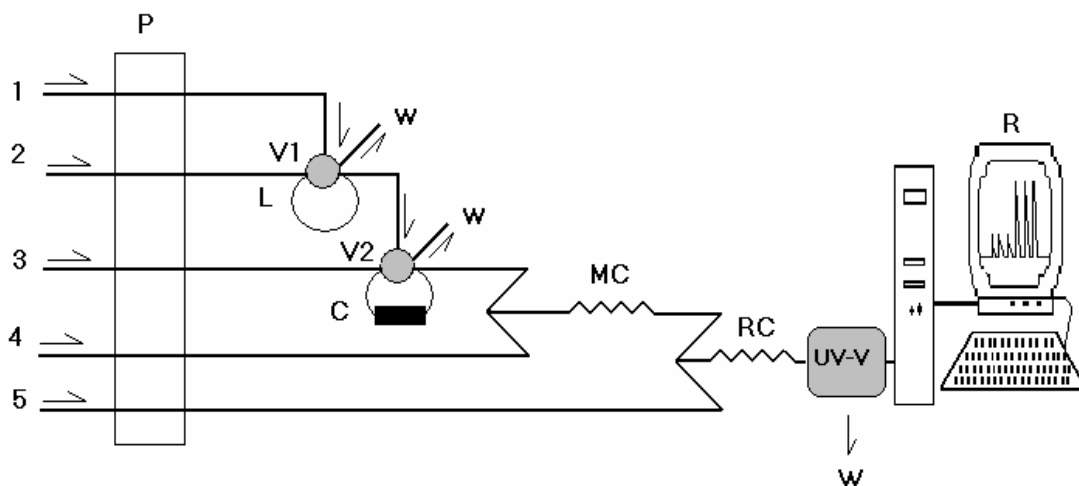


Figura 5.5: Montaje F.I.A. empleado para el estudio de la etapa de preconcentración-separación.

Canal 1: Disolución de fenol en HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ como blanco).

Canal 2: Portador (HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Canal 3: Eluyente (NaOH $0.10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Canal 4: Disolución reactiva.

Canal 5: Oxidante.

P: Bomba peristáltica.

V1, V2: Válvulas de inyección.

L: Bucle de muestra.

C: Reactor de PTFE relleno de resina Amberlite XAD-4.

MC: Tubo de mezcla.

RC: Tubo de reacción.

UV-V: Detector.

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

W: Desecho.

Tipo de variable	Variable	Valor seleccionado
Química (Concentraciones)	Canal 1: Muestra (fenol en HCl 0.01 mol·l ⁻¹)	
	Canal 2: HCl (mol·l ⁻¹)	0.01
	Canal 3: NaOH (mol·l ⁻¹)	0.10
	Canal 4: 4-AAATP (ppm) a pH 8.5 (1)	1000
	Canal 5: K ₃ Fe (CN) ₆ (ppm) a pH 11 (2)	2000
F.I.A. (Caudales y longitudes)	Canal 2: ml·min ⁻¹	1.8
	Canal 3: ml·min ⁻¹	1.8
	Canal 4: ml·min ⁻¹	0.3
	Canal 5: ml·min ⁻¹	0.3
	(L) ml muestra	2.1
	(MC) cm	30.0
	(RC) cm	60.0
Reactor en fase sólida (RFS)	Longitud (cm)	10.5
	Diámetro interno (mm)	2.7

(1) Disolución tampón pH= 8.5, preparada disolviendo 10.7 gramos de NH₄Cl, 4.0 gramos de NaOH en 980 ml de agua desionizada ajustando potenciométricamente el pH con HCl o NaOH 1.0 mol·l⁻¹ y aforando hasta 1 litro con agua desionizada.

(2) Disolución oxidante ajustada potenciométricamente a pH 11.0 con NaOH 1.0 mol·l⁻¹.

Tabla 5.1: Composición del sistema F.I.A. para el estudio de la preconcentración.

Este montaje se caracterizaba por tener dos válvulas de inyección; con la primera válvula se insertaba un volumen fijo de muestra mediante un bucle de 4.0 metros, mientras que el bucle de muestra de la segunda válvula incorporaba el reactor en fase sólida.

Para operar con este sistema y poder realizar un ciclo de preconcentración eran necesarias 3 etapas, que debían ser seguidas consecutivamente, para obtener un pico F.I.A.:

- Acondicionamiento de la columna en medio ácido para reconstituir y mantener las características óptimas de adsorción y desorción del reactor.
- Preconcentración-separación del fenol de la matriz en medio ácido.
- Elución en medio básico para desorber el analito retenido en la columna y poder confluir posteriormente con la disolución de 4-aminoantipirina.

Los tiempos necesarios descritos en la Tabla 5.2 para cada una de estas etapas, eran controlados según la posición de las dos válvulas. El funcionamiento de las válvulas para realizar un ciclo de preconcentración fue el siguiente :

Acondicionamiento de la columna

- Válvula 1: en posición de carga para que el bucle se llenara de muestra.
- Válvula 2: en posición de carga para que el HCl circulara a través del reactor, acondicionando la columna.

Preconcentración-separación

- Válvula 1: en posición de inyección para que la muestra fuera insertada en la columna.
- Válvula 2: se mantenía en posición de carga para que el analito quedara retenido en la columna.

Elución

- Válvula 1: continuaba en posición de inyección.
- Válvula 2: conmutaba hacia la posición de inyección para que todo el fenol fuera eluído.

Etapas	Posiciones Válvulas	Tiempo (minutos)
Acondicionamiento de la columna	V1-L y V2-L	5
Preconcentración-separación	V1-I y V2-L	5
Elución	V1-I y V2-I	1*

*tiempo necesario para obtener un pico F.I.A. y restablecer la línea base.

V1: Válvula 1; V2:Válvula 2; L: Posición carga; I: Posición inyección.

Tabla 5.2: Tiempos necesarios para la etapa de separación-preconcentración.

Este sistema permitía realizar de manera automatizada un pretratamiento de la muestra en línea, eliminando las aminas aromáticas (principal interferente para la determinación del fenol³¹⁵), ya que en medio ácido se ionizaban y no eran adsorbidas en la resina, mientras que el fenol se retenía. De esta manera, quedaba excluida la destilación previa necesaria para la determinación de fenol en aguas, como se describe en el método oficial de análisis³¹⁰.

5.3.1. Precalibrado

Con el montaje F.I.A. descrito en la Figura 5.5 y con las variables químicas y F.I.A. establecidas en la Tabla 5.1, así como los tiempos necesarios para la etapa de preconcentración–separación, se decidió realizar un precalibrado de fenol entre 1.0 y 20.0 ppm, con el fin de seleccionar una concentración de trabajo adecuada.

Era condición imprescindible que tanto las disoluciones patrón como la de oxidante y la 4-aminoantipirina fueran preparadas diariamente, al mismo tiempo que las disoluciones reactivas debían mantenerse al abrigo de la luz durante todo el periodo de medida, para evitar la deriva de la línea base como se comprobó experimentalmente.

En la Figura 5.6 aparece representada la gráfica absorbancia-concentración de fenol. A partir de este momento se escogió 5.0 ppm como concentración para el estudio de la etapa de preconcentración–separación.

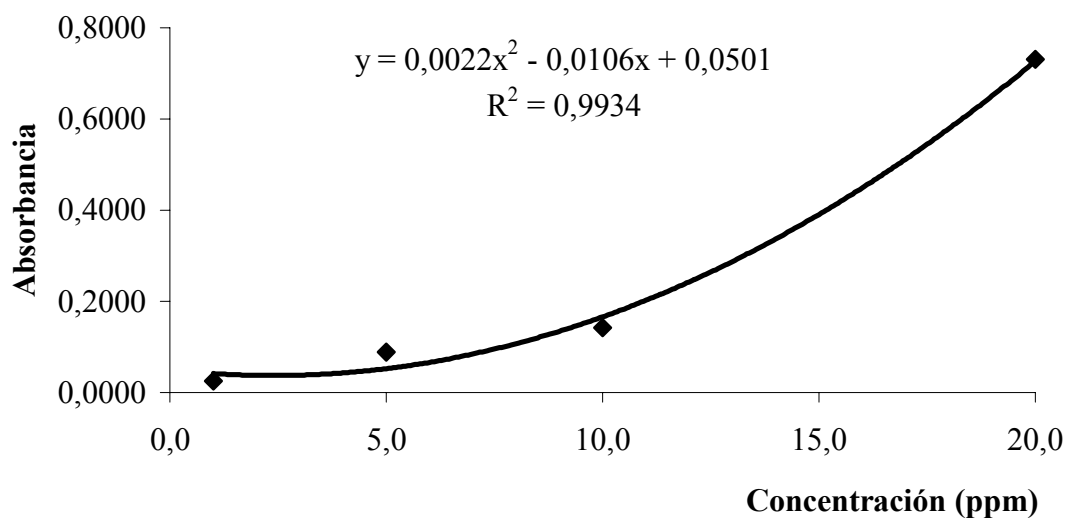


Figura 5.6: Precalibrado de fenol para un intervalo de concentraciones comprendido entre 1.0 y 20.0 ppm.

5.3.2. Optimización de las variables experimentales

A continuación se procedió a optimizar por el método univariante, algunas variables que influían en la etapa de preconcentración-separación. En el siguiente esquema se muestran las variables objeto de estudio del montaje descrito en la Figura 5.5.

- Variables F.I.A.
 - Caudal del HCl
 - Caudal del NaOH
- Variables del reactor en fase sólida
 - Longitud y diámetro interno

5.3.2.1. Influencia del caudal de HCl

El HCl tenía varias funciones: ser el medio de disolución del analito, acondicionar la columna, transportar la muestra hasta el reactor donde tenía lugar la preconcentración-separación y eliminar la interferencia de las aminas aromáticas.

Para la optimización del caudal de HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en el canal 2 de la Figura 5.5, se ensayaron varias velocidades de flujo comprendidas en un intervalo entre 0.8 y $2.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Finalmente se seleccionó aquel caudal que proporcionaba una mayor señal analítica para una concentración de 5.0 ppm de fenol. Cabe destacar que aunque la señal quimioluminiscente se incrementaba a la velocidad de flujo de $2.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, se decidió no estudiar caudales más elevados para evitar problemas de sobrepresión en el sistema.

Según los resultados mostrados en la Figura 5.7, se seleccionó como caudal óptimo para el HCl $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

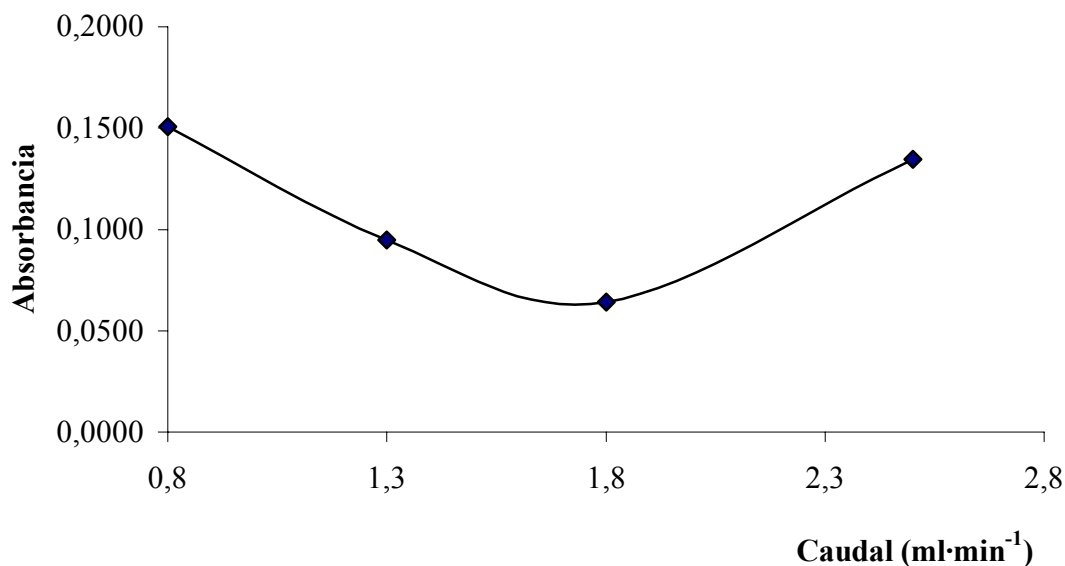


Figura 5.7: Optimización del caudal de HCl.

5.3.2.2. Influencia del caudal de NaOH

A continuación se estudió la influencia del caudal NaOH, que al actuar como eluyente estaba implicado en la desorción del fenol retenido en el reactor y por ello, condicionaba el obtener una mayor o menor señal analítica.

Para optimizar este parámetro, se varió la velocidad de flujo de NaOH $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ del canal 3 correspondiente al montaje descrito en la Figura 5.5, ensayándose 4 caudales distintos comprendidos entre 0.4 y $2.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, sin aumentar más la velocidad de flujo porque aparecían problemas de sobrepresión en el sistema. Los resultados obtenidos en esta experiencia se muestran en la Figura 5.8.

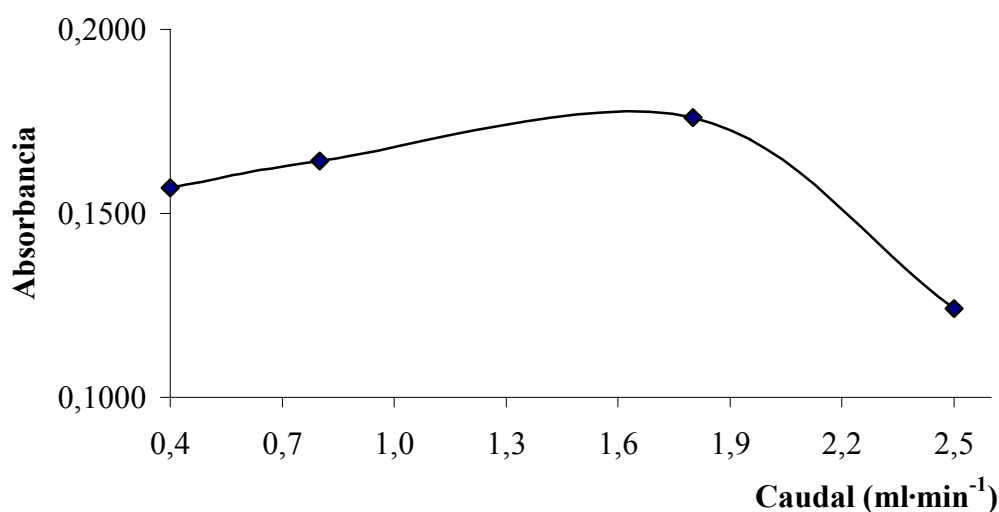


Figura 5.8: Estudio del caudal de NaOH.

Según los resultados de la Figura 5.8, se seleccionó como caudal óptimo $1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, debido a que proporcionaba una mayor señal analítica para 5.0 ppm y permitía que el eluyente circulara libremente por el reactor sin provocar pulsaciones ni variaciones en la velocidad de flujo.

5.3.2.3. Influencia de la longitud y del diámetro interno del reactor

El reactor utilizado, era un tubo de PTFE de 10.5 cm de longitud y 2.7 mm de diámetro interno que se rellenaba aspirando las partículas de resina, que se encontraban en una suspensión ácida con ayuda de una trompa de vacío. Para evitar la pérdida de resina en los extremos del reactor se ponía una pequeña cantidad de lana de vidrio, pero esta se apelmazaba produciendo problemas de sobrepresión en el sistema, por esta razón se decidió reemplazar el reactor de PTFE por una columna cromatográfica de vidrio de la casa Ommifit. Estas columnas constaban de dos conectores, que permitían su fácil incorporación en línea al sistema por inyección en flujo.

Para estudiar la influencia de la longitud y el diámetro interno, se disponía de dos columnas cromatográficas que únicamente diferían en sus dimensiones, una de 5.0 cm de longitud y diámetro interno 2.6 mm y otra de 10.0 cm de longitud y diámetro interno 2.8 mm.

Con objeto de seleccionar la columna más adecuada, se realizó un calibrado con cada una de ellas. Para cada calibrado se ensayaron 4 concentraciones distintas de fenol comprendidas entre 5.0 y 20.0 ppm. En la Tabla 5.3 se muestran los resultados de los calibrados con sendas columnas.

Dimensiones del reactor	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
Longitud 5.0 cm D.I. 2.6 mm	0.0094	0.0017	0.9711
Longitud 10.0 cm D.I. 2.8 mm	0.0139	0.0046	0.9972

D.I. (diámetro interno del reactor).

Tabla 5.3: Estudio de la longitud y el diámetro interno de la columna.

Atendiendo al criterio de sensibilidad se seleccionó la columna de 10.0 cm de longitud y 2.8 mm de diámetro interno, porque el calibrado presentaba una mayor pendiente.

5.3.3. Ensayos en un nuevo montaje F.I.A.

En el montaje F.I.A. descrito anteriormente el volumen de muestra preconcentrado era constante. Si se quería trabajar con una mayor cantidad de muestra la única solución era aumentar el bucle de muestra, siendo necesarias unas dimensiones muy elevadas. Por esta razón, se decidió realizar una modificación del montaje de la Figura 5.5.

En este nuevo montaje (Figura 5.9) el volumen de muestra preconcentrado era controlado por el tiempo de preconcentración y el caudal de paso de la misma a través del reactor. Para cumplir este objetivo la válvula 1 y la válvula 2 estarían conectadas, de forma que la primera válvula funcionaba como conmutador para seleccionar entre dos flujos y en el bucle de muestra de la segunda válvula se incorporaba el reactor en fase sólida.

Para operar con este nuevo sistema y poder realizar un ciclo de preconcentración era necesario incorporar una nueva etapa de *lavado* con HCl, para eliminar residuos de muestra no retenidos convenientemente en la columna. Las 4 etapas necesarias para un ciclo debían ser seguidas consecutivamente para obtener un pico F.I.A. y al igual que ocurría en el montaje anterior los tiempos de cada etapa eran controlados según la posición en que se encontraban las dos válvulas. Los tiempos necesarios fijados para estas etapas se describen en la Tabla 5.4.

Etapas	Posiciones Válvulas	Tiempo (minutos)
Acondicionamiento	V1-I y V2-L	5
Preconcentración	V1-L y V2-L	5
Lavado	V1-I y V2- L	2
Elución	V1-I y V2-I	1*

*tiempo necesario para obtener un pico F.I.A. y restablecer la línea base.

V1: Válvula 1; V2:Válvula 2; L : Posición carga; I: Posición inyección.

Tabla 5.4: Tiempos necesarios para la separación-preconcentración.

A continuación, se detalla el funcionamiento de cada una de las válvulas en el nuevo montaje que condicionaban cada una de las etapas del ciclo.

Acondicionamiento de la columna

- Válvula 1: en posición de inyección para que el HCl circulara a través del reactor, acondicionando la columna.
- Válvula 2: en posición de carga para que el HCl fluyera por el reactor.

Preconcentración-separación

- Válvula 1: en posición de carga para que la muestra fluyera a través del reactor.
- Válvula 2: se mantenía en posición de carga para que el analito quedara retenido en la columna.

Lavado

- Válvula 1: conmutaba a la posición de inyección para que el HCl circulara nuevamente por la columna eliminando interferencias.
- Válvula 2: continuaba en posición de carga para permitir la circulación del HCl por el reactor.

Elución

- Válvula 1: se mantenía en posición de inyección.
- Válvula 2: cambiaba a la posición de inyección para que todo el fenol adsorbido fuera eluído y confluyera posteriormente con la disolución de 4-aminoantipirina.

En la Figura 5.9 y en Tabla 5.5 se encuentra descrito el nuevo montaje así como variables químicas y F.I.A. establecidas.

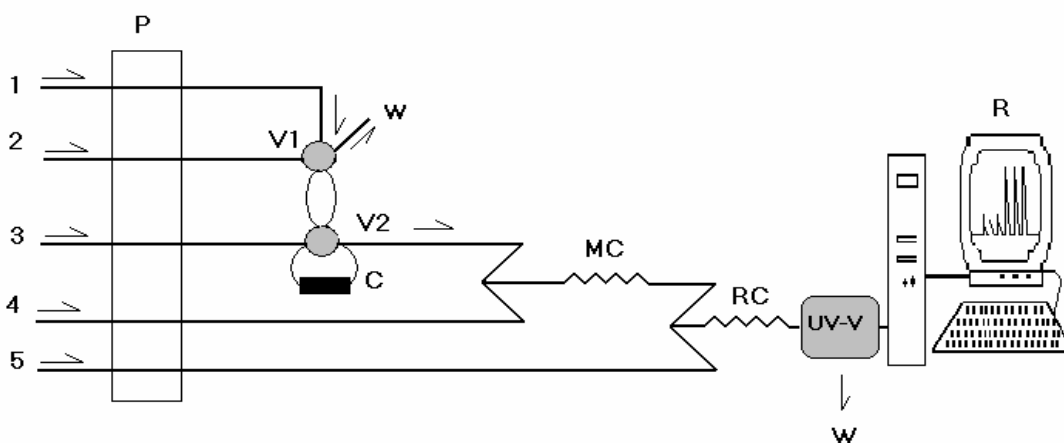


Figura 5.9: Nuevo montaje F.I.A. empleado para el estudio de la etapa de preconcentración-separación.

Canal 1: Disolución de fenol en HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ como blanco).

Canal 2: HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Canal 3: Eluyente (NaOH $0.10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Canal 4: Disolución reactiva.

Canal 5: Oxidante.

P: Bomba peristáltica.

V1, V2: Válvulas de inyección.

C: Reactor (columna cromatográfica) rellena de resina Amberlite XAD-4.

MC: Tubo de mezcla.

RC: Tubo de reacción.

UV-V: Detector.

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

W: Desecho.

Tipo de variable	Variable	Valor seleccionado
Química (Concentración)	Canal 1: Muestra (fenol en HCl 0.01 mol·l ⁻¹)	
	Canal 2: HCl (mol·l ⁻¹)	0.01
	Canal 3: NaOH (mol·l ⁻¹)	0.10
	Canal 4: 4-AAATP (ppm) en tampón pH 8.5	1000
	Canal 5: K ₃ Fe (CN) ₆ (ppm) a pH 11	2000
F.I.A. (Caudales y longitudes)	Canal 1: Muestra (1)	1.8
	Canal 2: ml·min ⁻¹	0.8
	Canal 3: ml·min ⁻¹	1.8
	Canal 4: ml·min ⁻¹	0.3
	Canal 5: ml·min ⁻¹	0.3
	(MC) cm	30.0
	(RC) cm	60.0
Reactor en fase sólida (RFS)	Longitud (cm)	10.0
	Diámetro interno (mm)	2.8

(1) En este nuevo montaje el caudal de muestra influía en la preconcentración. En principio se fijó en 1.8 ml·min⁻¹, pendiente de la posterior optimización.

Tabla 5.5: Composición del nuevo sistema F.I.A para el estudio de la preconcentración.

Con este montaje F.I.A. se realizaron una serie de experiencias con el objeto de estudiar otras variables que podían condicionar la etapa de preconcentración-separación, siendo optimizadas por el *método univariante*.

5.3.3.1. Influencia del tiempo de preconcentración

Teniendo en cuenta la nueva disposición del montaje F.I.A. descrito en la Figura 5.9, el tiempo en el que la muestra se encontraba en el reactor condicionaba que una mayor o menor cantidad de analito quedara retenido en la columna, por esta razón se decidió estudiar la influencia de esta variable en la señal analítica.

Para ello, en primer lugar se fijó el caudal de muestra en $1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y se ensayaron 7 tiempos distintos de preconcentración comprendidos entre 1 y 10 minutos. Los valores obtenidos en esta experiencia quedan detallados en la Figura 5.10.

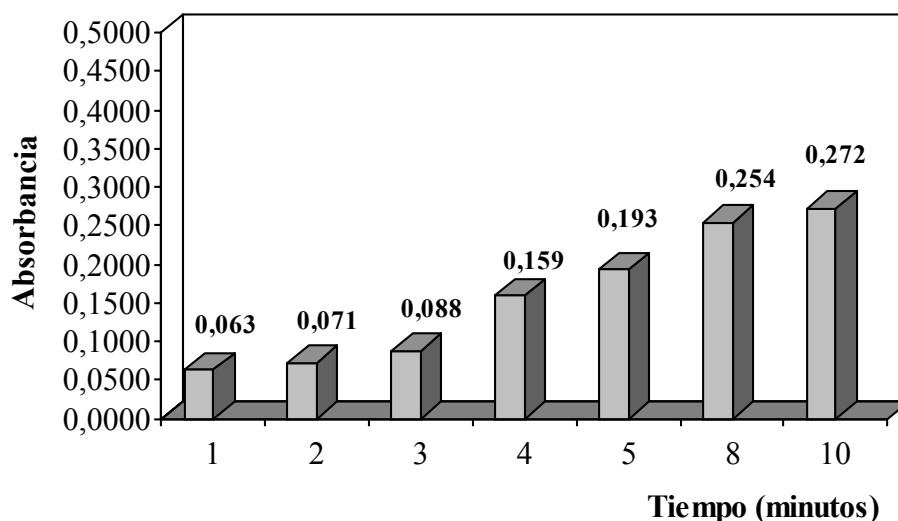


Figura 5.10: Estudio del tiempo de preconcentración.

Aunque las señales analíticas obtenidas para una misma concentración de 5.0 ppm de fenol fueran más elevadas con tiempos de preconcentración de ocho y diez minutos, se decidió seleccionar un tiempo de cinco minutos, porque el incremento de la señal no compensaba el largo periodo de tiempo requerido para realizar un único ciclo de preconcentración.

5.3.3.2. Estudio del caudal de muestra

Posteriormente se procedió a la optimización de la velocidad de flujo de la muestra, que junto con el tiempo de preconcentración eran variables determinantes en la etapa de preconcentración-separación.

Par llevar a cabo esta experiencia se ensayaron 6 velocidades de flujo comprendidas entre 0.6 y 3.0 ml·min⁻¹, de forma que la muestra circulaba continuamente por el reactor durante el tiempo necesario para la preconcentración, fijado en 5 minutos, quedando retenido el fenol en la resina.

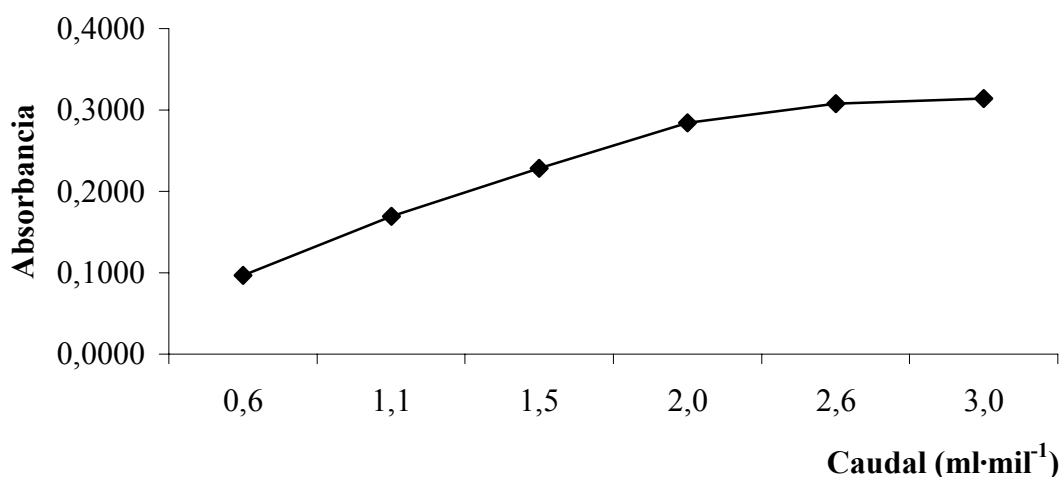


Figura 5.11: Estudio del caudal de muestra.

Según los resultados mostrados en la Figura 5.11 se seleccionó como caudal óptimo 3.0 ml·min⁻¹, ya que para una misma concentración de 5.0 ppm de fenol se obtuvieron señales analíticas más elevadas. Hay que destacar que con la nueva columna no se podía incrementar más la velocidad de flujo porque aparecían problemas de sobrepresión en el sistema.

5.3.3.3. Precalibrado

Con el sistema descrito en la Figura 5.9 y con los parámetros fijados y optimizados hasta el momento, se realizó un precalibrado de fenol desde 0.1 a 3.0 ppm, con el fin de seleccionar una concentración adecuada de trabajo, ya que tras las optimizaciones anteriores la señal inicial se había multiplicado por seis.

Se seleccionó una concentración de 3.0 ppm de fenol para continuar trabajando.

5.3.3.4. Influencia del NaOH como eluyente

Con el propósito de demostrar si el NaOH era capaz de desorber todo el analito retenido en cada ciclo de preconcentración-separación y evitar la contaminación cruzada entre muestras, se pensó en realizar en la misma sesión de medida dos calibrados entre 0.1 y 3.0 ppm de fenol. Uno de menor a mayor concentración seguido de otro de mayor a menor, con la intención de observar si las señales obtenidas para cada concentración en el segundo calibrado se modificaban significativamente respecto a los valores correspondientes al primer calibrado.

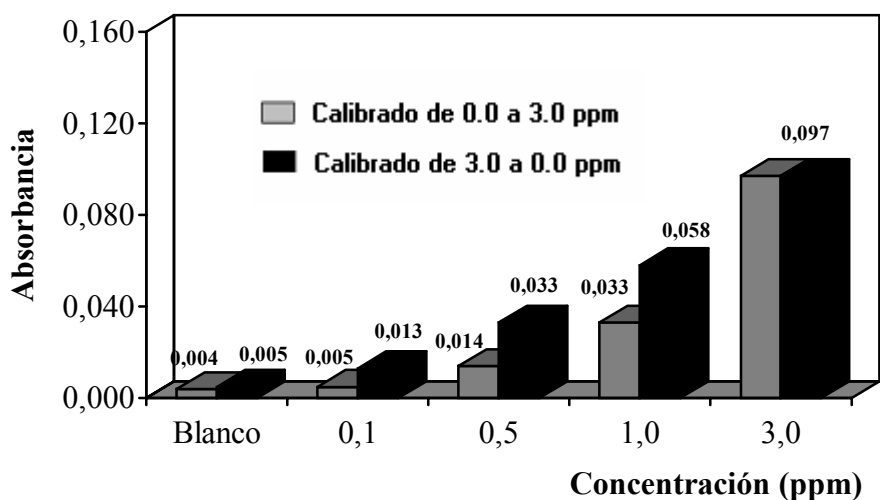


Figura 5.12: Estudio del poder de elución del NaOH.

Como se puede observar la Figura 5.12, las señales obtenidas para cada uno de los puntos del calibrado al efectuarlo en sentido inverso eran mayores que las resultantes del calibrado realizado de menor a mayor concentración.

Este aumento de la señal era debido a que el NaOH presentaba una baja afinidad por el fenol y no era capaz de desorber todo el analito retenido en la columna, de forma que a medida que se realizaban inserciones la concentración del fenol presente en el reactor se incrementaba al igual que las absorbancias obtenidas.

5.3.3.5. Estudio de la concentración del eluyente

Para mejorar la eficacia de la elución, se decidió variar la concentración de NaOH, con objeto de encontrar la concentración adecuada de eluyente que permitiera desorber todo el analito retenido en el reactor, eliminando los efectos de la contaminación cruzada y de forma que aunque se aumentaran el número de inserciones las señales obtenidas para una misma concentración de analito fueran reproducibles.

Con el montaje descrito en la Figura 5.9 y manteniendo constantes todas las variables optimizadas hasta el momento, se ensayaron 4 concentraciones de NaOH comprendidas entre 0.1 y 0.8 mol·l⁻¹ y se calculó para cada una de las concentraciones la desviación estándar relativa para la media de una serie de 5 picos F.I.A., obtenidos tanto para el blanco como para un patrón de 3.0 ppm de fenol.

Según los resultados que se muestran en la Tabla 5.6 y atendiendo a criterios de reproducibilidad, la concentración óptima del eluyente era 0.8 mol·l⁻¹, pero sin embargo las señales analíticas del blanco era mayores que las del propio patrón, por esta razón se descartó. Por otro lado, los valores de la desviación estándar relativa presentados para el NaOH 0.2 y 0.4 mol·l⁻¹ eran muy próximos. Finalmente se decidió escoger como concentración de eluyente 0.2 mol·l⁻¹, por presentar una mejor

reproducibilidad para una serie de picos que el NaOH $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, aunque las señales analíticas fueran mayores para esta concentración de eluyente.

NaOH ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	C (ppm)	Absorbancia	dsr(%)
0.1	Blanco	0.0134	145.7
	3.0	0.2167	27.4
0.2	Blanco	0.0178	10.2
	3.0	0.0982	12.7
0.4	Blanco	0.0693	12.4
	3.0	0.0834	11.0
0.8	Blanco	0.1056	11.5
	3.0	0.0776	4.7

Tabla 5.6: Estudio de la concentración de NaOH.

5.3.3.6. Estudio del tiempo de elución

Una vez optimizada la concentración del eluyente, se decidió estudiar el tiempo necesario para que el NaOH $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ eluyera todo el analito retenido en el reactor, para que posteriormente reaccionara con el ferricianuro potásico y la 4-aminoantipirina y se formara el derivado coloreado, que era detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 506 nm.

Para realizar esta experiencia, se mantuvieron constantes todas las variables optimizadas y se ensayaron 4 tiempos de elución comprendidos entre 1 y 6 minutos.

Al igual que en el estudio de la concentración de eluyente, se calculó para cada uno de los tiempos la desviación estándar relativa para la media de una serie de 5 picos F.I.A., obtenidos tanto para el blanco como para un patrón de 3.0 ppm de fenol.

Teniendo en cuenta los resultados representados en la Tabla 5.7 y aunque la reproducibilidad entre las muestras del patrón de 3.0 ppm era mejor para 4 y 6 minutos, se seleccionó como óptimo un tiempo de elución de 2 minutos, ya que las señales analíticas obtenidas para los tres tiempos eran del mismo orden y de esta forma se reducía el tiempo necesario para realizar un ciclo de preconcentración.

Tiempo (Minutos)	C (ppm)	Absorbancia media	dsr(%)
1	Blanco	0.0164	24.3
	3.0	0.0982	12.7
2	Blanco	0.0258	7.5
	3.0	0.1041	7.5
4	Blanco	0.0230	10.3
	3.0	0.1058	3.6
6	Blanco	0.0220	11.3
	3.0	0.1050	3.5

Tabla 5.7: Estudio del tiempo de elución.

5.3.4. Sistema F.I.A. optimizado para la preconcentración–separación por absorción en el UV-visible

De acuerdo con todos los resultados expuestos hasta el momento, la configuración definitiva del sistema F.I.A. para la determinación de fenol por absorción en el ultravioleta-visible, fue la que se muestra en la Figura 5.13, resumiéndose en la Tabla 5.8 las etapas y los tiempos necesarios para realizar un ciclo de preconcentración-separación.

Etapas	Posiciones Válvulas	Tiempo (minutos)
Acondicionamiento	V1-I y V2-L	5
Preconcentración	V1-L y V2-L	5
Lavado	V1-I y V2- L	2
Elución	V1-I y V2-I	2

Tabla 5.8: Tiempos necesarios para la separación-preconcentración.

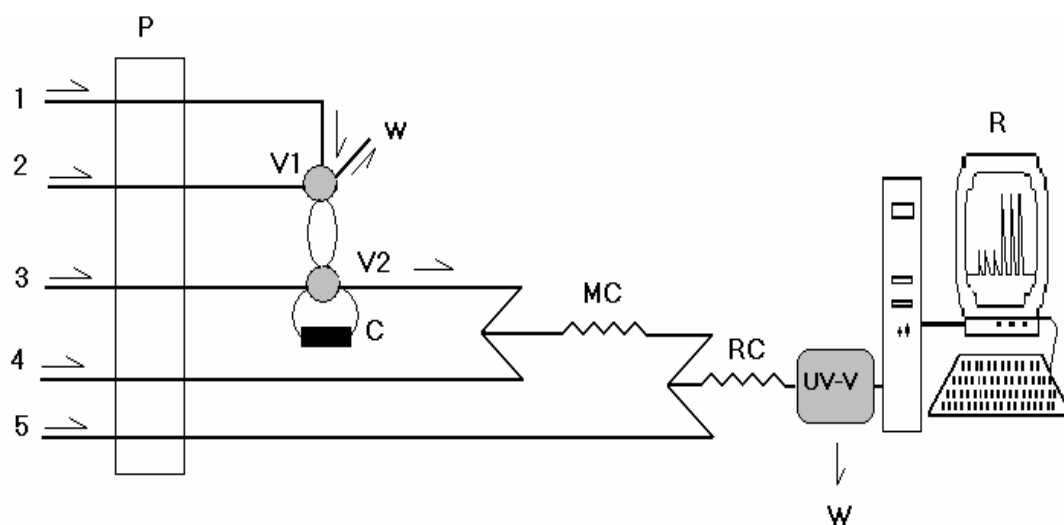


Figura 5.13: Sistema F.I.A. optimizado para la preconcentración-separación de fenol.

Canal 1: Disolución de fenol en HCl 0.01 ($3.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 2: HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 3: Eluyente NaOH $0.20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 4: 4-AATP 1000 ppm en tampón pH 8.5 ($0.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 5: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2000 ppm a pH 11 ($0.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

P: Bomba peristáltica.

V1: Válvula de inyección.

V2: Válvula de inyección.

C: Reactor (10.0 cm de longitud y 2.8 mm de diámetro interno) relleno de resina Amberlite XAD-4.

MC: Tubo de mezcla (30.0 cm de longitud).

RC: Tubo de reacción (60.0 cm de longitud).

UV-V: Detector.

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

W: Desecho.

5.4. ESTUDIO DE LA REACCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

5.4.1 Ensayos previos en flujo continuo

Dado que la intensidad de la señal quimioluminiscente depende del tiempo transcurrido desde el inicio de la reacción⁸², se consideró conveniente que los ensayos previos se realizaran midiendo a tiempo fijo y según la relación de los caudales, en el sistema en flujo continuo representado en la Figura 5.14.

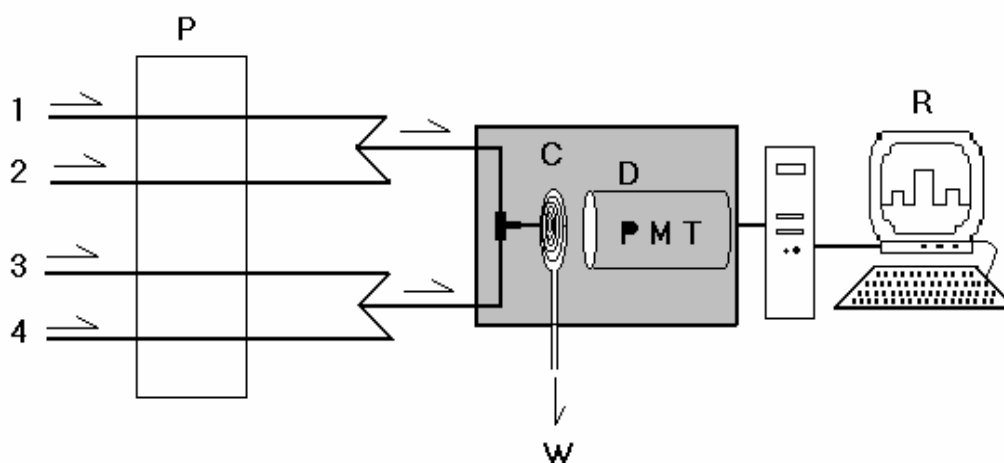


Figura 5.14: Montaje en flujo continuo para los ensayos previos.

Canal 1: Disolución acuosa de fenol (blanco, agua desionizada); **Canal 2 y 3:** Disolución para ajustar el medio de reacción; **Canal 4:** Oxidante; **P:** Bomba peristáltica; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho ; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de datos.

Hay que destacar que en todas las experiencias desarrolladas, la señal analítica expresada en μA se calculó por diferencia entre la que presentaba la muestra y la generada por el blanco (agua desionizada por el canal 1).

5.4.1.1. Estudio del sistema oxidante

Como se describió en el apartado 4.4 del capítulo cuarto (conectividad molecular aplicada a la predicción de quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles), el fenol era quimioluminiscente al reaccionar con KMnO_4 en medio ácido, incrementándose la respuesta a una concentración de $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Con el propósito de corroborar y completar los estudios efectuados sobre el sistema oxidante, se decidió estudiar además del permanganato potásico otros oxidantes fuertes a esta misma concentración.

En medio ácido sulfúrico se ensayaron los siguientes oxidantes: Ce(IV) , KMnO_4 , NaIO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, mientras que en medio hidróxido sódico se probaron $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$, H_2O_2 0.6%, H_2O_2 0.6% + NaClO 0.2% y en medio tanto ácido como básico se testearon N-Bromosuccinimida y NaClO . Para poder estudiar la influencia de la mezcla H_2O_2 + NaClO , fue necesario modificar el montaje descrito en la Figura 5.14, de forma que por el canal 1 circulaba la disolución acuosa de analito, por el canal 2 el oxidante, por el canal 3 y 4 las disoluciones de hipoclorito sódico y agua oxigenada.

Este ensayo se llevó a cabo con tres velocidades de flujo distintas, para observar al mismo tiempo la influencia de la variación de la señal con el caudal. Los caudales estudiados fueron 1.1, 2.3 y $3.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, manteniendo siempre todos los canales a la misma velocidad de flujo.

Las concentraciones de las disoluciones acuosas empleadas para los ensayos fueron de 5.0 ppm para el fenol, $1.0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ tanto para el medio ácido o básico y $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ para los oxidantes, excepto para el NaClO y H_2O_2 . Se consideró no quimioluminiscente el fenol en aquellas condiciones donde la señal analítica menos el blanco era menor que dos veces el valor medio del ruido de fondo.

En la Tabla 5.9 puede apreciarse que únicamente el *permanganato potásico* en medio ácido sulfúrico producía una señal quimioluminiscente apreciable, por ello se seleccionó como oxidante del sistema analítico y a un caudal de $1.1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para todos los canales del montaje, debido a que las señales analíticas alcanzadas a esta velocidad de flujo eran ligeramente superiores.

Oxidante	Medio ($1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Señal (μA)		
		$1.1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$2.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$	$3.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Ce(IV) * $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	H ₂ SO ₄	0.0001	0.0000	0.0000
KMnO₄ $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	H₂SO₄	0.0397	0.0344	0.0260
NaIO ₄ $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	H ₂ SO ₄	0.0000	0.0000	0.0000
K ₂ S ₂ O ₈ $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	H ₂ SO ₄	0.0001	0.0001	0.0002
N-Bromosuccinimida $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	H ₂ SO ₄ /NaOH	0.0000/0.0001	0.0000/0.0001	0.0001/0.0000
NaClO 0.2 %	H ₂ SO ₄ /NaOH	0.0000/0.0001	0.0000/0.0001	0.0000/0.0002
K ₃ Fe(CN) ₆ $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	NaOH	0.0000	0.0000	0.0000
H ₂ O ₂ 0.6%	NaOH	0.0000	0.0000	0.0000
H ₂ O ₂ 0.6% + NaClO 0.2 %	NaOH	0.0001	0.0000	0.0000

*Ce(NH₄)₂(NO₃)₆

Tabla 5.9: Estudio de diferentes sistemas oxidantes.

5.4.1.2. Influencia del caudal

A continuación se decidió realizar un estudio más amplio sobre la influencia del caudal, parámetro que condiciona la concentración final del analito y que suele ser crítico debido a su influencia sobre el punto del sistema en flujo en el cual la molécula excitada emite luz, y consecuentemente en la magnitud de la señal analítica; con caudales elevados la emisión se puede producir después de la celda de flujo y con caudales bajos la emisión puede tener lugar antes de la celda de flujo. El caudal óptimo es aquel en que toda la luz producida por la reacción química es recogida por el tubo fotomultiplicador.

Para estudiar la influencia de esta variable en la reacción quimioluminiscente, se ensayaron 5 velocidades de flujo comprendidas entre 0.13 y 4.70 ml·min⁻¹ y se decidió variar el caudal de los canales del montaje en flujo continuo de dos en dos y finalmente los cuatro canales simultáneamente.

Por tanto, para llevar a cabo esta experiencia fueron necesarios tres estudios independientes:

1. Estudio del caudal del medio y oxidante (Canales 3-4).
2. Estudio del caudal del analito y medio (Canales 1-2).
3. Estudio del caudal del analito, oxidante y medio (Canales 1-2-3-4).

1- Estudio del caudal del medio y oxidante (Canales 3-4)

En primer lugar, se fijó una velocidad de flujo de 2.3 ml·min⁻¹ (situada en la zona intermedia del intervalo de caudales a estudiar) para el analito y el medio (canales 1-2) que se mantenía constante durante todo el ensayo, mientras que se variaba el caudal del medio y del oxidante (canales 3-4).

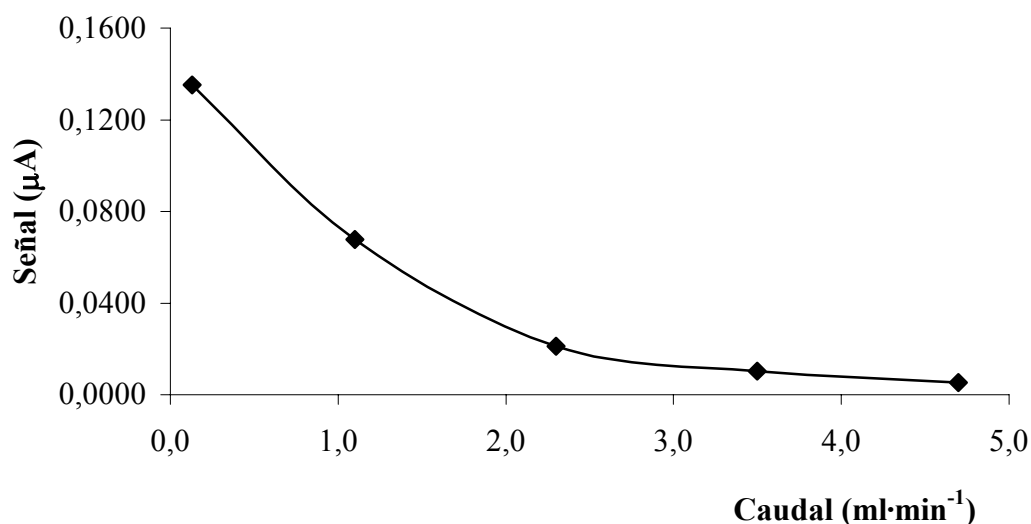


Figura 5.15: Estudio del caudal del medio y del oxidante.

Como se observa en la Figura 5.15, las señales analíticas obtenidas para 5.0 ppm de fenol aumentaban al disminuir la velocidad de flujo, por ello se seleccionó un caudal de $0.13 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para el oxidante y el medio (canales 3-4).

2- Estudio del caudal del analito y medio (Canales 1-2)

En este ensayo, se varió el caudal en los canales 1-2 (analito-medio) y se mantuvo constante el caudal del oxidante y medio al valor optimizado en el apartado anterior ($0.13 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Los resultados para las cinco velocidades de flujo estudiadas entre 0.13 y $4.7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ se muestran en la Figura 5.16.

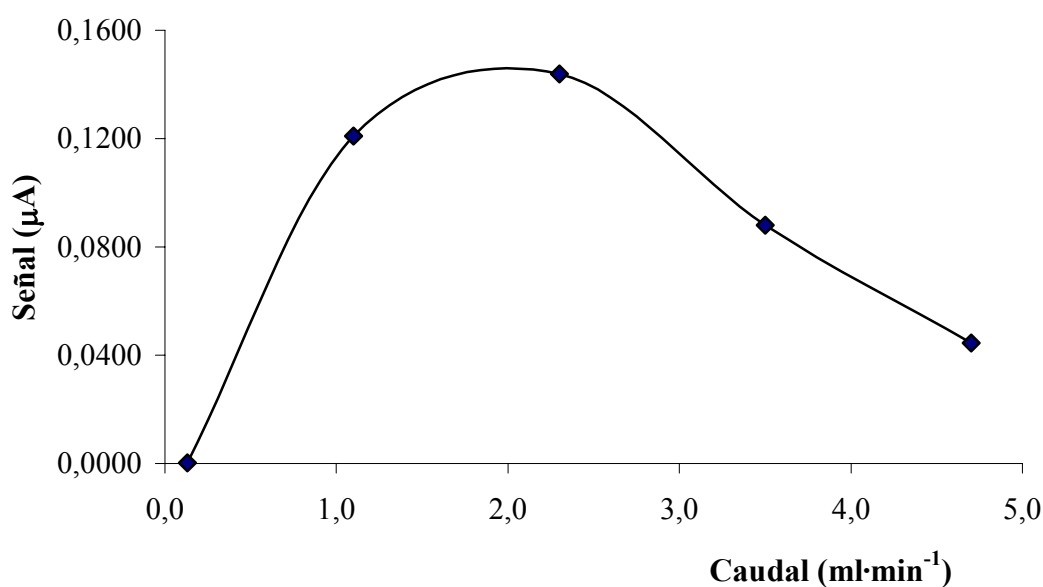


Figura 5.16: Estudio del caudal del analito y del medio.

Según los resultados de la Figura 5.16, para una concentración de 5.0 ppm de fenol la mayor señal analítica se obtuvo para un caudal de $2.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

En esta segunda experiencia se seleccionaron como condiciones óptimas: un caudal de $0.13 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para el oxidante y el medio (canales 3-4) y una velocidad de flujo de $2.30 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para el analito y el medio (canales 1-2).

3- Estudio del caudal del analito, oxidante y medio (Canales 1-2-3-4)

Finalmente, al igual que en los dos apartados anteriores se varió simultáneamente el caudal de los cuatro canales del montaje en flujo continuo entre 0.13 y $4.7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La Figura 5.17 muestra los resultados obtenidos, en ella se puede observar que al aumentar la velocidad de flujo la señal analítica disminuía, por tanto se seleccionó un caudal de $1.1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ para todos los canales.

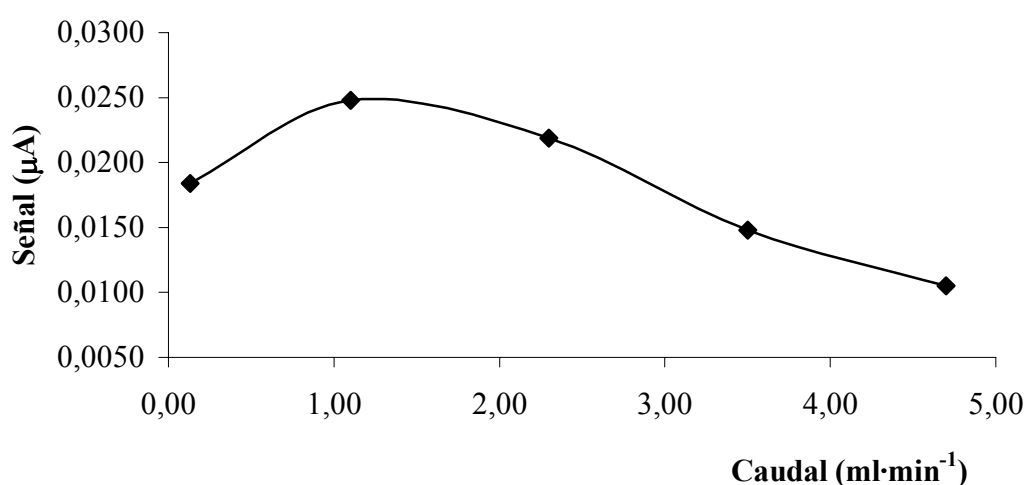


Figura 5.17: Estudio del caudal para el analito, el oxidante y el medio de reacción.

Una vez concluidos estos tres ensayos, se procedió a elegir cuál de las tres condiciones optimizadas proporcionaba una mayor señal analítica para una misma concentración de 5.0 ppm de fenol.

La señal quimioluminiscente más elevada se obtuvo en la segunda experiencia donde las señales analíticas se veían incrementadas en un 6.0% y un 82.7% respecto a las obtenidas en la experiencias primera y tercera respectivamente. Por esta razón, para continuar el estudio de la reacción quimioluminiscente se seleccionaron las condiciones establecidas en el segundo ensayo:

- Caudal de analito y medio (canales 1-2) $2.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Caudal de oxidante y medio (canales 3-4) $0.13 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.4.1.3. Influencia de la naturaleza del medio

Puesto que la señal quimioluminiscente se producía en un medio ácido, se realizó una experiencia para determinar la influencia de distintos medios ácidos en la reacción oxidativa. Con este propósito, se ensayaron los siguientes ácidos: H_2SO_4 , HNO_3 , H_3PO_4 , HClO_4 , todos ellos en concentración $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y circulando por los canales 2 y 3 del montaje en flujo continuo descrito en la Figura 5.14. Este ensayo se realizó empleando una disolución acuosa de fenol de 5.0 ppm y manteniendo constantes todas las variables optimizadas hasta el momento. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 5.18.

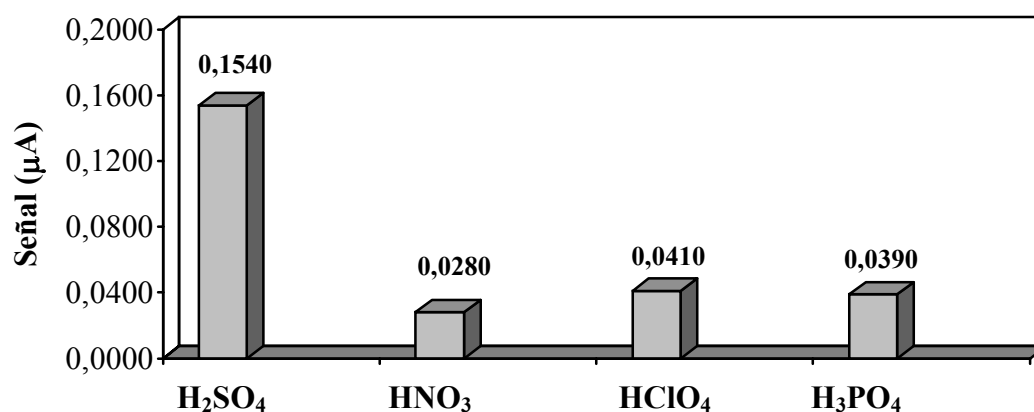


Figura 5.18: Influencia de la naturaleza del medio ácido.

Aunque señal analítica más elevada se obtuvo con H_2SO_4 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, se decidió estudiar la influencia de la concentración de cada uno de los medios en la reacción quimioluminiscente.

Para realizar este estudio se ensayaron 5 concentraciones distintas de cada uno de los medios comprendidas entre 0.5 y $6.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, empleándose una disolución acuosa de 5.0 ppm de fenol. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 5.19.

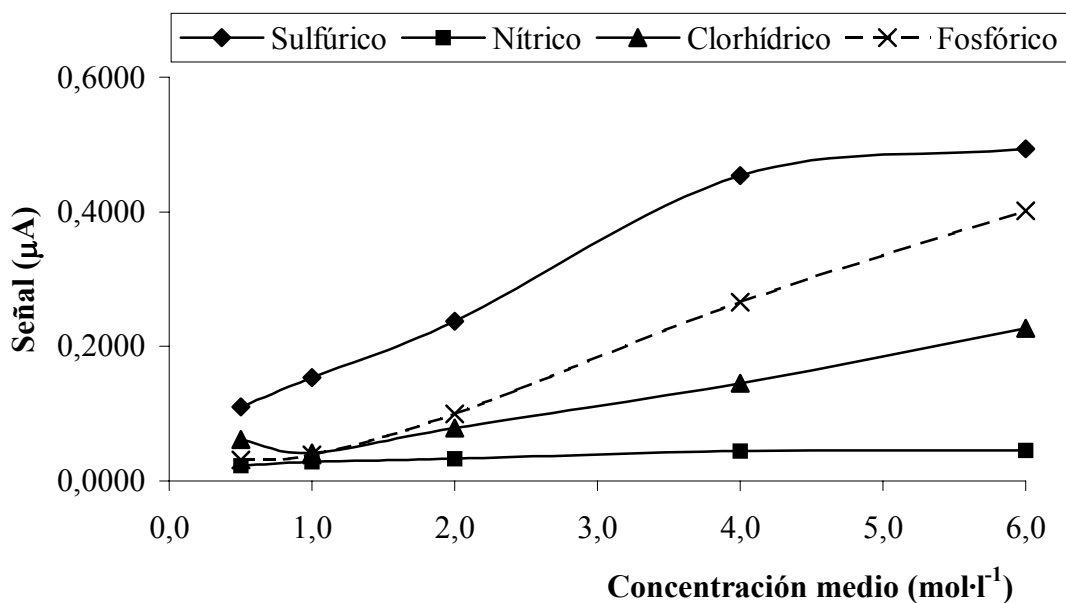


Figura 5.19: Variación de la acidez en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0.5 y 6.0 mol·l⁻¹.

Como se observa en la Figura 5.19, todos los ácidos se comportaban de manera similar, a medida que aumentaba la concentración del medio las señales analíticas se incrementaban; sin embargo para cualquier medio y concentración, las señales que ofrecía el ácido sulfúrico eran mucho mayores.

Por tanto, se seleccionó como medio de reacción para el desarrollo del nuevo sistema analítico el ácido sulfúrico y aunque a mayor concentración la emisión quimioluminiscente era superior, se decidió emplear una disolución de H₂SO₄ 4.0 mol·l⁻¹, para evitar en lo posible el deterioro de los tubos de bomba y trabajar en un medio ácido tan concentrado.

5.4.1.4. Estudio de la concentración de oxidante

El siguiente paso fue estudiar la influencia de la concentración de oxidante en el sistema quimioluminiscente.

Para realizar este ensayo fue necesario elegir el intervalo de concentraciones a estudiar. Para ello se consideraron los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento de los fenoles y polifenoles frente al permanganato potásico en medio ácido (apartado 4.4, capítulo cuarto), así como los mostrados en otros trabajos realizados anteriormente en este laboratorio en los que intervenían reacciones de oxidación quimioluminiscente de características similares^{209,210,222}. Entre todos estos datos se encontró que las concentraciones que proporcionaban mejores resultados fueron las comprendidas entre 1.0×10^{-4} y $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, ensayándose entonces, cinco concentraciones distintas de KMnO_4 situadas en este intervalo. Finalmente se seleccionó una concentración de $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C = 2.3$) para el KMnO_4 .

Los resultados de este estudio obtenidos para 5.0 ppm de fenol se pueden observar en la Figura 5.20.

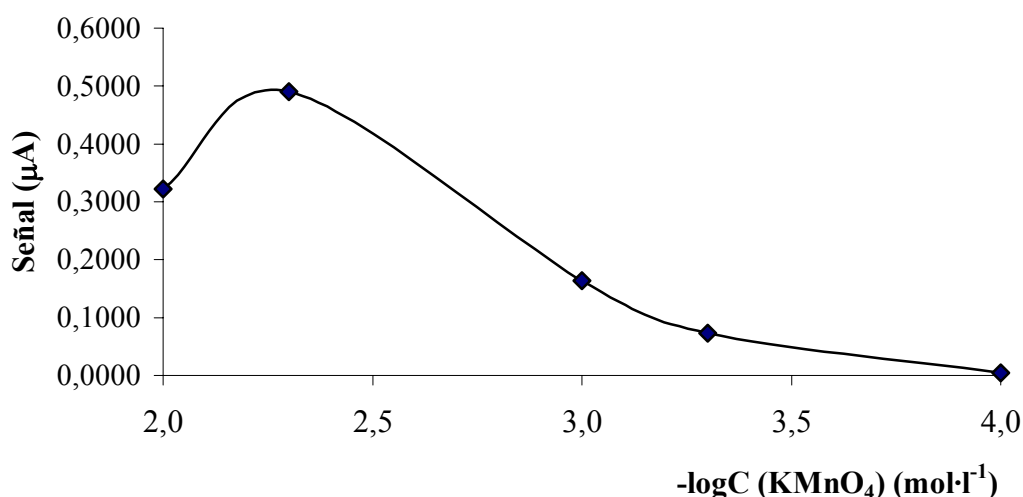


Figura 5.20: Influencia de la concentración de oxidante.

5.4.1.5. Precalibrado

Con el montaje descrito en la Figura 5.14, los caudales establecidos y las variables químicas establecidas (KMnO_4 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y H_2SO_4 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) se realizó un precalibrado de fenol desde 0.01 a 5.00 ppm, con el fin de observar la sensibilidad alcanzada para pequeñas concentraciones de analito.

Según los resultados de la Figura 5.21, resultó ser lineal para el intervalo de concentraciones estudiadas, pero las señales obtenidas para concentraciones inferiores a 0.05 ppm eran prácticamente indistinguibles del blanco. A partir de este momento, se seleccionó 1.0 ppm de fenol como concentración de trabajo.

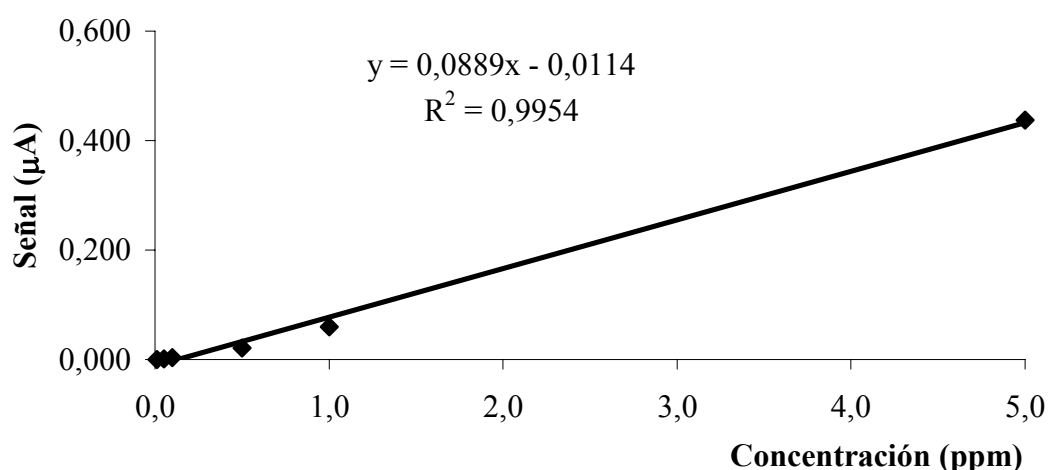


Figura 5.21: Precalibrado de fenol entre 0.01-5.00 ppm.

5.4.1.6. Influencia de la temperatura

Posteriormente se estudió la influencia de la temperatura en la señal analítica. Para realizar esta experiencia se sumergieron 2.0 metros de PTFE en un baño de agua termostataado a la salida de cada una de las confluencias del canal 1-2 y del canal 3-4 correspondientes, al montaje en flujo continuo descrito en la Figura 5.14.

Las temperaturas ensayadas fueron: 24.0°C (ambiente), 40.0°C, 60.0°C y 80.0°C sin aumentar más la temperatura para evitar el posible desprendimiento de burbujas, al estar el sistema a temperaturas próximas a la de ebullición, estudiándose con cada una de estas temperaturas diversas combinaciones:

- Combinación 1: Todos los canales a temperatura ambiente.
- Combinación 2: Canales 1-2 a 24.0°C y 3-4 calientes.
- Combinación 3: Canales 1-2 calientes y canales 3-4 a 24.0°C.
- Combinación 4: Todos los canales calientes.

Temperatura (°C)	Combinación	Señal (µA)
24.0	1	0.0676
	2	0.0767
40.0	3	0.0957
	4	0.0999
60.0	2	0.0785
	3	0.1189
80.0	4	0.1226
	2	0.0886
80.0	3	0.1374
	4	0.1434

Tabla 5.10: Estudio de la influencia de la temperatura.

Como se observa en al Tabla 5.10, las señales analíticas más elevadas para una concentración de 1.0 ppm de fenol se obtuvieron para las combinaciones 3 y 4 a una temperatura de 80.0°C, y aunque la intensidad quimioluminiscente era ligeramente superior al calentar todos los canales, se decidió con el objeto de simplificar el sistema, calentar exclusivamente a 80.0°C los canales 1 y 2, correspondientes al analito y al medio del montaje en flujo continuo de la Figura 5.14 (combinación 3).

5.4.1.7. Influencia de la presencia de sensibilizadores

En numerosas reacciones quimioluminiscentes^{220,222,316,317} descritas en la bibliografía se han utilizado compuestos fluoróforos como sensibilizadores. Estas especies actúan como aceptores de energía y convierte los métodos quimioluminiscentes directos en indirectos, ya que el producto de reacción no es quien emite la luz, si no que transfiere su energía al sensibilizador que al volver a su estado fundamental es el responsable de la emisión final.

Las sustancias sensibilizadoras ensayadas fueron: sulfato de quinina, ácido fórmico, 8-hidroxiquinoleina (oxina), sulfito sódico, naranja de acridina, y rodamina B.

La influencia de la presencia de los sensibilizadores se realizó manteniendo constantes las variables optimizadas hasta el momento y en montaje en flujo continuo descrito en la Figura 5.14, al que se le incorporaron dos metros de tubo de PTFE a la salida de la confluencia del canal 1-2 para calentar el analito y el medio de reacción que confluye con el mismo.

Los sensibilizadores se estudiaron introduciéndolos en el sistema en flujo de tres modos distintos:

- 1) Por el canal 2 disueltos en H_2SO_4 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ que confluye con el analito.
- 2) Por el canal 3 disueltos en H_2SO_4 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ que confluye con el oxidante.
- 3) Por el canal 2 y 3.

El ácido fórmico se probó a una concentración de $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y los restantes compuestos a una concentración $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. En la Figura 5.22 pueden observarse los resultados.

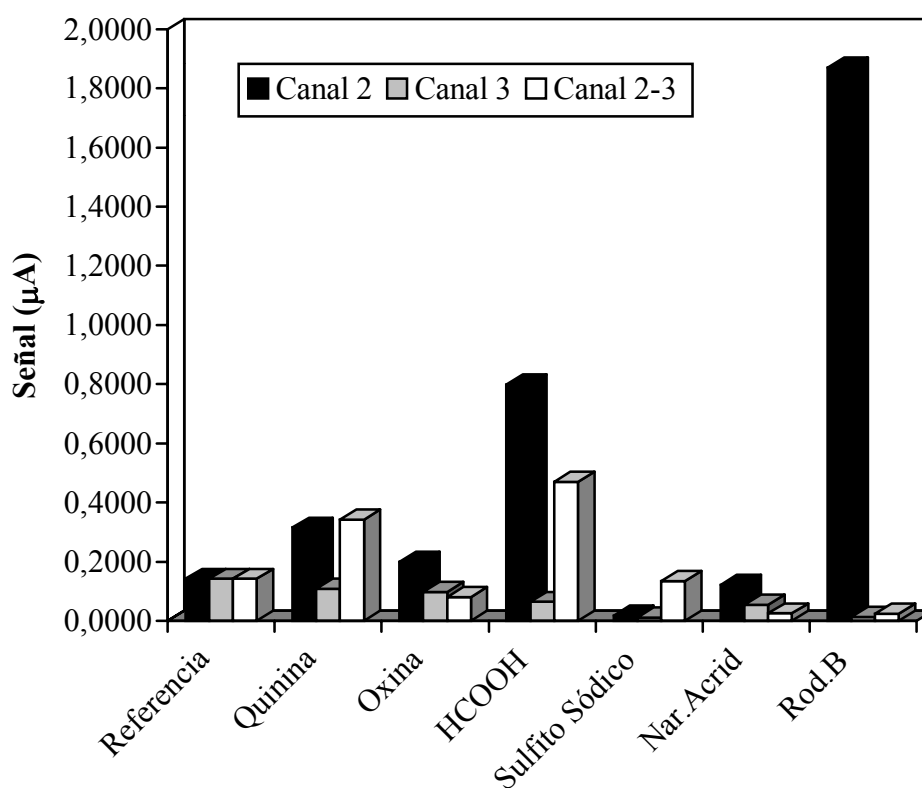


Figura 5.22: Estudio de la influencia de los sensibilizadores.

A continuación, se compararon las señales analíticas obtenidas para una concentración de 1.0 ppm de fenol en presencia de sensibilizador con la de referencia (sin sensibilizador), descartándose el sulfito sódico y el naranja de acridina porque la señal analítica disminuía respecto a la de referencia.

Con el fin de seleccionar el sensibilizador más adecuado para el desarrollo del nuevo sistema quimioluminiscente, se determinó para cada uno de los fluoróforos el cociente entre la señal analítica de 1.0 ppm de fenol y el blanco (agua desionizada por el canal 1).

Este cociente, se calculó para las tres maneras de introducir el sensibilizador en el montaje en flujo continuo.

Sensibilizador	Canal	Señal (μA)		Señal/Blanco
		Blanco	1.0 ppm	
Referencia (sin sensibilizador)		0.0062	0.1579	25.4
Sulfato de quinina	2	0.1151	0.4435	3.8
	3	0.0225	0.2559	11.3
	2 y 3	0.0778	0.1947	2.5
8-hidroxiquinoleina (oxina)	2	2.6570	2.8420	1.0
	3	0.0020	0.1496	74.8
	2 y 3	2.7280	2.7300	1.0
Ácido fórmico	2	0.0500	1.1754	23.5
	3	0.0080	0.2638	32.9
	2 y 3	0.0960	0.6755	7.0
Rodamina B	2	3.3787	6.7529	2.0
	3	0.0120	0.0140	1.1
	2 y 3	0.0860	0.0800	0.9

Tabla 5.11: Ensayos sobre la sensibilidad del proceso con los sensibilizadores.

Considerando los resultados obtenidos en la Tabla 5.11, se descartaron el sulfato de quinina y la rodamina B, porque el cociente para las tres formas ensayadas de introducir el sensibilizador en el montaje era menor que el obtenido en ausencia de fluoróforo. Finalmente, se seleccionaron la oxina y el ácido fórmico, disueltos en el medio que confluye con el oxidante (canal 3) por incrementar en un 194.4% y un 29.5% respectivamente el cociente respecto al obtenido sin sensibilizador; también se seleccionó el ácido fórmico disuelto en el medio que confluye con el analito (canal 2) aunque el valor del cociente disminuía en un 7.5% respecto al de referencia, ya que las intensidades quimioluminiscentes obtenidas en estas condiciones eran elevadas.

Tras esta preselección, se decidió variar la concentración del ácido fórmico y de la oxina con el propósito de encontrar una concentración que favoreciera el incremento de la señal analítica para 1.0 ppm de fenol.

Para la oxina disuelta en el medio (canal 3) se ensayaron cinco concentraciones de sensibilizador comprendidas entre 1.0×10^{-4} y $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que para el ácido fórmico disuelto en el H_2SO_4 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ del canal 2 y del canal 3 se estudiaron siete concentraciones comprendidas entre 0.1 y $8.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, incluyendo en ambos estudios un ensayo sin sensibilizador, que sirvió de señal de referencia.

En al Figura 5.23, se representan los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la concentración de oxina en el canal 3. Seleccionándose como concentración óptima de sensibilizador $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C = 2.3$) al obtenerse en estas condiciones una mayor señal analítica.

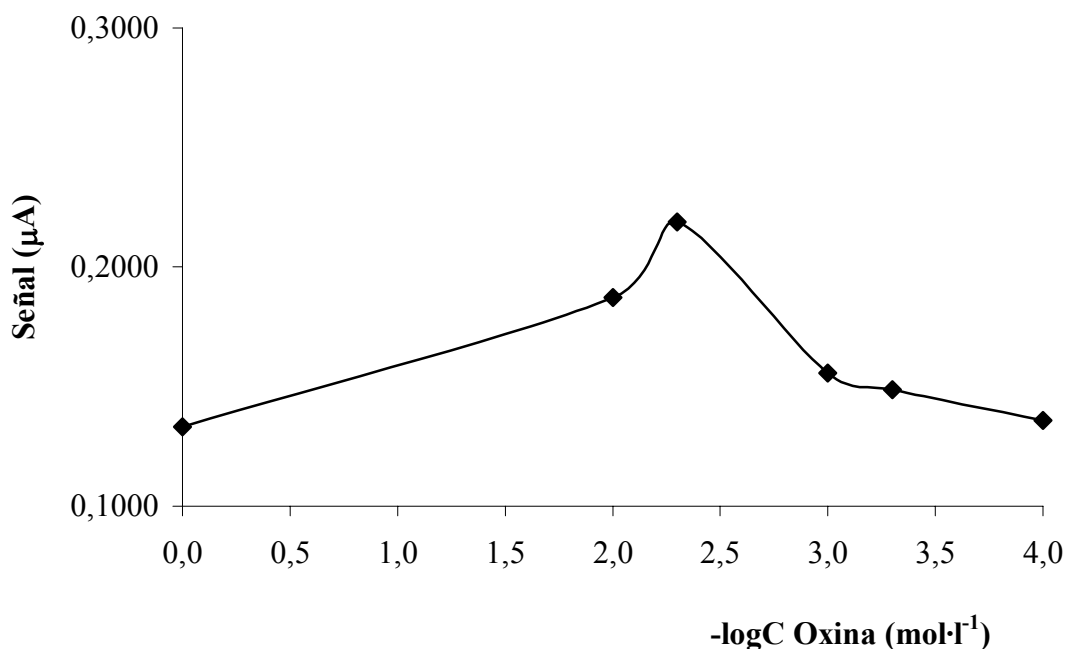


Figura 5.23: Estudio de la concentración de oxina en el canal 3.

En la Figura 5.24, quedan reflejados los resultados del estudio de la variación de la concentración de ácido fórmico en el medio H_2SO_4 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ del canal 2 y 3.

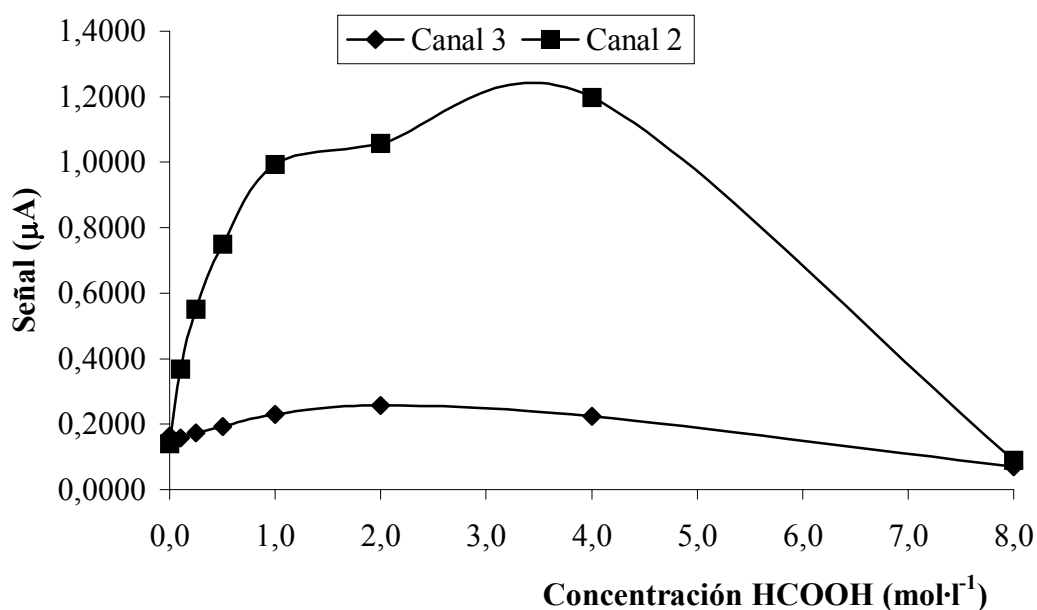


Figura 5.25: Estudio de la concentración de HCOOH en el canal 2 y 3.

Como se puede observar en la gráfica, las señales quimioluminiscentes eran mucho mayores al confluir el sensibilizador con el analito (canal 2) que con el oxidante (canal 3). Por ello, se decidió introducir el ácido fórmico $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ junto con el medio H_2SO_4 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ por el canal 2 que confluye con el analito.

Por último, para seleccionar definitivamente el sensibilizador para el desarrollo del nuevo sistema quimioluminiscente, se realizó un calibrado de fenol para concentraciones bajas, comprendidas entre 0.001-10.000 ppm con la oxina y el ácido fórmico a las condiciones seleccionadas. Además, se incluyó en este experiencia un calibrado en ausencia de sensibilizador con el objeto de determinar si la presencia del mismo reportaba mejoras en cuanto a la sensibilidad y al límite de detección alcanzado.

Calibrado	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
Sin sensibilizador	0.1622	-0.0085	0.9997
Oxina (5.0x10 ⁻³ mol·l ⁻¹)	0.1457	0.0369	0.9659
Ác. fórmico (4.0 mol·l ⁻¹)	0.6463	0.2364	0.9596

Tabla 5.12: Elección del sensibilizador.

Teniendo en cuenta los resultados de la Tabla 5.12, se descartó la oxina por presentar una menor sensibilidad que en ausencia del sensibilizador y se seleccionó definitivamente el HCOOH 4.0 mol·l⁻¹.

La composición preliminar del montaje en flujo continuo descrito en la Figura 5.14 fue la siguiente:

Canal	Disoluciones	Caudal (ml·min ⁻¹)
1	Disolución acuosa de fenol (80.0°C)	2.30
2	H ₂ SO ₄ 4.0 mol·l ⁻¹ + HCOOH 4.0 mol·l ⁻¹ (80.0°C)	2.30
3	H ₂ SO ₄ 4.0 mol·l ⁻¹	0.13
4	KMnO ₄ 5.0x10 ⁻³ mol·l ⁻¹	0.13

Tabla 5.13: Composición preliminar del sistema en flujo continuo.

5.4.1.8. Reoptimización de la concentración del oxidante y del caudal

Se decidió volver a estudiar estas dos variables, ambas críticas en los sistemas quimioluminiscentes, con el propósito de encontrar unas nuevas condiciones que favorecieran la estabilidad de la línea base. Realizándose para cada una ellas, dos estudios independientes con el montaje en flujo continuo descrito en la Figura 5.14 en presencia y en ausencia de sensibilizador.

Para llevar a cabo esta experiencia, se dejaron circular en continuo las disoluciones durante un periodo de tiempo de 1 hora y se calculó la reproducibilidad entre la serie de medidas, obtenidas en ausencia de analito (canal 1, agua desionizada).

1- Estudio del caudal del oxidante y del medio (canales 3-4)

En este ensayo se mantuvo constante el caudal en los canales 1 y 2 a una velocidad de flujo de $2.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y se ensayaron 5 caudales distintos comprendidos en un intervalo de 0.13 a $4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Calculándose la desviación estándar relativa entre las medidas obtenidas en flujo continuo con y sin sensibilizador.

Caudal ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	dsr(%)	
	Sin sensibilizador	Con sensibilizador
0.13	2.7	19.8
1.10	3.7	19.5
2.30	4.1	6.7
3.50	3.2	3.6
4.60	1.2	6.5

Tabla 5.14: Estudio del caudal del oxidante y el medio (canales 3-4).

Según los resultados la Tabla 5.14, la estabilidad de la línea base mejoraba para un caudal de $3.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ en presencia del sensibilizador y $4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ en ausencia del mismo, al mostrar una mejor reproducibilidad entre las medidas.

2- Estudio de la concentración de oxidante

Una vez optimizadas las velocidades de los canales del montaje en flujo continuo, se ensayaron 5 concentraciones de KMnO_4 comprendidas entre 1.0×10^{-4} y $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y se calculó la desviación estándar relativa entre las medidas.

KMnO ₄ (mol·l ⁻¹)	dsr(%)	
	Sin sensibilizador	Con sensibilizador
1.0x10 ⁻⁴	6.8	3.0
5.0x10 ⁻⁴	12.0	6.6
1.0x10 ⁻³	8.9	6.4
5.0x10 ⁻³	21.9	7.8
1.0x10 ⁻²	30.4	12.7

Tabla 5.15: Estudio de la concentración de oxidante.

La concentración de oxidante seleccionada en el ensayo, en ausencia y en presencia de sensibilizador fue, 1.0x10⁻⁴ mol·l⁻¹, por presentar en estas condiciones una mejor reproducibilidad.

Finalizados los ensayos previos en flujo continuo, se establecieron dos configuraciones distintas del montaje en flujo de la Figura 5.14, descritas en la Tabla 5.16.

C	Sin sensibilizador		Con sensibilizador	
	Disoluciones	Q (ml·min ⁻¹)	Disoluciones	Q (ml·min ⁻¹)
1	Disolución acuosa fenol (80°C)	2.3	Disolución acuosa fenol (80°C)	2.3
2	H ₂ SO ₄ 4.0 mol·l ⁻¹ (80 °C)	2.3	H ₂ SO ₄ 4.0 mol·l ⁻¹ + HCOOH 4.0 mol·l ⁻¹ (80. °C)	2.3
3	H ₂ SO ₄ 4.0 mol·l ⁻¹	4.6	H ₂ SO ₄ 4.0 mol·l ⁻¹	3.5
4	KMnO ₄ 1.0x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	4.6	KMnO ₄ 1.0x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	3.5

C: Canal; Q: Caudal.

Tabla 5.16: Composición final del montaje en flujo continuo en presencia o en ausencia del sensibilizador.

5.4.2. Ensayos en un sistema F.I.A.

El siguiente ensayo estuvo encaminado a adecuar las variables físico-químicas a un sistema F.I.A. de cuatro canales, de tal manera que en la celda se mantuviesen las concentraciones de reactivos preoptimizadas en el sistema en flujo continuo. El montaje F.I.A. se muestra en la Figura 5.26.

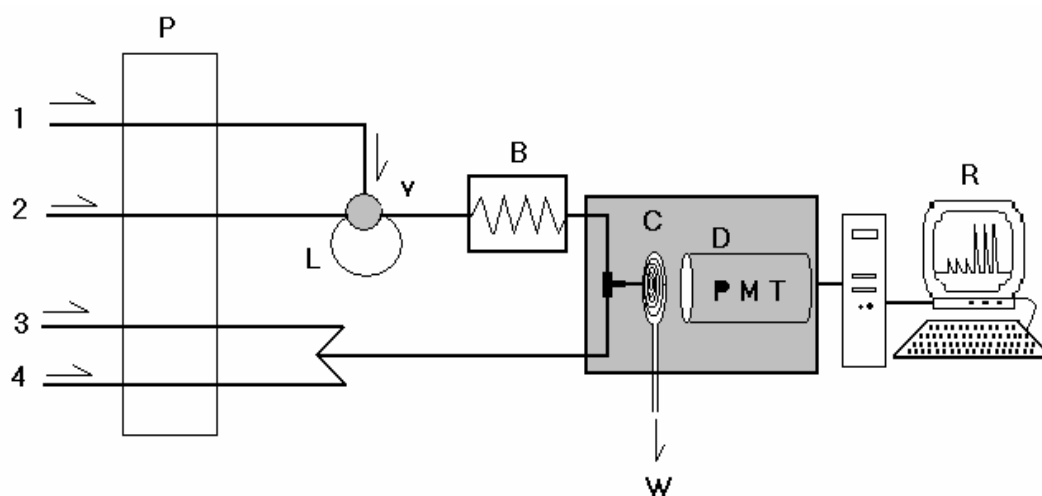


Figura 5.26: Montaje F.I.A. de cuatro canales.

Canal 1: Muestra; **Canal 2:** Portador **Canal 3:** Medio que confluye con el oxidante; **Canal 4:** Oxidante; **P:** Bomba peristáltica; **V:** Válvula de inyección; **L:** bucle de muestra ; **B:** Baño termostático a 80°C; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **R:** Recolección, tratamiento y presentación de resultados; **W:** Desecho.

Según los resultados obtenidos en los ensayos en flujo continuo, los parámetros físico-químicos variaban si se incluía el sensibilizador o no en el sistema (Tabla 5.16). Por esta razón, las variables químicas y F.I.A. para el montaje en inyección en flujo para ambas configuraciones eran distintas. En la Tabla 5.17 se detallan las variables del montaje F.I.A. en presencia o en ausencia del sensibilizador.

Variables	Sin sensibilizador	Con sensibilizador
Químicas	Canal 1: Fenol en H ₂ SO ₄ 2.0 mol·l ⁻¹ Canal 2: H ₂ SO ₄ 2.0 mol·l ⁻¹ Canal 3: H ₂ SO ₄ 4.0 mol·l ⁻¹ Canal 4: KMnO ₄ 1.0x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	Canal 1: Fenol en H ₂ SO ₄ 2.0 mol·l ⁻¹ + HCOOH 2.0 mol·l ⁻¹ Canal 2: H ₂ SO ₄ 2.0 mol·l ⁻¹ + HCOOH 2.0 mol·l ⁻¹ Canal 3: H ₂ SO ₄ 4.0 mol·l ⁻¹ Canal 4: KMnO ₄ 1.0x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹
F.I.A.	Canal 2: 4.6 ml·min ⁻¹ Canal 3: 4.6 ml·min ⁻¹ Canal 4: 4.6 ml·min ⁻¹ Volumen de muestra (L): 1.6 ml Reactor: 2 metros (80.0°C)	Canal 2: 4.6 ml·min ⁻¹ Canal 3: 3.5 ml·min ⁻¹ Canal 4: 3.5 ml·min ⁻¹ Volumen de muestra (L): 1.6 ml Reactor: 2 metros (80.0°C)

Tabla 5.17: Composición del montaje F.I.A. descrito en la Figura 5.26.

5.4.2.1. Pruebas preliminares en un sistema F.I.A.

Con el objetivo de decidir definitivamente la composición del montaje F.I.A. y si era necesario el sensibilizador para incrementar la sensibilidad del método y mejorar el límite de detección, se realizó un calibrado de fenol entre 0.01 y 1.00 ppm, para cada una de las composiciones del montaje F.I.A. descritas en la Tabla 5.17. Los resultados de sendos calibrados se recogen en la Tabla 5.18.

Composición	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
Sin sensibilizador	0.0291	0.0045	0.9539
Con sensibilizador	0.7696	0.0864	0.9303

Tabla 5.18: Resultados de los calibrados con las composiciones del montaje F.I.A.

Como se muestra en la Tabla 5.18, la pendiente del calibrado obtenida en presencia del ácido fórmico fue más elevada que en ausencia del sensibilizador.

Sin embargo se decidió realizar más ensayos, para seleccionar aquella composición F.I.A. que permitiera determinar cantidades más pequeñas de analito.

Con el objeto de aumentar la señal quimioluminiscente, se pensó en calentar a la misma temperatura que la muestra-portador, el oxidante y el H_2SO_4 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ que confluía con el mismo. Para ello se sumergieron 2.0 metros de PTFE en un baño termostático a $80.0 \text{ }^\circ\text{C}$ a la salida de la confluencia del canal 3-4. Para esta experiencia se realizaron tres calibrados, un calibrado para cada una de las composiciones del montaje F.I.A. (Tabla 5.17) y otro más con sensibilizador, pero con los tres canales a la misma velocidad de flujo fijada en $4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Estos calibrados se obtuvieron para un intervalo de concentraciones entre 0.001 a 1.000 ppm de fenol.

Composición	Pendiente	Ordenada en el origen	r^2
Sin sensibilizador	0.1019	0.0028	0.9959
Con sensibilizador	2.6165	0.1956	0.9780
Con sensibilizador ($4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	2.9644	0.1828	0.9862

Tabla 5.20: Resultados de los calibrados con las composiciones del montaje F.I.A.

Como muestran los resultados de Tabla 5.20, la pendiente del calibrado obtenida en presencia del sensibilizador con todos los canales a la misma velocidad de flujo era muy superior que en ausencia del ácido fórmico y un 11.7% más elevada que cuando el caudal del portador difería respecto al del oxidante y medio. Por ello, y con el propósito de mejorar la sensibilidad del método se seleccionó el montaje F.I.A. descrito en la Figura 5.26 incluyendo el sensibilizador, todos los canales a una temperatura de 80.0°C y a un caudal de $4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.4.2.2. Influencia de la presencia de agentes tensoactivos

Los medios organizados (normalmente agentes tensoactivos) pueden aumentar la intensidad de la emisión quimioluminiscente^{213,222,318,319}, debido a que protegen el analito de su entorno y evitan la pérdida de energía en otras formas distintas a la de emisión. Por este motivo se ensayaron distintos tipos de tensoactivos: sodio dodecilsulfato (SDS) (aniónico), cloruro de hexadecilpiridinio (HD) (catiónico) y β -ciclodextrina que no es un tensoactivo en sentido estricto pero que, dadas sus características estructurales, actúa como un medio organizado al capturar solutos en el interior de las asociaciones moleculares anulares que forma en disolución.

Dichos compuestos, se ensayaron a concentraciones ligeramente superiores a las respectivas concentraciones micelares críticas^{320,321}, $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (HD), $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (SDS) y $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (β -ciclodextrina) y se introdujeron en sistema F.I.A. por el canal 1 (disueltos con la muestra), por el canal 2 (disueltos en el portador) y mediante los canales 1 y 2 (disueltos en la muestra y en el portador).

El estudio de la influencia de la presencia de estos compuestos en la señal quimioluminiscente se efectuó para tres concentraciones distintas de fenol, incluyendo un ensayo sin tensoactivo que sirvió de señal de referencia. La adición de tensoactivos no influyó de forma positiva en la reacción quimioluminiscente, disminuyendo la señal analítica respecto a la de referencia para todas las combinaciones y con todas las concentraciones ensayadas. Considerando, pues, estos hechos no se incluyeron tensoactivos en el sistema quimioluminiscente.

5.4.2.3. Optimización de la concentración de sensibilizador, HCOOH

Por último, se procedió a optimizar mediante el método univariante la concentración de ácido fórmico en la muestra y en el portador, variando simultáneamente dicha concentración en ambos canales (1 y 2, Figura 5.26). Para llevar a cabo este estudio, se realizaron calibrados para siete concentraciones de fenol comprendidas entre 0.01 y 50.00 ppb. Las concentraciones ensayadas de HCOOH y las ecuaciones de calibrado obtenidas se muestran en la Tabla 5.21.

C (HCOOH) (mol·l ⁻¹)	Ecuación recta	r ²
1.0	S= 0.0046C+0.0150	0.9937
2.0	S= 0.0072C+0.0103	0.9816
4.0	S= 0.0069C+0.0178	0.9919

S: Señal (μA), C: Concentración (ppb).

Tabla 5.21: Optimización de la concentración de HCOOH en la muestra y en el portador.

Considerando la pendiente de las rectas, la concentración de sensibilizador óptima era 2.0 mol·l⁻¹, pero en estas condiciones al igual que a una concentración de HCOOH 4.0 mol·l⁻¹, se observaba una pequeña deriva de la línea base. Por ello, se seleccionó una concentración 1.0 mol·l⁻¹ de HCOOH.

5.4.3. Sistema F.I.A. optimizado para la reacción quimioluminiscente

La configuración definitiva del sistema F.I.A. para la determinación de fenol por quimioluminiscencia directa, fue la que se muestra en la Figura 5.30.

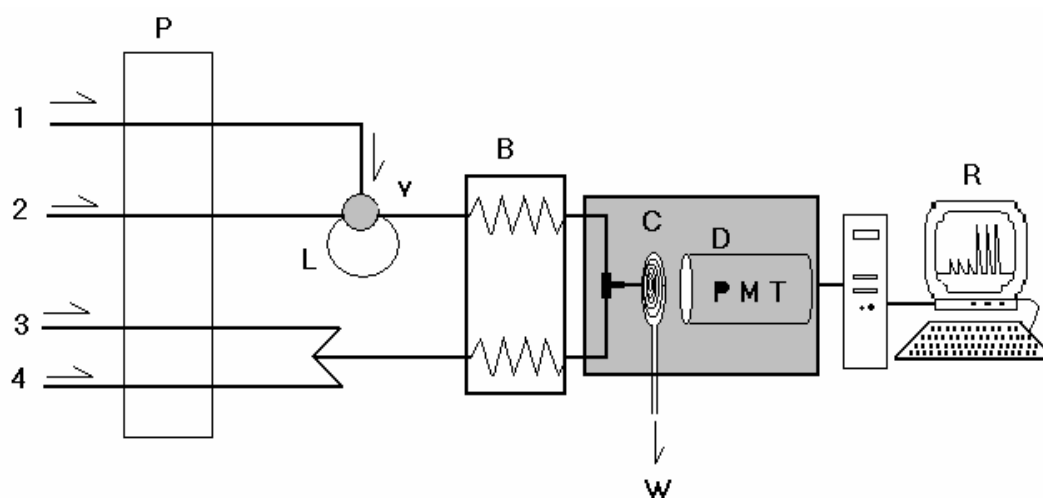


Figura 5.30: Configuración definitiva del sistema F.I.A.

Canal 1: Disolución de fenol en H_2SO_4 $2.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; HCOOH $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Canal 2: Portador: H_2SO_4 $2.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; HCOOH $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 3: Disolución de H_2SO_4 $4.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 4: Disolución de KMnO_4 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

P: Bomba peristáltica.

V: Válvula de inyección.

L: Volumen de muestra insertado $1600 \mu\text{l}$.

B: Baño termostático a 80.0°C .

C: Celda de flujo en espiral.

D: Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador).

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

W: Desecho.

5.5. ESTUDIO DE LA PRECONCENTRACIÓN-SEPARACIÓN CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE

La tercera etapa del presente trabajo consistió, en acoplar el montaje F.I.A. optimizado para la determinación de fenol por quimioluminiscencia directa, como reacción de derivatización del montaje por inyección en flujo desarrollado para la preconcentración-separación del fenol.

De esta forma, surge un nuevo método analítico que permite realizar una determinación selectiva de fenol en aguas mediante preconcentración-separación en un sistema F.I.A. con detección quimioluminiscente, automatizándose en un solo montaje tres objetivos:

- **Pretratamiento de la muestra** que permite eliminar interferentes de la matriz y aumentar la selectividad del método.
- **Preconcentración del analito** para favorecer la sensibilidad.
- **Mejora del límite de detección** a nivel de ppb, que facilita la determinación de fenol en aguas residuales, superficiales o de abastecimiento público, donde se pueden encontrar a concentraciones muy bajas o a nivel de trazas.

El nuevo sistema F.I.A. fruto de la combinación de los montajes optimizados en el apartado 5.3 y 5.4 (Figuras 5.13 y 5.30), fue el que se detalla a continuación en la Figura 5.31, así mismo en la Tabla 5.22 se describen las etapas y los tiempos necesarios para realizar un ciclo de preconcentración-separación.

Etapas	Posiciones Válvulas	Tiempo (minutos)
Acondicionamiento	V1-I y V2-L	5
Preconcentración	V1-L y V2-L	5
Lavado	V1-I y V2- L	2
Elución	V1-I y V2-I	2

Tabla 5.22: Tiempos necesarios para la separación-preconcentración.

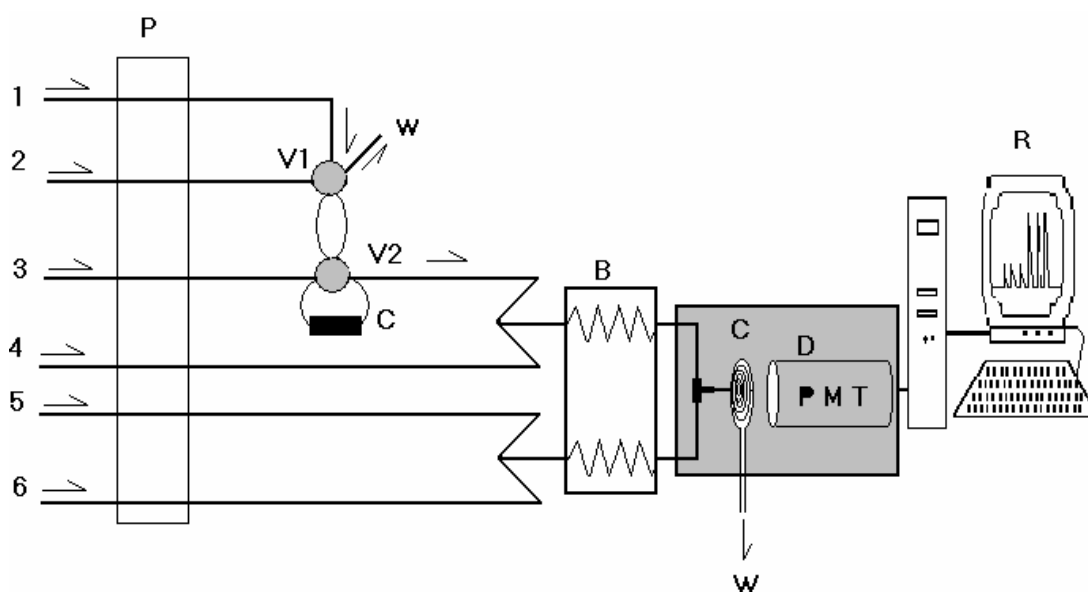


Figura 5.31: Montaje F.I.A. con preconcentración y detección quimioluminiscente.

Canal 1: Disolución acuosa de fenol ($3.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 2: $\text{HCl } 0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 3: Eluyente $\text{NaOH } 0.20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 4: Disolución $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 2.00 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; $\text{HCOOH } 1.00 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 5: Disolución de $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 4.00 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 6: Disolución de $\text{KMnO}_4 \text{ } 1.00 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($4.6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

P: Bomba peristáltica.

V1: Válvula de inyección.

V2: Válvula de inyección.

C: Reactor (10.0 cm de longitud y 2.8 mm de diámetro interno) relleno de resina Amberlite XAD-4.

B: Baño termostático a 80.0°C .

C: Celda de flujo en espiral.

D: Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador).

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

W: Desecho.

5.5.1. Ensayos preliminares en el sistema F.I.A. con preconcentración y detección quimioluminiscente

5.5.1.1. Reoptimización del caudal del eluyente

En primer lugar, se procedió a reoptimizar mediante el método univariante el caudal de NaOH, que aunque ya había sido optimizado en la etapa de preconcentración-separación, era un parámetro de suma relevancia en la preconcentración, y condicionaba el obtener una mayor o menor señal analítica, al ser el responsable de la desorción del fenol retenido en el reactor.

Para la reoptimización de esta variable, se varió el caudal del canal 3 correspondiente al montaje descrito en la Figura 5.31 entre 0.6 y 3.0 ml·min⁻¹. Este intervalo se seleccionó teniendo en cuenta para que velocidades de flujo se habían obtenido mayores señales analíticas en los estudios previos sobre la preconcentración-separación y teniendo presente que no se podía aumentar más el caudal porque se generaban problemas de sobrepresión en el sistema.

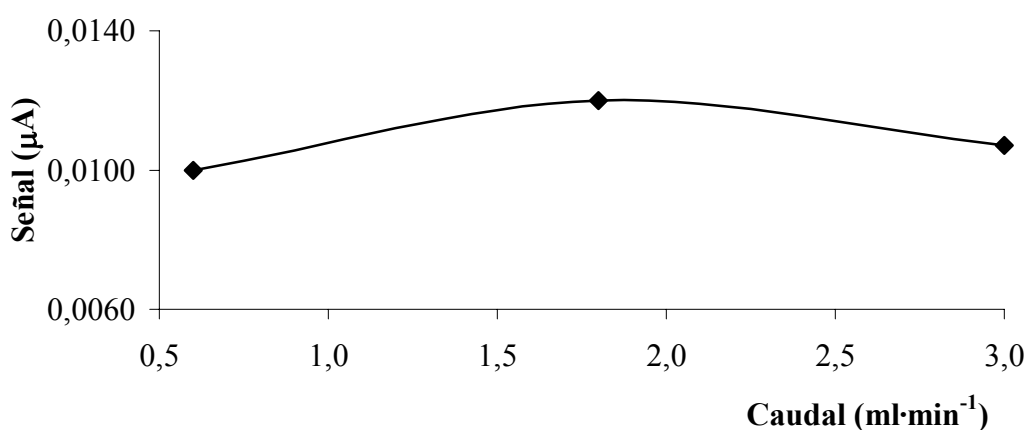


Figura 5.32: Reoptimización del caudal de eluyente.

Según los resultados de la Figura 5.32, se seleccionó como caudal óptimo 1.8 ml·min⁻¹, ya que proporcionaba una mayor señal analítica para 10.0 ppb de fenol.

5.5.1.2. Estudio de posibles montajes F.I.A.

La siguiente experiencia estuvo encaminada a encontrar una configuración F.I.A. óptima, que permitiera obtener una mayor sensibilidad y que fuera capaz de discriminar con éxito entre pequeñas diferencias en la concentración de analito.

Se ensayaron tres montajes que diferían en los parámetros químicos de la detección, de forma que en la celda de flujo se mantuvieran las concentraciones de los reactivos anteriormente optimizadas y descritas en el montaje de la Figura 5.31, que surge de la combinación de los sistemas optimizados para la etapa de preconcentración-separación y para la reacción quimioluminiscente. En la Figura 5.33 y 5.34 se detallan los tres montajes estudiados.

Primer Montaje F.I.A.

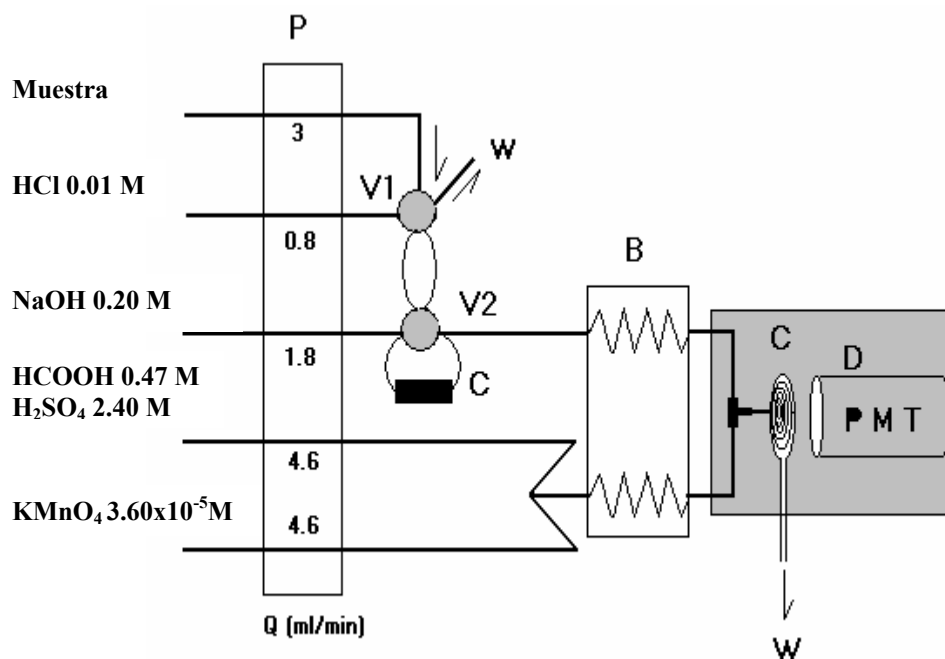
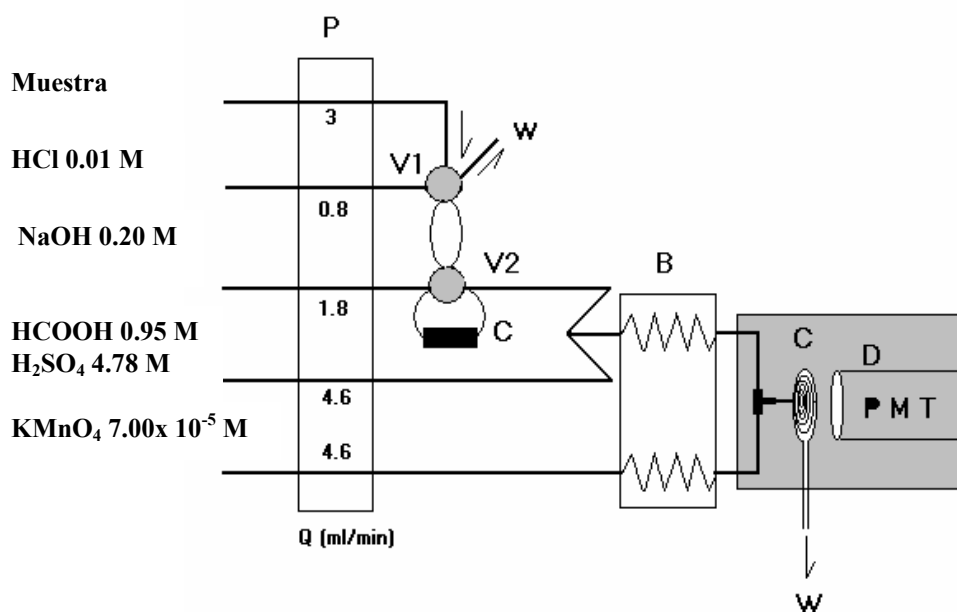


Figura 5.33: Primer montaje F.I.A.

Q: Caudal (ml·min⁻¹); **P:** Bomba peristáltica; **V1 y V2:** Válvulas de inyección; **C:** Reactor; **B:** Baño termostático a 80°C; **C:** Celda de flujo en espiral; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho.

Segundo Montaje F.I.A.



Tercer Montaje F.I.A.

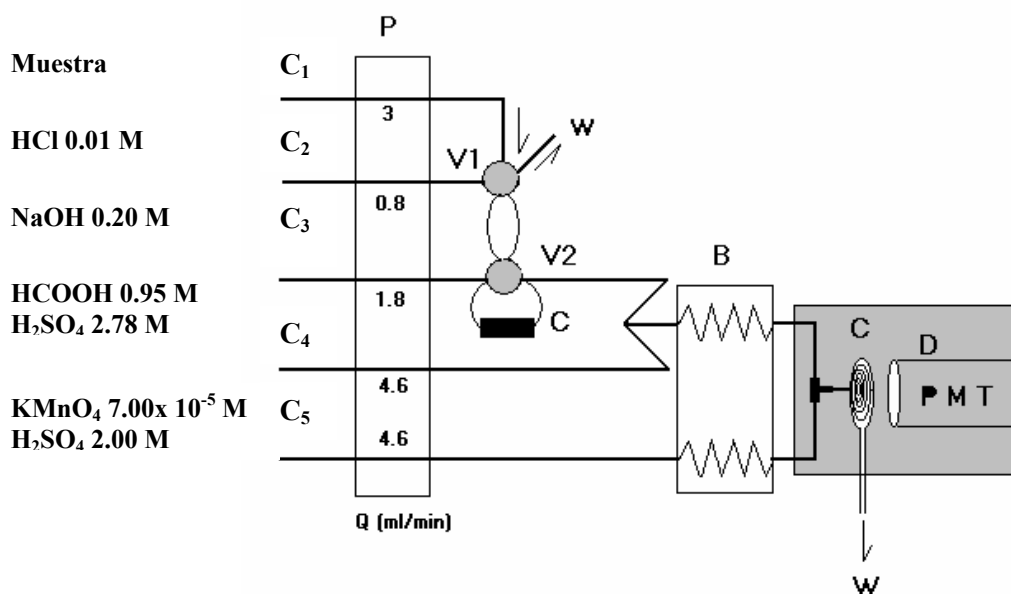


Figura 5.34: Segundo y tercer montaje F.I.A.

Q: Caudal (ml·min⁻¹); **C_x:** Canal; **P:** Bomba peristáltica; **V1 y V2:** Válvulas de inyección; **C:** Reactor; **B:** Baño termostatado a 80°C; **C:** Celda de flujo en espiral; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho.

Con el propósito de comparar las sensibilidades obtenidas con cada configuración y teniendo en cuenta los tiempos y las etapas necesarias para llevar a cabo un ciclo de preconcentración-extracción (Tabla 5.22). Se realizó con cada uno de los montajes propuestos un calibrado para cinco concentraciones de fenol comprendidas entre 0.01 y 50.00 ppb. A continuación en la Tabla 5.23 se muestran los resultados de esta experiencia.

Montaje	Pendiente	Ordenada en el Origen	r ²
1	0.0040	0.0117	0.9967
2	0.0068	0.0051	0.9990
3	0.0055	-0.0015	0.9979

Tabla 5.23: Resultados de los calibrados para los tres montajes F.I.A.

A partir de los resultados de la Tabla 5.23 y atendiendo al criterio de sensibilidad se descartó el primer montaje F.I.A.

Para seleccionar entre el segundo y tercer sistema, fue necesario estudiar la estabilidad en el tiempo del KMnO₄ en ácido sulfúrico (canal 5, Figura 5.34), ya que favorecido por el calor, el oxidante en medio ácido podría reaccionar con la materia orgánica presente en la disolución y formar un precipitado de MnO₂ que pudiera interferir en la señal analítica.

Para llevar a cabo esta experiencia se obtuvieron durante aproximadamente 4 horas, una serie de 17 inserciones consecutivas de fenol 1.0 ppb y se calculó reproducibilidad entre las señales analíticas. Los resultados fueron satisfactorios, una dsr= 7.1%, por tanto, se podía afirmar que el oxidante en medio ácido era estable durante un periodo de medida considerable.

Finalmente y tras haber estudiado la estabilidad del KMnO₄ preparado en medio ácido sulfúrico, se seleccionó *el tercer montaje* para la determinación de fenol en aguas, que aunque presentaba una menor pendiente del calibrado respecto al

segundo montaje, y teniendo en cuenta las características de peligrosidad del ácido sulfúrico, se evitaba de esta manera, el trabajar con un medio ácido tan concentrado que podría acarrear problemas técnicos en lo sucesivo.

5.5.2. Reoptimización de las variables experimentales

Una vez seleccionado el sistema F.I.A. (Figura 5.34; tercer montaje), se procedió a reoptimizar las variables químicas y algunas variables F.I.A. mediante el método univariante. En la Tabla 5.24 se muestran las variables, los intervalos estudiados, así como los parámetros seleccionados para cada una de ellas, hay que destacar que en todos los casos se obtuvieron las señales analíticas para 10.0 ppb de fenol.

Variable	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
Caudal de los canales 4-5	3.5-5.4 ml·min ⁻¹	5.4 ml·min ⁻¹
Concentración de oxidante	2.5x10 ⁻⁵ -2.5x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	5.0x10 ⁻⁵ mol·l ⁻¹
Concentración de H ₂ SO ₄ en el canal 5	2.0-3.0 mol·l ⁻¹	2.5 mol·l ⁻¹
Concentración de H ₂ SO ₄ en el canal 4	1.2-3.3 mol·l ⁻¹	2.2 mol·l ⁻¹
Concentración de HCOOH en el canal 4	0.40-0.95 mol·l ⁻¹	0.75 mol·l ⁻¹
Temperatura	24.0-80.0 °C	80.0 °C
Longitud del reactor a calentar	1.0-3.0 metros	1.0 metros

Tabla 5.24: Reoptimización de las variables experimentales.

5.5.3. Sistema F.I.A. optimizado para la preconcentración-separación con detección quimioluminiscente

La configuración definitiva del nuevo método analítico que permite realizar una determinación de fenol en aguas mediante preconcentración-separación en sistema F.I.A. con detección quimioluminiscente, queda reflejada en la Figura 5.35.

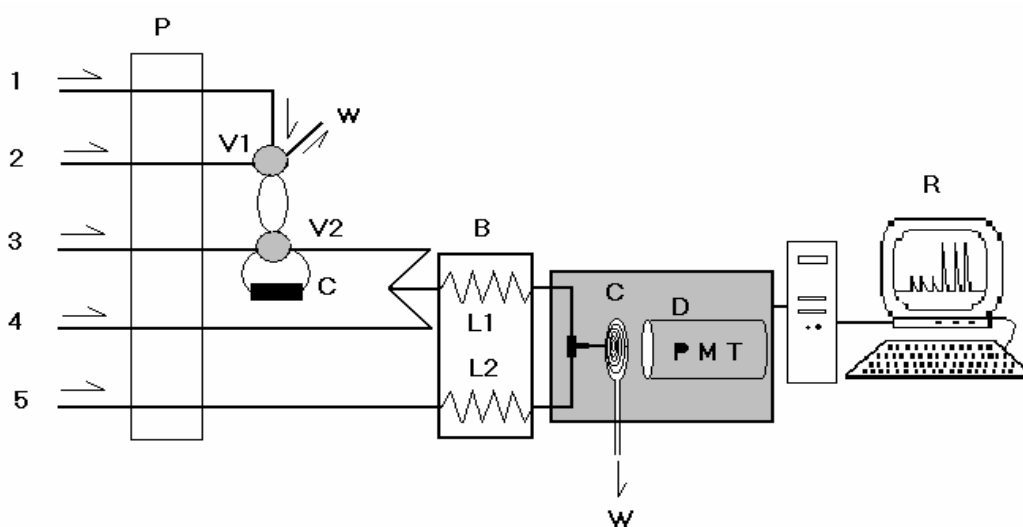


Figura 5.35: Configuración definitiva del sistema F.I.A.

Canal 1: Disolución acuosa de fenol ($3.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 2: $\text{HCl } 0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 3: Eluyente $\text{NaOH } 0.20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 4: $\text{HCOOH } 0.75 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 2.20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

Canal 5: $\text{KMnO}_4 \text{ } 5.00 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 2.50 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

P: Bomba peristáltica.

V1 y V2: Válvulas de inyección.

C: Reactor relleno de resina Amberlite XAD-4.

B: Baño termostático a 80.0°C .

L1 y L2: Longitud que afecta a la temperatura (1.0 metro)

C: Celda de flujo en espiral.

D: Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador)

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

W: Desecho

En la Tabla 5.25, se describen las etapas y los tiempos necesarios para realizar un ciclo de preconcentración-separación para la determinación de fenol por quimioluminiscencia directa en un sistema F.I.A.

Etapas	Posiciones Válvulas	Tiempo (minutos)
Acondicionamiento	V1-I y V2-L	5
Preconcentración	V1-L y V2-L	5
Lavado	V1-I y V2- L	2
Elución	V1-I y V2-I	2

V1: (válvula 1); V2: (válvula 2); L: posición carga; I: posición inyección

Tabla 5.25: Tiempos necesarios para la separación-preconcentración.

5.5.4. Influencia de la presencia de catalizadores metálicos

Según se ha descrito en la bibliografía ciertos cationes metálicos^{150,160} pueden catalizar el proceso de oxidación e implícitamente producir un incremento de la respuesta quimioluminiscente. Por este motivo y con el objeto de aumentar la sensibilidad para concentraciones bajas de analito se decidió estudiar la influencia de la presencia de catalizadores metálicos.

Con el propósito de simplificar este ensayo y evitar las etapas necesarias para realizar un único ciclo de preconcentración, los estudios se llevaron a cabo en un sistema en inyección en flujo en ausencia del reactor. El montaje se encuentra descrito en la Figura 5.36.

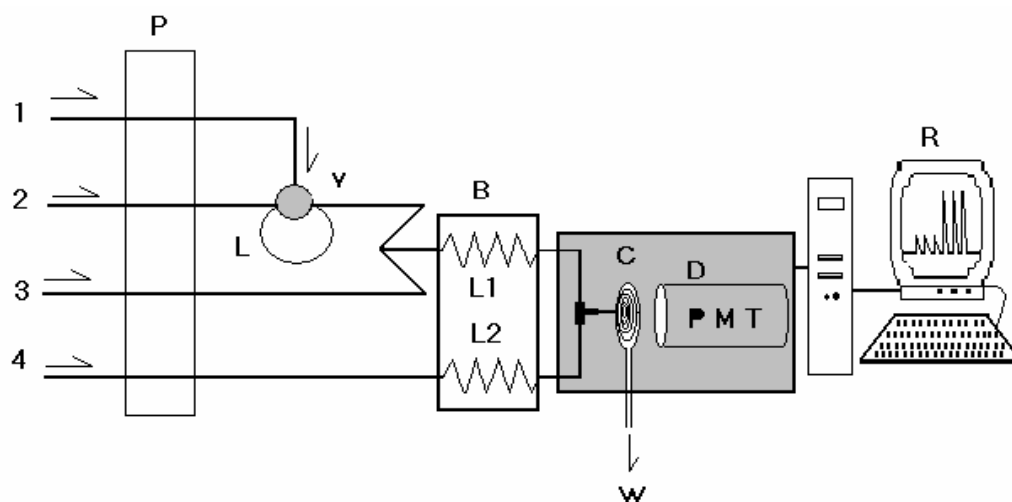


Figura 5.36: Montaje F.I.A. para el estudio de los catalizadores metálicos.

Canal 1: Fenol en H_2SO_4 $4.40 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; **Canal 2:** Portador (H_2O ó disolución acuosa de la sal) ($5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$); **Canal 3:** HCOOH $0.75 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $2.20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$); **Canal 4:** KMnO_4 $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $2.50 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$); **P:** Bomba peristáltica; **V:** Válvula de inyección; **L:** Bucle de muestra (1.6 ml); **B:** Baño termostático a 80.0°C ; **L1 y L2:** longitud 1.0 m **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **R:** Recolección, tratamiento y presentación de resultados; **W:** Desecho.

En este montaje F.I.A. de cuatro canales fue necesario adecuar las variables físico-químicas, de forma que en la celda se mantuviesen las concentraciones de los reactivos establecidas en el montaje optimizado, descrito en la Figura 5.35 para la determinación de fenol en aguas por preconcentración y quimioluminiscencia directa.

Una vez establecido el montaje, la influencia de los cationes metálicos se estudió incluyéndolos en el canal 2 como portador de la disolución de fenol. Se ensayaron numerosos cationes: calcio(II), cadmio(II), cobalto(II), cromo(III), cobre (II), hierro(III), manganeso(II), níquel(II), plomo(II), zinc(II) en forma de sales de nitrato y a una concentración $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Las señales analíticas obtenidas para 10.0 ppb de fenol se incrementaron en más de un 21% respecto a la de referencia

(portador, agua), cuando el portador era una disolución de las sales nitrato de Cd(II), Cr(III), Ni(II) y Pb(II).

Posteriormente a esta preselección, se decidió variar la concentración de los cationes con el propósito de encontrar una concentración que favoreciera el incremento de la señal analítica para 10.0 ppb de fenol, incluyendo en este estudio un ensayo sin catalizador que sirvió de señal de referencia.

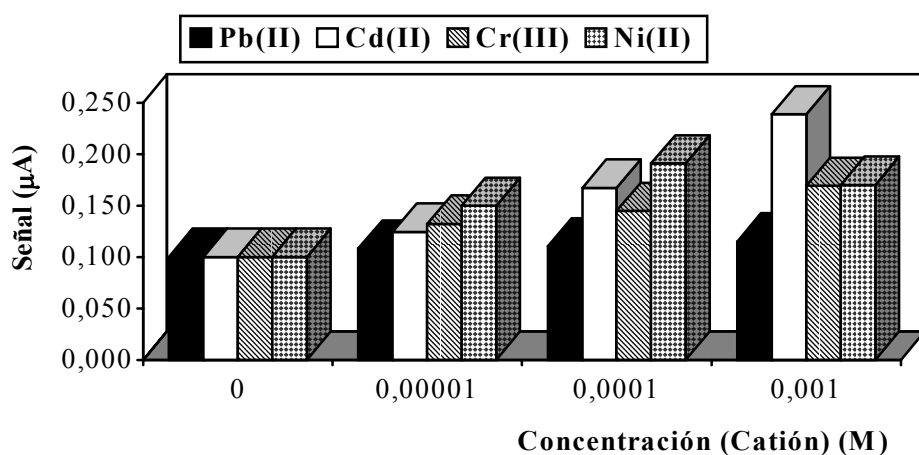


Figura 5.37: Estudio de la concentración de catalizadores metálicos.

Como se observa en la Figura 5.37 incrementaron la señal quimioluminiscente el Cd(II) $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, el Cr (III) $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ y el Ni(II) $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ en un 138.2%, 69.0% y 90.6% respecto a la de referencia, descartándose definitivamente tras este ensayo el Pb(II).

Con el fin de seleccionar de entre los tres cationes Cd(II), Cr(III), Ni(II) aquel que proporcionara una mayor sensibilidad para concentraciones bajas de analito, se realizó un calibrado de fenol para 5 concentraciones comprendidas entre 1.0 y 50.0 ppb con cada uno de ellos, incluyendo en este estudio un calibrado donde el portador fuera agua desionizada, para comparar los resultados y comprobar que efectivamente el catión exaltaba la respuesta quimioluminiscente.

Portador	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
H ₂ O	0.0088	0.0749	0.9935
Cr(NO ₃) ₃ 1.0x10 ⁻³ mol·l ⁻¹	0.0100	0.0328	0.9951
Cd(NO ₃) ₂ 1.0x10 ⁻³ mol·l ⁻¹	0.0100	0.0524	0.9981
Ni(NO ₃) ₂ 1.0x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	0.0103	0.0494	0.9892

Tabla 5.26: Resultados de los calibrados para cada uno de los cationes.

Considerando los resultados de la Tabla 5.26 se eligió finalmente, el *Ni(II)* porque presentaba una mayor pendiente de la recta de calibrado, era un metal menos contaminante y requeriría una menor concentración para catalizar la reacción.

La influencia de la presencia de catalizadores metálicos en la emisión quimioluminiscente había sido estudiada en un sistema F.I.A. en ausencia del reactor responsable de la preconcentración-separación. Por esta razón, era necesario comprobar que la presencia del níquel incrementaba la señal quimioluminiscente en el montaje definitivo, desarrollado para la determinación fenol en aguas por preconcentración y quimioluminiscencia directa en un sistema F.I.A. (Figura 5.35).

Con este propósito, se realizaron dos calibrados entre 1.0 y 20.0 ppb de fenol, uno de ellos en ausencia del catalizador y el otro con el *Ni(II)* 1.0x10⁻⁴ mol·l⁻¹ que se introducía en el canal 4 de la Figura 5.35 junto con el HCOOH y el medio ácido, ya que confluía directamente con la muestra y reproducía en medida de lo posible el montaje F.I.A. sin reactor (Figura 5.36).

Calibrado	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
Sin catalizador	0.0091	0.0794	0.9988
Ni (NO ₃) ₂ 1.0x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	0.0095	0.0687	0.9744

Tabla 5.27: Resultados de los calibrados con el montaje F.I.A. optimizado (Figura 5.35).

Como se observa en la Tabla 5.27, la presencia del catalizador no provocaba un aumento significativo de la sensibilidad del método, debido a que las pendientes de los calibrados eran muy parecidas. Considerando estos hechos, no se incluyeron catalizadores metálicos en el sistema quimioluminiscente.

5.5.5. Estudio de la capacidad de preconcentración del reactor

El presente ensayo se llevó a cabo con el propósito de establecer la eficacia del reactor en fase sólida para preconcentrar el analito.

Para ello se realizaron dos calibrados entre 1.0 y 20.0 ppb con el montaje F.I.A. optimizado descrito en la Figura 5.35 y con un montaje en flujo continuo en ausencia de reactor (Figura 5.38).

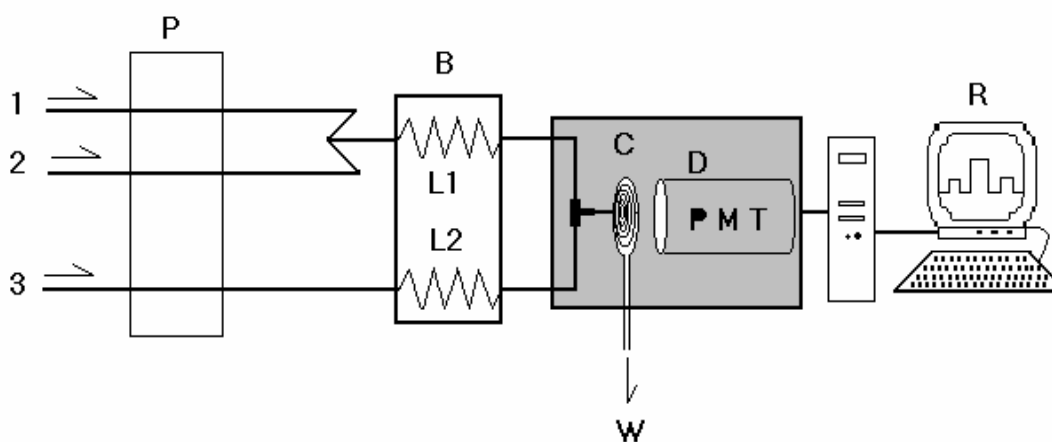


Figura 5.38: Montaje sin reactor.

Canal 1: Disolución acuosa de fenol a pH 13.36 ($1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$); **Canal 2:** HCOOH $0.75 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $2.20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$); **Canal 3:** KMnO_4 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $2.50 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$); **P:** Bomba peristáltica; **B:** Baño termostático a 80.0°C ; **L1 y L2:** longitud 1.0 m **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **R:** Recolección, tratamiento y presentación de resultados; **W:** Desecho.

En este montaje en flujo continuo de tres canales, se mantuvieron las variables físico-químicas y F.I.A. del montaje de la Figura 5.35 optimizadas para la determinación de fenol en aguas, únicamente fue necesario adecuar el pH de la muestra para que se encontrara en un medio básico, al igual que ocurría cuando el fenol era eluído por el NaOH $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

La pendiente con el montaje con preconcentración era 4 veces superior respecto a la obtenida con el montaje en flujo, que correspondía a una situación límite donde la muestra circulaba continuamente por el sistema sin existir dispersión. Por tanto, se podía afirmar que la presencia del reactor en el montaje F.I.A. mejoraba la sensibilidad, además de la selectividad del método.

5.6. APLICACIONES ANALÍTICAS

Tras la optimización del sistema F.I.A. (Figura 5.35) y teniendo presente la etapas y tiempos necesarios para realizar un ciclo de preconcentración (Tabla 5.25), se procedió a estudiar las características analíticas del sistema: intervalo de linealidad repetitividad, frecuencia de inserción, límite de detección, reproducibilidad y estudio de interferencias, para finalmente aplicar el método F.I.A. a la determinación de fenol mediante quimioluminiscencia directa en aguas.

5.6.1. Intervalo de linealidad

El intervalo de linealidad se estableció ensayando disoluciones de fenol de concentraciones entre 1.0 y 20.0 ppb. El calibrado resultó ser lineal entre 1.0 y 20.0 ppb, como se muestra en la Figura 5.39.

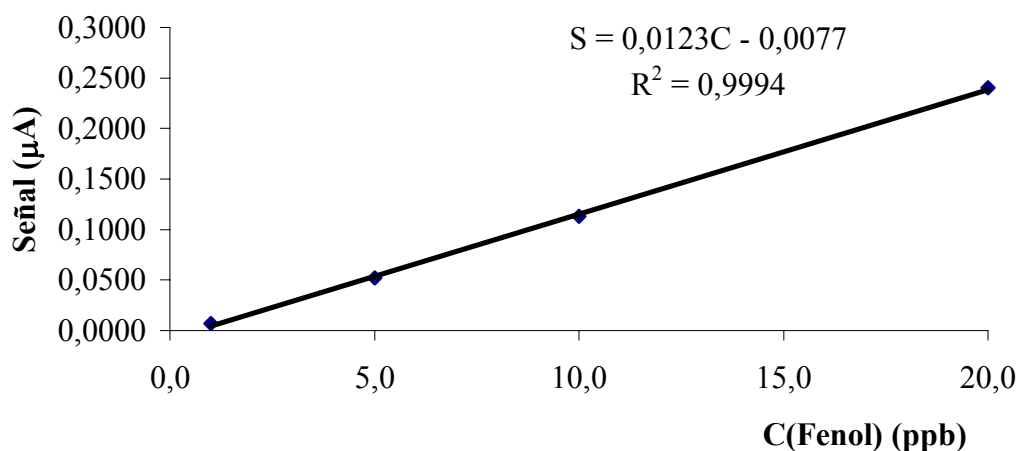


Figura 5.39: Calibrado de fenol en el intervalo de linealidad. S: Señal (μA) y C: Concentración en (ppb).

5.6.2. Estudio de la repetitividad y de la frecuencia de inserción

La repetitividad y la velocidad o frecuencia de inserción se obtuvieron empíricamente a partir de dos series independientes de 15 inserciones sucesivas de fenol 20.0 ppb y 10 inserciones de 1.0 ppb de fenol. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 5.28. Hay que destacar que la velocidad del método esta condicionada por los tiempos y las etapas necesarias para realizar un ciclo de preconcentración (14 minutos).

C(fenol) (ppb)	Repetitividad (dsr%)	Frecuencia de inserción (muestras·h ⁻¹)
1.0	11.6	4
20.0	7.3	4

Tabla 5.28: Frecuencia de inserción y repetitividad del sistema para distintas concentraciones de fenol.

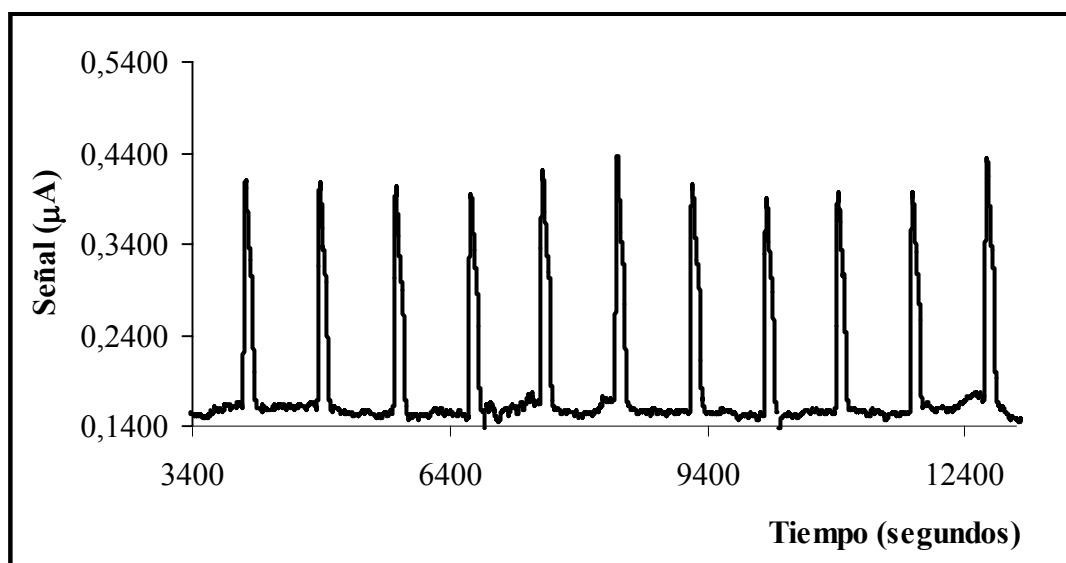


Figura 5.40: Fiagrama del estudio de la repetitividad para el fenol 20.0 ppb.

5.6.3. Límite de detección

El límite de detección se estableció como la mínima concentración de fenol detectable por el método analítico propuesto, que presentó una señal analítica igual o superior al promedio de la señal analítica de 10 inserciones del blanco (agua desionizada por el canal 1, Figura 5.35) más tres veces la desviación estándar del blanco. El límite de detección obtenido experimentalmente de este modo, fue de 1.0 ppb.

5.6.4. Reproducibilidad del sistema

Para estudiar la reproducibilidad del método analítico desarrollado, se realizaron cinco calibrados de fenol en distintos días y con disoluciones de cada uno de los reactivos recién preparadas, obteniéndose las ecuaciones de las rectas de calibrado correspondientes. El intervalo de concentraciones estudiadas de fenol estuvo comprendido entre 1.0 y 20.0 ppb.

A continuación, se calculó el promedio y la desviación estándar relativa de los valores de las pendientes de dichas rectas. El valor medio de la pendiente obtenido para los cinco calibrados fue 0.01176 ppb⁻¹, con una desviación estándar relativa de 9.5%. Las rectas de calibrado se encuentran reflejadas en la Tabla 5.29.

Pendiente	Ordenada en el origen	r²
0.0123	-0.0077	0.9994
0.0103	-0.0110	0.9907
0.0123	-0.0020	0.9809
0.0130	-0.0220	0.9805
0.0109	-0.0016	0.9977

Tabla 5.29: Reproducibilidad entre distintos días y diferentes disoluciones.

5.6.5. Estudio de interferentes

A continuación se efectuó un estudio de la influencia que podían tener sobre la señal analítica la presencia de sustancias que pueden acompañar al fenol en el agua, ya sea residual, superficial o de abastecimiento público. Para ello se prepararon disoluciones que contenían 20.0 ppb de fenol y una concentración de interferente superior a la que aparecen en la muestra.

Para cada una de las sustancias ensayadas se obtuvieron un mínimo de 4 inserciones y se comparó la señal analítica con la de referencia obtenida al insertar una disolución de 20.0 ppb sin adicionar ningún compuesto. Se consideró que la sustancia no interfería cuando ocasionaba errores relativos inferiores al 3 ó 4% respecto a la disolución patrón de fenol.

El presente estudio de interferentes se dividió en tres grupos de compuestos: en primer lugar se consideraron diversos aminoácidos que podrían aparecer en las aguas procedentes de la degradación de la materia orgánica; en segundo lugar se

ensayaron algunos metales e iones inorgánicos presentes en las aguas y por último se estudió la influencia de la presencia de otros compuestos fenólicos en la emisión quimioluminiscente.

En la Tabla 5.30 se agrupan los distintos aminoácidos ensayados junto con los errores obtenidos en cada caso. En las Tablas 5.31, 5.32, 5.33 se muestran los metales e iones inorgánicos estudiados en forma de sales y finalmente en la Tabla 5.34 aparecen los resultados para otros compuestos fenólicos que pueden existir en el agua.

Interferente	Concentración (ppb)	Er(%)
Ácido aspártico	20.0	0.8
Asparagina	100.0*	0.9
Cisteína	50.0	4.1
Fenilalanina	20.0	1.5
Histidina	50.0	3.7
Leucina	100.0*	3.1
Lisina	20.0	0.0
Serina	100.0*	1.5
Tirosina	100.0*	2.5

*Concentración máxima ensayada.

Tabla 5.30: Estudio de posibles aminoácidos presentes en el agua.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Cadmio (Cd(NO ₃) ₂)	0.500	3.7
Cobalto (Co (NO ₃) ₂)	0.050	4.0
Cobre (Cu(NO ₃) ₂)	0.100	3.7
Cromo (Cr(NO ₃) ₃)	1.000*	3.8
Hierro (Fe(NO ₃) ₃)	0.500	1.5
Manganeso (Mn(NO ₃) ₂)	0.005	1.0
Mercurio (Hg(NO ₃) ₂)	0.100	2.1
Níquel (Ni(NO ₃) ₂)	1.000*	1.5
Plomo (Pb(NO ₃) ₂)	1.000*	1.6
Zinc (Zn(NO ₃) ₂)	0.500	0.4

*Concentración máxima ensayada.

Tabla 5.31: Estudio de posibles metales presentes en las aguas. Entre paréntesis aparece la sal que se adicionó a la disolución de fenol.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Amonio (NH ₄ NO ₃)	10.0	2.0
Calcio (Ca(NO ₃) ₂)	50.0*	0.5
Magnesio (Mg(NO ₃) ₂)	10.0	1.0
Potasio (KNO ₃)	20.0	0.9
Sodio (NaNO ₃)	20.0	0.9

*Concentración máxima ensayada.

Tabla 5.32: Estudio de posibles cationes presentes en las aguas. Entre paréntesis aparece la sal que se adicionó a la disolución de fenol.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Carbonato (Na ₂ CO ₃)	5.0	3.6
Fosfato (NaH ₂ PO ₄)	20.0	2.7
Nitrito (NaNO ₂)	0.1	0.8
Sulfato (Na ₂ SO ₄)	50.0*	2.1
Sulfito (Na ₂ SO ₃)	10.0	1.6

*Concentración máxima ensayada.

Tabla 5.33: Estudio de posibles aniones presentes en las aguas. Entre paréntesis aparece la sal que se adicionó a la disolución de fenol.

Interferente	Concentración (ppb)	Er(%)
1-Naftol	10.0	3.9
4-Cloro-2-nitrofenol	50.0*	3.4
4-Cloro-3-metilfenol	50.0*	2.5
<i>m</i> -cresol	1.0	2.6
<i>p</i> -clorofenol	20.0	4.1
Pentaclorofenol	20.0	0.3
Resorcinol	5.0	0.7

*Concentración máxima ensayada.

Tabla 5.34: Estudio de otros compuestos fenólicos.

5.6.6. Análisis de muestras reales

Para finalizar se procedió a aplicar el método analítico propuesto a la determinación de fenol en dos tipos de aguas (residual y superficial), procedentes de dos municipios del Comunidad Valenciana.

En la Tabla 5.35, se detalla la naturaleza de cada una de las muestras empleadas así como su procedencia.

Tipo de Agua	Procedencia
SUPERFICIAL (Manantial)	Buñol (Valencia)
RESIDUAL (Barranco)	Carraixet (Valencia)

Tabla 5.35: Tipos de aguas a las que se aplicó el método analítico.

La toma de muestras se realizó mediante un recipiente adecuado, previamente enjuagado con la misma agua y recogiéndola desde la parte inferior hasta la superior, para evitar la mezcla entre capas. Una vez recogidas las muestras, se guardaron en la oscuridad y en el refrigerador a 3°C hasta que fueron analizadas.

Antes de efectuar el análisis, el agua del barranco fue necesario filtrarla con placa filtrante (de tamaño de poro 4), con el objeto de eliminar la materia en suspensión.

En primer lugar se realizó un ensayo con el método propuesto, introduciéndolas directamente por el canal 1 del montaje F.I.A. (Figura 5.35) con el propósito de comprobar si existía fenol en la matriz. Para las dos muestras testadas el resultado fue negativo, por esta razón se decidió doparlas con una concentración conocida de fenol.

Las muestras de barranco y del manantial se doparon con la cantidad necesaria de fenol, para tener una disolución de concentración situada en la zona central del intervalo de linealidad del método propuesto. Con este propósito, se tomaron con pipeta aforada 50 ml de una disolución madre de fenol 50.0 ppb, se transvasaron a un matraz aforado de 250 ml y se aforó hasta volumen con cada una de las muestras para obtener una concentración final de 10.0 ppb.

Las tres réplicas preparadas de cada una de las aguas de *Manantial* y de *Barranco*, fueron procesadas en el montaje optimizado junto con un calibrado de fenol entre 1.0 y 20.0 ppb. Finalmente la concentración de fenol se calculó por interpolación de la señal en la recta de calibrado, obtenida a partir de la disoluciones

patrones y se comparó la concentración encontrada respecto a la adicionada. En la Tabla 5.36, se observan los resultados obtenidos.

Muestra	Cantidad adicionada	Método propuesto (dsr%)	Er(%)*
Manantial	10.0 ppb	10.91 ppb (0.25)	9.1
Barranco	10.0 ppb	10.74 ppb (0.85)	7.4

* error relativo del método propuesto respecto a la cantidad adicionada.

Tabla 5.36: Resultados para la determinación de fenol en muestras reales con el método analítico propuesto.

A continuación, se determinó la concentración de fenol en las aguas de *manantial* y de *barranco* mediante el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina utilizado para la cuantificación de compuestos fenólicos expresados como fenol, descrito en el “Standard Methods for examination of water”³¹⁰. Este método se basa en la oxidación del fenol en medio básico con el $K_3Fe(CN)_6$ y la posterior condensación con la 4-aminoantipirina para formar un derivado coloreado que puede ser detectado espectrofotométricamente transcurridos 15 minutos.

El método normalizado requiere una destilación previa como pretratamiento de la muestra, para eliminar la interferencia de sustancias no volátiles, como las aminas aromáticas e incrementar la selectividad. Una vez destilada la muestra, el método de la 4-aminoantipirina se puede desarrollar de dos formas según la sensibilidad deseada:

➤ Para muestras que contengan concentraciones de fenol comprendidas entre 1.0 y 250.0 ppb es necesario un proceso de extracción con cloroformo del producto de reacción para mejorar la sensibilidad, antes de realizar la determinación espectrofotométrica.

➤ En caso que la concentración de fenol este a nivel de ppm, no se requiere un proceso de extracción, tratándose de un método fotométrico directo.

Para la determinación de fenol en el agua del *Barranco*, en primer lugar se destilaron 500 ml de la muestra dopados con 10.0 ppb de fenol y se preparó una serie de patrones de fenol en 500 ml de concentraciones comprendidas entre 1.0 y 40.0 ppb. A continuación tanto a los 500 ml del destilado, como a los patrones y al blanco se les adicionó sin alterar el orden, 12 ml de NH_3 0.5 N y las cantidades necesarias de tampón fosfato para ajustar a pH 7.9 el medio de reacción. Posteriormente se trasvasaron a un embudo de decantación y se adicionó 3 ml de 4-aminoantipirina y 3 ml de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, agitándose vigorosamente para favorecer su mezclado y transcurridos 15 minutos se observó una solución de color amarillo. Finalmente se extrajo la porción coloreada con cloroformo y se midieron las absorbancias de la muestra junto con la de los patrones a 460 nm, y por interpolación de las señales en la recta de calibrado se determinó la concentración, comparando la concentración encontrada respecto a la adicionada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.37.

La determinación de fenol en el agua del *Manantial* fue más sencilla; debido a que los errores relativos de la cantidad encontrada respecto a la adicionada obtenidos con el método referencia tras el proceso de extracción fueron muy elevados, por ello se decidió realizar este análisis mediante espectrofotometría directa, siendo necesario dopar las muestras con concentraciones de fenol a nivel de ppm.

Al igual que para el agua del barranco, en primer lugar se realizó un pretratamiento de la muestra, en este caso, se destilaron 100 ml de muestra dopadas con 3.0 ppm de fenol y se prepararon una serie de patrones de fenol en 100 ml de concentraciones comprendidas entre 1.0 y 5.0 ppm. A continuación se adicionaron tanto a los 100 ml de destilado, como a los patrones y al blanco 2.5 ml de la disolución NH_3 0.5 N, se ajustó a pH 7.9 el medio con tampón fosfato y se adicionó

1 ml de 4-aminoantipirina y 1 ml de $K_3Fe(CN)_6$, agitándose vigorosamente para favorecer el mezclado. Transcurridos 15 minutos, se leyeron las absorbancias a 500 nm y por interpolación de las señales en la recta de calibrado se determinó la concentración de fenol, comparando la concentración encontrada respecto a la adicionada. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 5.37.

Muestra	Cantidad adicionada	Método referencia	Er(%)
Manantial	3.0 ppm	2.7 ppm	10.0
Barranco	10.0 ppb	9.7 ppb	-3.0

* error relativo del método de referencia respecto a la cantidad adicionada.

Tabla 5.37: Resultados para la determinación de fenol en muestras reales con el método de referencia.

La determinación de fenol con el método de referencia sirvió para hacer constar las ventajas y la eficacia del método propuesto, ya que, para el análisis de una única muestra era necesario un proceso de destilación que consumía un elevado tiempo y si se quería conseguir una sensibilidad de alrededor de las ppb se requería realizar una extracción con cloroformo. Mientras que con el método propuesto no se necesitaba un pretratamiento de la muestra, debido a que en medio ácido las aminas aromáticas se ionizaban y no eran adsorbidas en el reactor eliminando de esta forma su interferencia, y tampoco se necesitaba un proceso de extracción con cloroformo para aumentar la sensibilidad del método.

Por tanto, se puede afirmar que con el nuevo método F.I.A. se automatizan numerosos procesos en los que interviene el operador, proporcionando una mayor reproducibilidad al minimizar la influencia del factor humano. Además, se reduce el tiempo necesario de análisis, así como el consumo de reactivos altamente contaminantes.

5.7. CONCLUSIONES

Se propone un método F.I.A. que permite la determinación de fenol en aguas tras un proceso de preconcentración-separación y la oxidación quimioluminiscente del analito. La emisión quimioluminiscente se exalta con el sensibilizador ácido fórmico.

El sistema seleccionado se caracteriza por preconcentrar un volumen de muestra constante (15 ml) controlado por el tiempo de preconcentración y el caudal de paso de la misma a través del reactor. Para conseguir este objetivo el montaje F.I.A. consta de dos válvulas de inyección conectadas, de forma que la primera válvula funciona como conmutador para seleccionar entre dos flujos (muestra y HCl) y en el bucle de muestra de esta segunda se incorpora el reactor en fase sólida de relleno de resina Amberlite XAD-4. El proceso de preconcentración-separación de la muestra requiere de una etapa de acondicionamiento del reactor en medio ácido (HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a un caudal de $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) durante 5 minutos, una etapa de preconcentración del analito durante 5 minutos circulando constantemente a un caudal de $3.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ la muestra a través del reactor, un lavado de la columna de dos minutos con (HCl $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a un caudal de $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) y finalmente la etapa de elución del fenol en medio básico (NaOH $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a un caudal de $1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) durante un periodo de tiempo de 2 minutos.

Posteriormente, el fenol eluído confluye en un reactor de 1.0 m a 80°C con la disolución de ácido fórmico $0.75 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $2.20 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ que circula a un caudal de $5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Por un quinto canal se introduce a un caudal de $5.4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ una disolución de KMnO_4 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $2.5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, que se conduce hacia un reactor de 1.0 m a 80°C . Las disoluciones de sendos reactores confluyen en una pieza en forma de T que se encuentra a la entrada de la celda en espiral y se detecta la señal quimioluminiscente del producto de reacción formado.

El método propuesto presenta una gran *selectividad* sin necesidad de realizar un pretratamiento de la muestra, que queda patente considerando el número de sustancias ensayadas que no interfieren en la determinación del analito. A este respecto, cabe resaltar que tanto el método oficial de análisis³¹⁰ como algunos métodos cromatográficos^{322,323} desarrollados, requieren de un pretratamiento de la muestra que suele ser costoso, complejo y consumen gran cantidad de tiempo.

Presenta un intervalo de linealidad comprendido entre 1.0 y 20.0 ppb y un excelente límite de detección (1.0 ppb) acorde con la concentración máxima admisible de fenol, establecida en la legislación para las aguas potables de consumo público³⁰⁸ y con los límites de vertido fijados para las aguas residuales³⁰⁶.

La velocidad de muestreo (4 h^{-1}) resulta adecuada si se compara con el tiempo necesario para analizar una única muestra por el método normalizado³¹⁰, en la que se requiere una destilación previa y una extracción con cloroformo si se quiere alcanzar sensibilidades en torno a las ppb. Posee, además, una adecuada repetitividad entre muestras ($\text{dsr} = 7.3\%$, $n=15$, 20.0 ppb) y una reproducibilidad aceptable entre días empleando disoluciones recién preparadas ($\text{dsr}_{\text{pendiente}} = 9.5\%$, $n=5$).

Por último destacar que dada la selectividad del sistema analítico, el método se aplicó con éxito a la determinación de fenol en aguas residuales y superficiales.

Capítulo sexto

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO TÁNICO POR
QUIMIO-LUMINISCENCIA DIRECTA

INTRODUCCIÓN

6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ÁCIDO TÁNICO

6.1.1. Descripción y propiedades físicas

El ácido tánico es un polifenol natural que abunda en los vegetales, disuelto en la savia celular. Se encuentra especialmente en las hojas, en los frutos inmaduros y en la corteza de los árboles, sobretodo en el roble, zumaque y mirobalano. Las agallas del roble y la corteza de zumaque son las mejores materias para su obtención, aunque también se utilizan las hojas del nogal, los frutos y hojas del arándano y las hojas del frambueso y zarza. Es de destacar que las agallas de las nueces chinas o turcas contienen un 50% y 70% de ácido tánico.

El ácido tánico comercializado contiene aproximadamente un 10% de agua y la fórmula empírica corresponde a $C_{76}H_{52}O_{46}$ con un peso molecular de $1700 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. También se conoce a este compuesto como tanino, galotanino, ácido galotánico e incorrectamente ácido digálico³²⁵. En la Figura 6.1 se muestra la estructura molecular del galotanino.

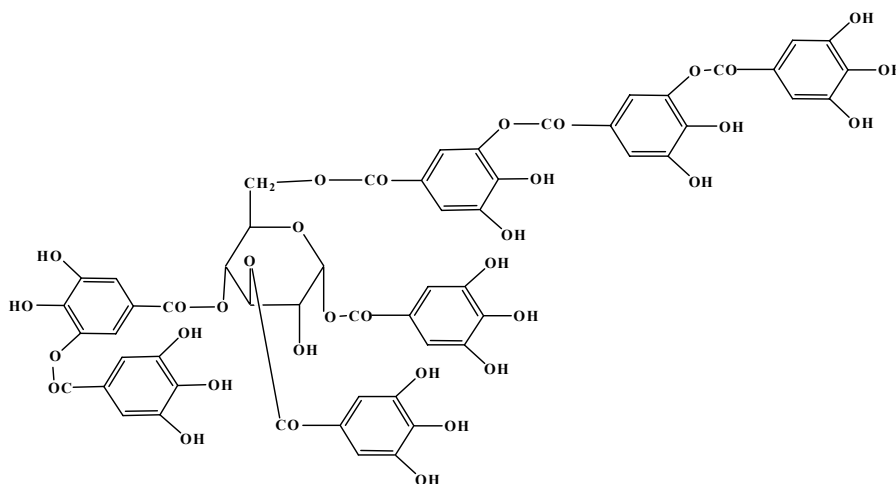


Figura 6.1: Estructura molecular del galotanino.

El ácido tánico es un compuesto orgánico que funciona como un ácido diprótico, de composición química aún no definida³²⁴, pero probablemente esté formado por varias moléculas de ácido gálico y una de glucosa.

Se presenta en forma de polvo amorfo, esponjoso, con tendencia a descorcharse, de color blanco amarillento o pardo claro, con olor característico y sabor astringente o ligeramente amargo, que se oscurece gradualmente en presencia de luz y aire. Es soluble en agua (1 g en 0.35 ml de agua), en glicerol caliente (1 g en 1 ml de glicerol caliente) y muy soluble en acetona, en disoluciones alcohólicas y prácticamente insoluble en benceno, cloroformo, éter, éter de petróleo y tetracloruro de carbono. Además, a temperaturas en torno a 210-215°C³²⁵ se descompone en pirogalol y dióxido de carbono.

El término tanino fue introducido por Seguil³²⁶ en 1796, para definir a aquellas sustancias vegetales naturales con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 mg·l⁻¹, que poseen una gran cantidad de hidróxidos fenólicos libres y que permiten la formación de complejos estables con proteínas y otros biopolímeros como la celulosa y la pectina. Estos taninos pueden dividirse químicamente en dos grupos distintos; *taninos hidrolizables* como el ácido tánico y no hidrolizables o *taninos condensados*.

a) Los táninos hidrolizables están formados por varias moléculas de ácido fenólico (ácido gálico, digálico, trigálico, ácido elágico) que se unen por un enlace éster a un núcleo central de glucosa.

b) Los taninos condensados, comúnmente llamados proantocianidinas, son polímeros naturales compuestos por unidades de flavan-3-ol³²⁷, más resistentes a la ruptura que los taninos hidrolizables. Las estructuras más comunes de este tipo de taninos son las catequinas y epicatequinas.

6.1.2. Estabilidad y degradación

El ácido tánico es estable en forma de polvo y debe conservarse a temperatura ambiente en un recipiente hermético y protegido de la luz. Los taninos hidrolizables como el ácido tánico, son bastante inestables en disolución³²⁸ pero poseen la suficiente estabilidad para poder medir sus variables químicas o físicas, así como su actividad biológica in vitro. En disolución acuosa se descomponen lentamente en presencia de aire y de luz, siendo la mayoría de ellos más estable en disoluciones orgánicas.

La estabilidad de estos taninos está íntimamente relacionada con la estructura individual de cada uno y lo fuertemente unidos que estén cada uno de los monómeros. En cuanto al ácido tánico se sabe que se hidroliza fácilmente con ácidos, bases y enzimas específicas como la tanasa, para descomponerse en ácido gálico y glucosa; en el ser humano el ácido tánico se absorbe por la piel o las mucosas dañadas para metabolizarse en el intestino en glucosa y ácido gálico³²⁹.

6.1.3. Aplicaciones del ácido tánico

El ácido tánico se utiliza en alimentación, en la industria, en medicina y en química como reactivo analítico.

a) En alimentación, originan el característico sabor astringente del vino tinto, el té, el café y el cacao, debido a la precipitación del mismo con ciertas proteínas y mucopolisacáridos de la saliva que poseen normalmente propiedades lubricantes. La capacidad de precipitación del ácido tánico con ciertas proteínas como la gelatina o resinas sintéticas como la poliamidas, es utilizada para clarificar o eliminar los sólidos suspendidos en vinos o cerveza³³⁰.

b) En la industria, se utiliza desde la antigüedad para el curtido de pieles al ser capaz de combinarse con proteínas de la piel natural, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero; en la fabricación de tintas al reaccionar con sales férricas, las cuales dan lugar a productos negro-azulados adecuados para tintes; como mordiente para la aplicación de tintes en tejidos; como coagulante de gomas; apresto para papeles o sedas y para la fabricación de ácido gálico y pirogálico.

c) En medicina, se prescribe como hemostático, astringente³²⁹ de la piel y de las mucosas, debido a que tiene la propiedad de precipitar o unirse con las proteínas como la albúmina de las mucosas y de los tejidos dañados, para crear una capa aislante y protectora, que reduce la irritación y el dolor. En solución se emplean para el tratamiento de las quemaduras, para la prevención de úlceras de decúbito y grietas de los pezones de las mujeres lactantes, así como para el tratamiento de la seborrea del cuero cabelludo. En pomadas o supositorios se usan como antihemorroidales. Por vía oral se administra como antidiarreico y como antídoto para la intoxicación con metales pesados o alcaloides vegetales. Además, el ácido tánico se puede adicionar a los enemas de sulfato de bario para mejorar la calidad de las imágenes radiológicas del colon.

d) En química, es utilizado como reactivo analítico debido a la capacidad del ácido tánico para reaccionar con metales pesados y sustancias orgánicas. Algunos autores como Bosch Serrat³³¹ y Zhang³³² describen un método que permite determinar vanadio y cromo en agua utilizando el ácido tánico como agente complejante, mientras que otros como Sastry y col.³³³ desarrollan un método colorimétrico basado en la precipitación del ácido tánico con la aminoquinolina (antimalárico).

6.2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN

Existen numerosos métodos analíticos para la determinación de ácido tánico en plantas, alimentos, aguas y bebidas alcohólicas, que implican reacciones de complejación o de precipitación con metales pesados o con proteínas, valoraciones redox, así como la formación de productos coloreados cuyas absorbancias se miden entre 500 y 750 nm.

6.2.1. Métodos volumétricos

Debido al carácter reductor del ácido tánico Celeste y col.³³⁴ proponen una volumetría termométrica para la determinación del mismo en vino, empleando como oxidantes el $K_3Fe(CN)_6$ y $Ce(SO_4)_2$. También se ha descrito el método volumétrico de Löwenthal³³⁵ para la determinación de compuestos polifenólicos como el ácido tánico, utilizando como valorante el permanganato potásico e indicador el carmín de índigo.

Rao y col.³³⁶ determinan el ácido tánico en muestras comerciales de té mediante una valoración por retroceso con Fe(II) de la cantidad de Ce(IV) que no ha reaccionado con el analito, utilizando como indicador la ferroina. Para ello, el té se extrae con agua hirviendo durante 30 minutos, posteriormente se filtra, se enfría y se diluye (disolución I). Una alícuota se mezcla con una disolución de gelatina, diluyéndose con NaCl en medio ácido y agitando con kaolín durante 15 minutos para posteriormente filtrar. La disolución I (contiene taninos) y el filtrado (contiene ácido tánico), se mezclan con un exceso de Ce(IV) y tras un tiempo de reacción de 45 minutos, la cantidad de Ce(IV) que no ha reaccionado se valora con el Fe(II).

6.2.2. Métodos espectrofotométricos

Valdés y col.³³⁷ describen un método analítico para la cuantificación de taninos y ácido tánico en el extracto acuoso de romerillo con propiedades antiulcerosas, procedente de la *L. Bidens Pilosa* mediante espectrofotometría ultravioleta-visible, donde las absorbancias de las muestras se miden a 700 nm.

Brune y col.³³⁸ desarrollan un método para la determinación de ácido tánico unido al hierro por espectrofotometría, en muestras de comida seca. El ácido tánico se extrae de la muestra con DMF y tampón acetato 0.1 M pH (4.4) agitando durante 16 horas con una máquina agitadora. Del filtrado obtenido se toma una porción de 2 ml y se trata con una mezcla de urea, tampón acetato 0.1 M, goma arábiga y sulfato férrico amónico, midiendo finalmente las absorbancias del complejo formado a 578 y 680 nm.

El ácido tánico se ha determinado espectrofotométricamente³³⁹ a 600 nm en muestras de té, a las que se les adicionó, después de ser diluidas con 15 ml de una solución tampón a pH 3, 2 ml de metol 0.2% y 3 ml de $K_2Cr_2O_7$ 5 mM. El intervalo de linealidad obtenido para 25 ml de la disolución resultante fue de 100 a 450 μg .

En el método descrito por Amin³⁴⁰ determina el ácido tánico en té con el azul de tetrazolio. Para ello, el té se hierve con 100 ml de agua durante 1 hora, se enfría y se filtra y el filtrado se diluye hasta 1 litro con agua. De la disolución resultante se pipetea 1.5 ml que se mezclan con 0.5 ml de azul de tetrazolio y 0.5 ml de NaOH 0.2 M. A continuación, la mezcla se diluye hasta 10 ml con etanol y se calienta en un baño de agua a 90°C durante 15 minutos. Después de enfriar se adicionan nuevamente 10 ml de etanol y se mide la absorbancia de la disolución resultante a 527 nm. El intervalo de linealidad se establece entre 0.2 y 9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Otros autores^{341,342} proponen un método espectrofotométrico que permite la determinación de ácido tánico en hojas de roble y en el ruibarbo, mediante la detección del complejo formado entre el ácido tánico y proteínas como la caseína o la albúmina.

Box³⁴³ describe un método analítico para la determinación de compuestos polifenólicos como el ácido tánico en aguas naturales, mediante el uso del fenol Folin-Ciocalteu como reactivo, que resulta ser más efectivo que la 4-aminoantipirina. Las gráficas de calibrado resultan ser lineales por encima de 1 ppm.

La AOAC³⁴⁴ propone un método espectrofotométrico conocido como Folin-Ciocalteu o (Folin-Denis) para la cuantificación de taninos en vino o bebidas alcohólicas. Este método se basa en la oxidación de los polifenoles por el sistema $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ácido fosfomolibdico y H_3PO_4 y la posterior determinación colorimétrica a 760 nm del color azul producido, transcurridos 30 minutos.

6.2.3. Análisis por espectroscopía de absorción atómica

El ácido tánico ha sido determinado en muestras de té por espectroscopia de absorción atómica³⁴⁵, al hacer reaccionar la solución acuosa que contiene el ácido tánico con una disolución precipitante de Cu^{+2} 200 ng/ml y acetato amónico 0.1 M. La longitud de onda a la que se determinó el ácido tánico fue 324.7 nm y el intervalo de linealidad de medida estuvo comprendido entre 1-40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

6.2.4. Técnicas de separación

a) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Verzele y col.³⁴⁶ describen un método para el análisis cuantitativo de cuatro ácidos tánicos de diversa procedencia, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase normal o inversa, con el ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico como patrón interno y detección a 280 nm. Siendo necesaria una purificación previa de la preparación comercial mediante el uso de una columna de intercambio aniónico, para separar trazas de ácido gálico, digálico e incluso trigálico que puedan estar presentes en las preparaciones comerciales. Estos mismos autores³⁴⁷ utilizan la cromatografía líquida, para la determinación de pequeñas concentraciones de ácido gálico, digálico y trigálico presentes en cuatro tipos de ácido tánico de diferente origen.

Se ha desarrollado un método³⁴⁸ por HPLC en fase inversa con detección electroquímica, para la cuantificación e identificación de 36 compuestos fenólicos como el ácido tánico, en bebidas alcohólicas, zumo de frutas y extractos de plantas, sin necesidad de requerir una extracción, purificación o preconcentración previa de la muestra, pese a la complejidad de la matriz.

Zhu y col.³⁴⁹ proponen un método para la determinación de ácido tánico y otros metabolitos fenólicos como el ácido gálico y el pirogalol, en fluidos biológicos extraídos con acetato de etilo en medio ácido, mediante una columna Bondapak C-18, metanol-ácido fosfórico como fase móvil y detección a 254, 260, 280 nm.

Algunos autores³⁵⁰ describen un método para el análisis de ácido tartárico, málico, láctico, acético y tánico en vino mediante HPLC, donde la muestra filtrada es insertada en una columna RP-18 (25 cm y 4.6 mm) y eluída con una corriente de agua-metanol-ácido fosfórico (69:1:30), para ser detectada a una longitud de onda de 210 nm.

b) Capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina se ha empleado para la determinación de diversos polifenoles³⁵¹ (como ácido tánico, hidroquinona, resorcinol, catecol, etc.) en muestras sintéticas. Con este fin se emplea como fase estacionaria la sílica gel y como fase móvil cloroformo-acetato de etilo-ácido acético (50:50:1) y detección mediante reactivos como, el cloruro férrico y vapor de yodo entre otros.

c) Electroforesis capilar

Mediante electroforesis capilar en 100 mM de tampón borato a pH 10.5 Honda y col.³⁵² han conseguido separar con éxito de un extracto metanólico de *Paeonia radix*, el ácido tánico y gálico, utilizando como patrón interno el ácido 3,4-dimetoxicinámico y detección en el UV a 254 nm.

Harm y col.³⁵³ describen otro procedimiento para la determinación de diversos polifenoles en café, en el té verde y negro mediante electroforesis capilar, donde las muestras se inyectan electrocinéticamente en un capilar de 24 cm de longitud y 25 µm de diámetro interno durante 6 segundos a 8 KV, utilizando el tampón borato-HCl pH 8.5 a 12 KV como disolución reguladora. Finalmente los solutos migrados se detectan en un intervalo de 200-360 nm y 360-700 nm.

6.2.5. Métodos electroquímicos

Cruz y col.³⁵⁴ estudian la capacidad del ácido tánico para formar complejos con metales pesados como el Cu(II), Pb(II), Cd(II), Zn(II) mediante voltametría. Gracias a este estudio se demuestra que la afinidad del ácido tánico frente a estos metales pesados crece en el siguiente orden Cd(II)<Zn(II)<Pb(II).

Kilmartin y col.³⁵⁵ proponen un método por voltametría cíclica con un electrodo de carbono vítreo frente a un electrodo de Ag/AgCl, que permite caracterizar las propiedades antioxidantes de algunos compuestos polifenólicos (como el ácido cafeico, ácido gálico, ácido tánico, quercetina, etc.) en muestras de vino.

Cruz y col.³⁵⁶ desarrollan un método por polarografía de pulso diferencial para el estudio de la habilidad del ácido tánico para formar complejos con el Cu(II). El uso de una curva de resolución multivariante permite conocer los perfiles de concentración, la evolución del proceso de complejación-reducción, además de estimar la cantidad de iones cobre que pueden unirse al ácido tánico.

Un biosensor constituido por un electrodo de oxígeno y el *Asperigillus Ustus* inmovilizado en polivinilalcohol es propuesto por Zhao y col.³⁵⁷ para determinar el ácido tánico. La vida media del sensor con un alto rendimiento queda fijada en 2 semanas y permite la cuantificación selectiva del ácido tánico coexistiendo otros taninos.

6.2.6. Identificación visual o cualitativa

El Formulario Español de Farmacia Militar³²⁴ propone un método de identificación debido a la capacidad de las soluciones acuosas de ácido tánico para precipitar con la mayoría de las sales metálicas, alcaloides, albúmina, almidón y gelatina. El ensayo se basa en la aparición de un color azulado en las soluciones de ácido tánico tras la adición de unas gotas de cloruro férrico; en soluciones concentradas se forma un precipitado negro azulado que desaparece por la adición de ácido sulfúrico diluido.

6.2.7. Análisis por inyección en flujo, F.I.A.

Yebra y col.³⁵⁸ han propuesto un método F.I.A. para la determinación indirecta de taninos en vinos y en té por espectrometría de absorción atómica. Para llevar a cabo este análisis, una cantidad conocida de reactivo precipitante (acetato de cobre) es inyectada en una corriente de agua destilada para determinar la cantidad total de cobre adicionado. A continuación, la misma cantidad de reactivo precipitante es inyectada en los patrones o en la muestra y tras la precipitación instantánea, el cobre del filtrado es determinado por espectrofotometría de absorción atómica. De forma que por diferencia entre las absorbancias obtenidas entre el blanco y el cobre no precipitado se puede cuantificar la cantidad de ácido tánico presente. El intervalo de linealidad se establece entre 1 y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y el límite de detección se fija en 0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Sun y col.³⁵⁹ desarrollan un método para la determinación de ácido tánico, basado en la inhibición de la electroquimioluminiscencia producida por el luminol. En medio básico el luminol puede ser excitado aplicando un potencial positivo a los electrodos, para producir una señal electroquimioluminiscente que desaparece después de la inyección del ácido tánico. La reacción quimioluminiscente tiene lugar en los alrededores del electrodo y no son necesarios ni catalizadores ni agentes oxidantes. La determinación del ácido tánico se basa en la medida de la diferencia de intensidad entre la señal inicial correspondiente al luminol y la presentada por la muestra de ácido tánico. El límite de detección se establece en 2.0×10^{-8} M.

Este mismo grupo de investigación ha propuesto un método²²⁴ por quimioluminiscencia para la determinación de ácido tánico en extractos de plantas, debido a la capacidad mostrada por el ácido tánico para inhibir la quimioluminiscencia del sistema luminol- H_2O_2 - Cu^{+2} . En este método el límite de detección es de 9.0×10^{-9} M.

Li y col.³⁶⁰ proponen uno de los trabajos más recientemente publicados para la determinación del ácido tánico en un sistema F.I.A., basado en la habilidad que presenta este analito para incrementar la quimioluminiscencia mostrada por el sistema luminol-KIO₄-Mn⁺² en medio alcalino. El intervalo de linealidad abarca desde 5 a 30 μM con un límite de detección de 9 nM.

Se ha propuesto otro método³⁶¹ para la determinación por espectrofotometría de ácido tánico, mediante la inyección de una disolución de ácido tánico en una disolución portadora de Fe(III) en medio ácido sulfúrico y la posterior reacción con la 1,10-fenantrolina para formar un complejo Fe(III)-fenantrolina, que se detecta espectrofotométricamente a 506 nm. El límite de detección establecido es de 0.84 mg·l⁻¹.

Celeste y col.³⁶² describen un nuevo método de análisis por inyección en flujo que permite la determinación de ácido tánico por espectrofotometría directa, mediante la reacción clásica de los polifenoles con el reactivo de Folin Ciocalteu en medio básico. Este método fue aplicado con éxito a tres muestras de vino (blanco, rosado y tinto), presentando una reproducibilidad del 0.8% y un intervalo de linealidad entre 12.5 y 150 mg·l⁻¹.

EXPERIMENTAL

6.3. ENSAYOS PREVIOS EN FLUJO CONTINUO

Teniendo presente que la intensidad de la señal quimioluminiscente depende del tiempo transcurrido desde el inicio de la reacción⁸², se consideró muy conveniente que los ensayos previos se llevaran a cabo a tiempo fijo y según la relación de los caudales con el sistema en flujo continuo mostrado en la Figura 6.2, ya que la medida del tiempo es mucho más reproducible que en un equipo en estático.

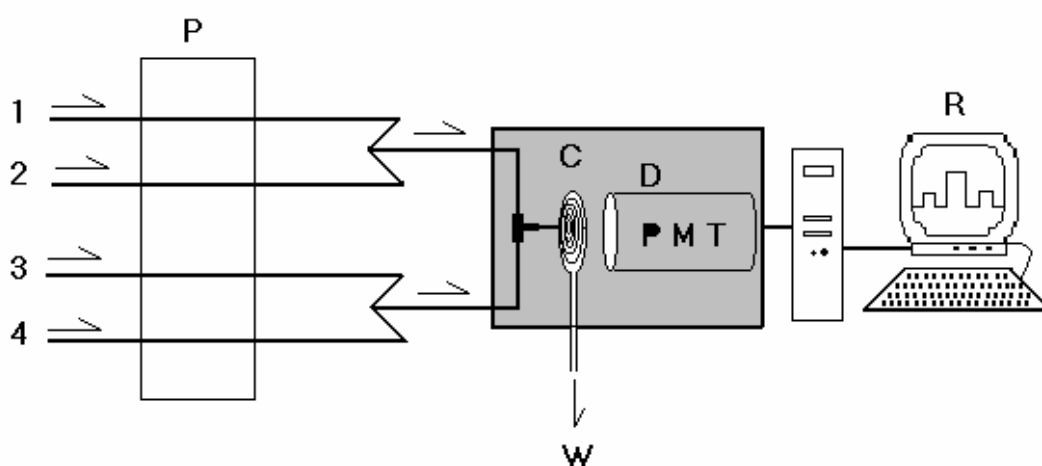


Figura 6.2: Montaje en flujo continuo para los ensayos previos.

Canal 1: Disolución acuosa de ácido tánico (blanco, agua desionizada); **Canal 2 y 3:** Disolución para ajustar el medio de reacción; **Canal 4:** Oxidante; **P:** Bomba peristáltica; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

En todos los casos, la señal analítica se calculó por diferencia entre la que presentaba la muestra y la generada por el blanco (agua desionizada por el canal 1). Dicha señal analítica expresada en kHz es la que aparece en los resultados de cada experiencia.

6.3.1. Estudio del sistema oxidante

Con el propósito de encontrar el sistema oxidante más apropiado para obtener una señal quimioluminiscente a partir del producto de la reacción de oxidación del ácido tánico, se ensayaron diversos oxidantes fuertes tanto en medio ácido como básico. Esta experiencia se realizó en el montaje en flujo descrito en la Figura 6.2, siendo la velocidad de flujo para los cuatro canales $2.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Las condiciones establecidas y los resultados obtenidos en este estudio se encuentran descritos en el apartado 4.3.3 del capítulo cuarto (conectividad molecular aplicada a la predicción de quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles), donde dada la bondad de las predicciones teóricas, se efectuó experimentalmente en el mismo montaje en flujo continuo un barrido con distintos oxidantes, para comprobar la posibilidad de obtener una señal quimioluminiscente a partir del producto de una reacción de oxidación.

En la Tabla 4.3 del capítulo cuarto, se observa que las señales analíticas más elevadas para 200.0 ppm de ácido tánico se obtuvieron con el permanganato potásico $0.02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en medio ácido sulfúrico $1.00 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y con el ferricianuro potásico $0.02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en medio hidróxido sódico $1.00 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

6.3.2. Selección del oxidante

De los resultados expuestos en la Tabla 4.3, se seleccionaron como oxidantes del sistema analítico $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y KMnO_4 . Con el propósito de elegir cuál de los dos era el más adecuado, se decidió estudiar la influencia de la concentración de los mismos y del pH del medio de reacción en la señal analítica.

6.3.2.1. Influencia de la concentración de oxidante

La concentración del oxidante es una variable muy crítica en los sistemas quimioluminiscentes, debido a que en concentraciones excesivamente bajas la señal analítica puede disminuir o incluso desaparecer y a concentraciones elevadas pueden producirse problemas de autoabsorción de la emisión quimioluminiscente por parte del propio oxidante. Por esta razón, se realizó un estudio exhaustivo de la influencia de la concentración del oxidante en el sistema quimioluminiscente con ambos oxidantes.

El intervalo de concentraciones de permanganato potásico a ensayar, fue el mismo que cuando se estudió el comportamiento de los fenoles y polifenoles frente al permanganato potásico en medio ácido (apartado 4.4, capítulo cuarto), concretamente estuvo comprendido entre 1.0×10^{-4} y $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($-\log C=4.0$ a $-\log C=2.0$). En el caso del ferricianuro potásico, se ensayaron 7 concentraciones distintas comprendidas entre 3.0×10^{-3} y $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($-\log C=2.52$ a $-\log C=1.00$). Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 6.3 y 6.4.

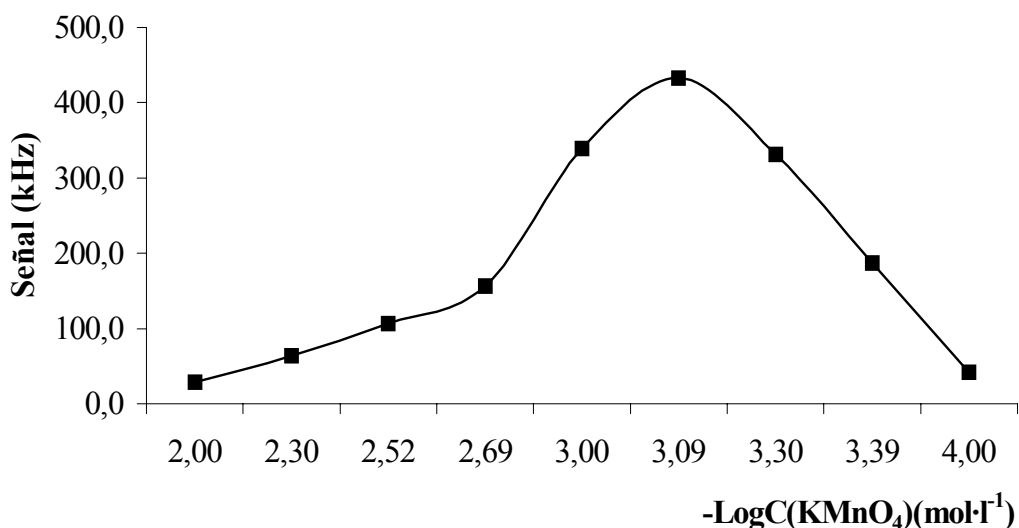


Figura 6.3: Influencia de la concentración de KMnO_4 .

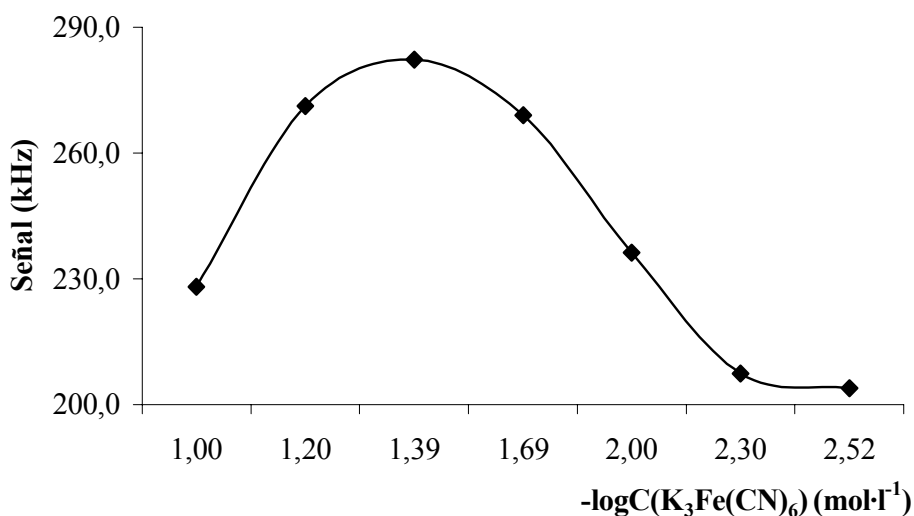


Figura 6.4: Influencia concentración $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

La señal más elevada para una concentración de 100.0 ppm de ácido tánico correspondió a la concentración $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C=3.09$) para el KMnO_4 y $4.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C=1.39$) para el $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Por ello, se seleccionaron como concentraciones óptimas de cada uno de los oxidantes para los estudios posteriores.

6.3.2.2. Influencia del pH del medio de reacción

Como último ensayo para seleccionar el oxidante más adecuado, se estudió la influencia del pH del medio de reacción. Para llevar a cabo este ensayo, se realizaron mediante el montaje en flujo continuo descrito en la Figura 6.2, dos experiencias independientes con cada uno de los oxidantes a la concentración previamente seleccionada.

Con ayuda de un pH-metro, se fueron ajustando potenciométricamente los medios de reacción con $\text{NaOH } 1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y con $\text{HClO}_4 1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, añadiendo gota a gota las cantidades necesarias de ambos reactivos para obtener diferentes pH del

medio de reacción que circulaba por el canal 2 y 3 del montaje en flujo continuo. Con el KMnO_4 ($8.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) se probaron 14 valores de pH y en el caso del $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($4.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) se ensayaron 16 valores de pH, todos ellos comprendidos entre 0.7 y 13.0.

Según los resultados del diagrama intensidad-pH de la Figura 6.5, se observa que la capacidad del permanganato potásico para oxidar al ácido tánico se encontraba favorecida en un medio francamente ácido.

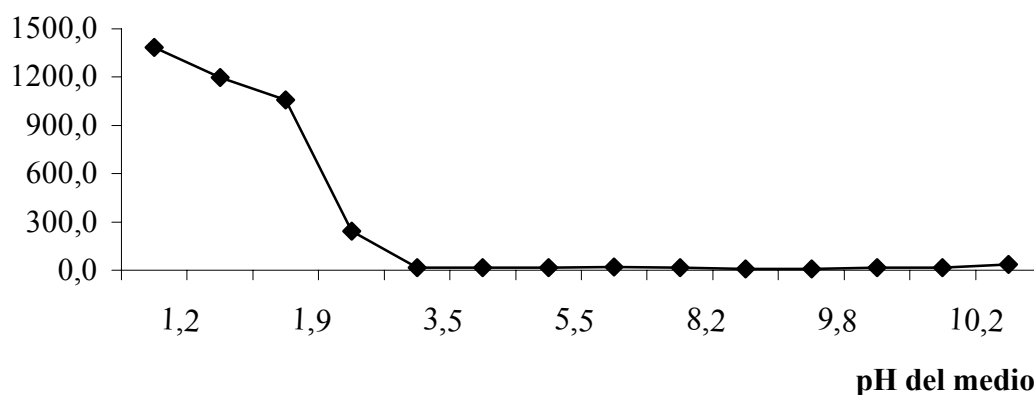


Figura 6.5: Variación del pH del medio de la reacción con el KMnO_4 como oxidante.

Mientras que la fuerza oxidante del ferricianuro potásico aumentaba en medio fuertemente básico, como se muestra en la Figura 6.6.

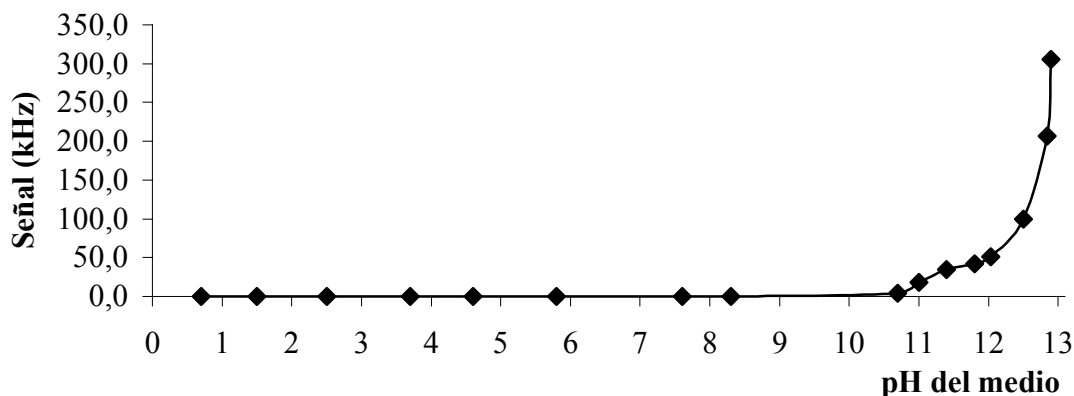


Figura 6.6: Variación del pH del medio con el $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ como oxidante.

Finalmente, según la intensidad de la señal quimioluminiscente (Figuras 6.5 y 6.6) se seleccionó como oxidante del nuevo sistema analítico para la determinación de ácido tánico, el KMnO_4 a la concentración de $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, debido a que para una misma concentración de 100.0 ppm de analito las señales analíticas obtenidas con el permanganato potásico, eran 4.5 veces superior respecto a las alcanzadas con el $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

6.3.3. Estudio de la influencia de la naturaleza del medio

Teniendo presente que la señal quimioluminiscente se producía en un medio ácido, en el montaje descrito para los ensayos previos se estudió la influencia de la naturaleza del medio en la reacción de oxidación. Con este objetivo se estudiaron los siguientes ácidos: H_2SO_4 , HNO_3 , HClO_4 , H_3PO_4 y HCl todos ellos a la misma concentración $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y circulando por los canales 2 y 3 de la Figura 6.2. Este ensayo se realizó empleando una disolución acuosa de ácido tánico 100.0 ppm. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 6.7.

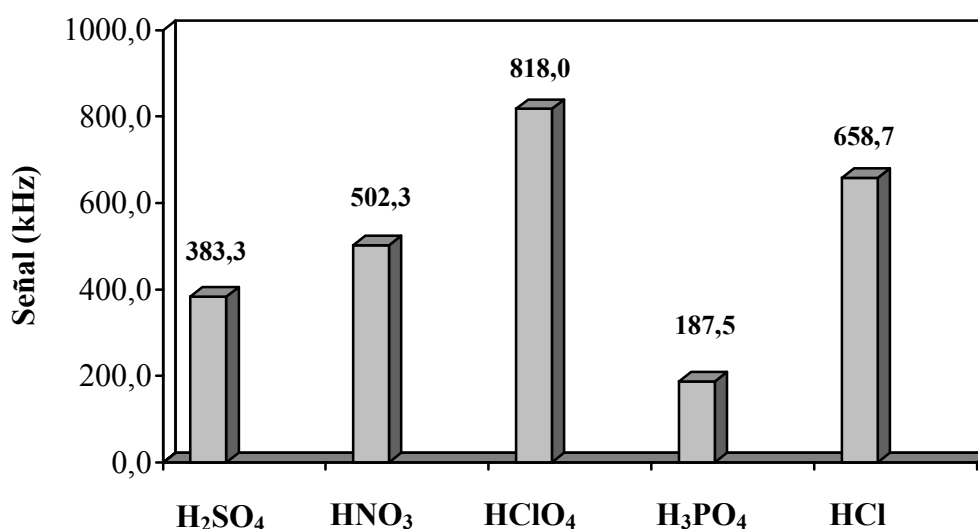


Figura 6.7: Influencia de la naturaleza del medio ácido.

Con todos los medios se obtenían señales analíticas considerables salvo con el ácido fosfórico que el valor alcanzado era menor, aún así se decidió estudiar la influencia de la variación de la concentración de cada uno de los medios en la reacción quimioluminiscente.

Para realizar este estudio se ensayaron 8 concentraciones distintas para cada uno de los medios comprendidas entre 3.0×10^{-2} y $2.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, empleándose una disolución acuosa de ácido tánico de 100.0 ppm. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 6.8.

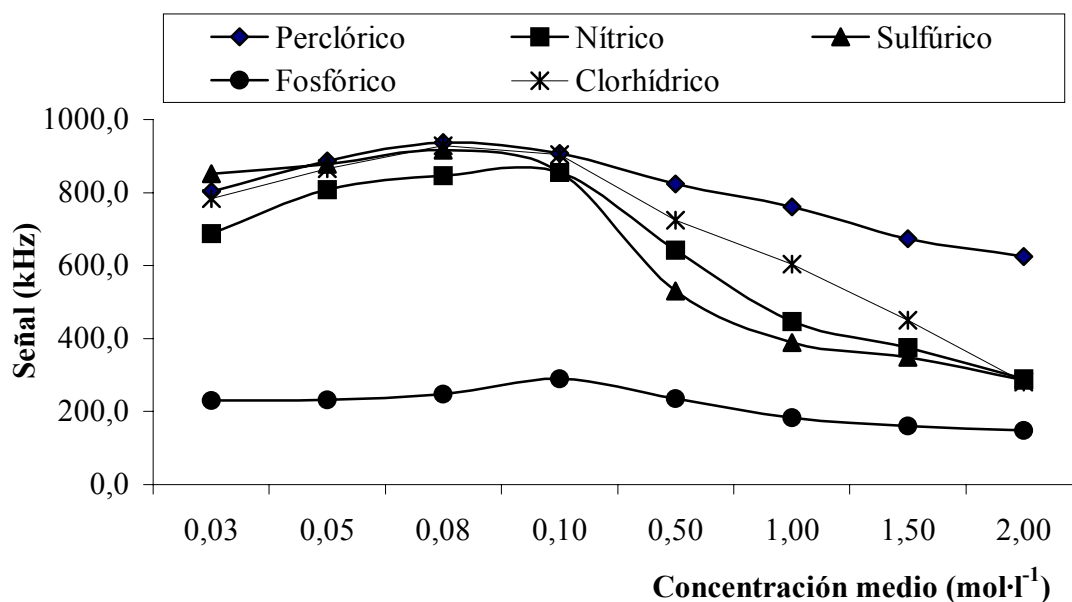


Figura 6.8: Variación de la acidez en un intervalo de concentraciones comprendido entre 3.0×10^{-2} y $2.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Como se observa en la Figura 6.8, todos los ácidos se comportaban de manera muy similar sobre todo desde 5.0×10^{-2} a $5 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, únicamente se diferenciaba del resto el H_3PO_4 , donde las señales obtenidas para una misma concentración de analito 100.0 ppm eran claramente menores.

Posteriormente, se decidió variar nuevamente las concentraciones de los medios salvo para el H_3PO_4 , puesto que la señal quimioluminiscente era inferior.

Para esta experiencia se estudiaron 5 concentraciones distintas de cada uno de los ácidos comprendidas entre 3.0×10^{-2} y $5.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, empleándose una disolución acuosa de ácido tánico de 100.0 ppm. Los resultados quedan reflejados en la Figura 6.9.

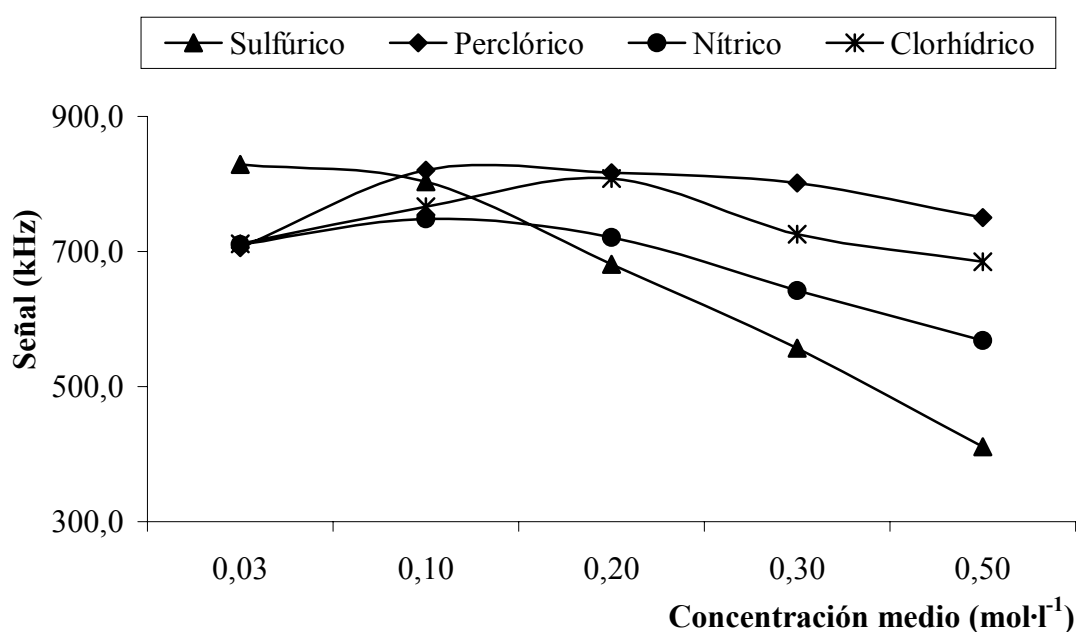


Figura 6.9: Variación de la acidez en un intervalo de concentraciones comprendido entre 3.0×10^{-2} y $5.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Al igual que anteriormente, se observó un comportamiento muy similar para todos los medios, obteniéndose señales analíticas más elevadas con concentraciones inferiores de los ácidos.

A continuación, se realizó un tercer estudio con el fin de poder seleccionar el medio de reacción adecuado para el desarrollo del nuevo sistema quimioluminiscente.

Para esta tercera experiencia se ensayaron 5 concentraciones distintas de cada uno de los ácidos comprendidas entre 5.0×10^{-3} y $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, empleándose al igual que en los casos anteriores una disolución acuosa de ácido tánico de 100.0 ppm. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 6.10.

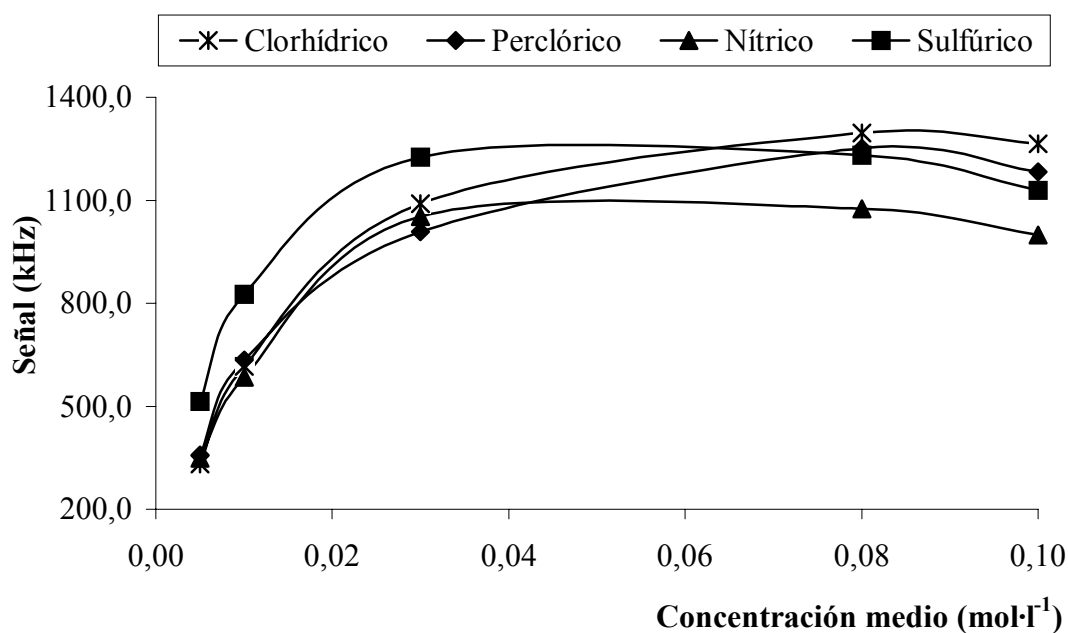


Figura 6.10: Variación de la acidez en un intervalo de concentraciones comprendido entre 5.0×10^{-3} y $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

A partir de los resultados de la Figura 6.10 fue difícil seleccionar el medio de reacción, debido a que con todos los ácidos excepto con el HNO_3 las señales analíticas alcanzaban valores muy próximos, con un máximo a una concentración $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Finalmente, de los cinco medios de reacción estudiados se descartaron el H_3PO_4 y el HNO_3 (Figuras 6.8 y 6.10) y para el estudio de las siguientes variables se preseleccionaron el H_2SO_4 , HCl , HClO_4 a una concentración $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

6.3.4. Influencia de la temperatura

Para el estudio la influencia de la temperatura en la emisión quimioluminiscente, se sumergieron 2.0 metros de PTFE en un baño de agua termostataado a la salida de cada una de las confluencias de los canales 1-2 y 3-4, correspondientes al montaje en flujo continuo descrito en la Figura 6.2.

Las temperaturas ensayadas fueron: 24.0°C (ambiente), 40.0°C, 60.0°C, 80.0°C, sin aumentar más la temperatura para evitar el posible desprendimiento de burbujas, por estar el sistema a temperaturas próximas a la de ebullición.

Con cada una de las temperaturas y con los tres medios (H₂SO₄, HCl, HClO₄) a la concentración anteriormente seleccionada, se obtuvo un calibrado de ácido tánico (n=3).

Medio	Temperatura (°C)	Pendiente	Ordenada en origen	r ²
HClO ₄	24.0	12.17	-227.55	0.9924
	40.0	16.64	-355.00	0.9826
	60.0	12.00	-133.50	0.9982
	80.0	9.38	-55.71	0.9722
H ₂ SO ₄	24.0	10.55	-202.00	0.9956
	40.0	15.83	-374.50	0.9791
	60.0	14.48	-219.50	1.0000
	80.0	13.15	-154.50	0.9991
HCl	24.0	12.00	226.00	0.9931
	40.0	13.69	-275.00	0.9875
	60.0	11.98	-129.50	0.9970
	80.0	7.94	-2.10	0.9289

Tabla 6.1: Influencia de la temperatura.

Como se observa en la Tabla 6.1, ninguno de los ácidos mostraba un excesivo incremento de la pendiente a temperaturas más elevadas, por esta razón se decidió continuar trabajando a temperatura ambiente y estudiar la influencia de esta variable posteriormente.

Terminado el proceso de preoptimización en el sistema en flujo continuo, la composición del mismo fue la siguiente:

Canal	Disoluciones	Caudal (ml·min⁻¹)
1	Disolución acuosa de ácido tánico	2.8
2	Medios de reacción: HClO₄/ H₂SO₄ /HCl 0.08 mol·l⁻¹	2.8
3	Medios de reacción: HClO₄/ H₂SO₄ /HCl 0.08 mol·l⁻¹	2.8
4	KMnO ₄ 8.00x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	2.8

Tabla 6.2: Composición final del sistema en flujo continuo.

6.4. ENSAYOS EN UN SISTEMA F.I.A.

6.4.1. Pruebas preliminares en un sistema F.I.A.

En primer lugar se diseñó un montaje F.I.A. lo más parecido posible al sistema en flujo continuo descrito en la Figura 6.2, de manera que en la celda de flujo se mantuviesen las concentraciones finales de los reactivos optimizadas en la ensayos previos.

El sistema F.I.A. constaba de 5 canales que con las dos confluencias se reducían a tres, donde la muestra y el medio confluían antes de ser insertados en el portador. El montaje por inyección en flujo empleado se muestra en la Figura 6.11.

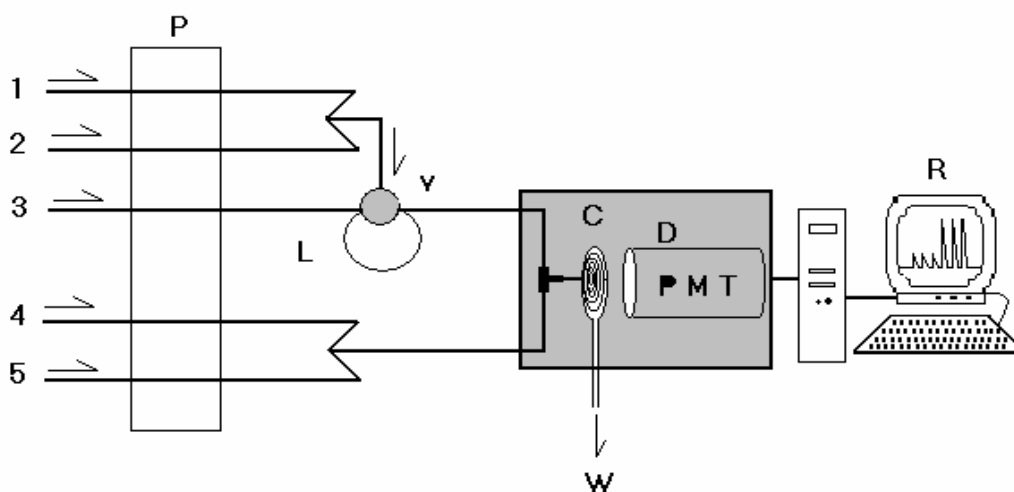


Figura 6.11: Montaje para los estudios previos en el sistema F.I.A.

Canal 1: Disolución acuosa de ácido tánico; **Canal 2:** Medio de reacción que confluye con la muestra; **Canal 3:** Portador; **Canal 4:** Medio de reacción que confluye con el oxidante; **Canal 5:** Oxidante; **P:** Bomba peristáltica; **V:** Válvula de inyección; **L:** Bucle de muestra (volumen de muestra 441.35 μl); **C:** Celda de flujo en espiral; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados; **W:** Desecho.

6.4.1.1. Estudio de la naturaleza del medio de reacción y del portador

Este ensayo se llevo a cabo con dos propósitos: el primero de ellos consistía en seleccionar definitivamente entre los posibles medios (H_2SO_4 , HCl y HClO_4) el más adecuado para el desarrollo del nuevo sistema analítico y el segundo era estudiar la naturaleza del portador.

Mediante el montaje de la Figura 6.11 y manteniendo constantes todas las variables descritas en la Tabla 6.2, se hicieron confluir por el canal 2 y 4 cada uno de los medios con la muestra antes de ser insertada en el portador y con el oxidante. Además, se ensayaron dos clases de portador: agua desionizada o la propia disolución utilizada para ajustar el medio de reacción.

Con cada uno de los medios se realizaron dos calibrados de ácido tánico entre 5.0 y 100.0 ppm; uno utilizando agua desionizada y otro el propio medio como portadores.

Medio	Portador	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
HClO ₄	H ₂ O	1.520	-16.449	0.9745
	HClO ₄	1.434	-15.666	0.9758
H ₂ SO ₄	H ₂ O	1.346	-16.891	0.9589
	H ₂ SO ₄	1.294	-16.178	0.9574
HCl	H ₂ O	1.433	-14.520	0.9825
	HCl	1.471	-16.059	0.9761

Tabla 6.3: Resultados de los calibrados con distintos medios y portadores.

Como se observa en la Tabla 6.3, las diferencias en cuanto a las pendientes expresadas en ppm⁻¹ eran importantes pero no críticas. El valor más alto obtenido (1.5203 ppm⁻¹), correspondió al medio HClO₄ usando agua desionizada como portador y el menor (1.2944 ppm⁻¹), se observó cuando el H₂SO₄ actuaba simultáneamente como medio de la reacción y portador. Finalmente, se seleccionó como medio para el desarrollo del nuevo sistema quimioluminiscente el HClO₄ 8.0x 10⁻² mol·l⁻¹ y como portador el agua desionizada.

Terminado el proceso de preoptimización del sistema F.I.A. la composición del mismo fue la siguiente:

Canal	Disoluciones	Caudal (ml·min ⁻¹)
1	Disolución acuosa de ácido tánico	2.8
2	HClO ₄ 0.08 mol·l ⁻¹	2.8
3	Portador (agua)	2.8
4	HClO ₄ 0.08 mol·l ⁻¹	2.8
5	KMnO ₄ 8.00x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	2.8

Tabla 6.4: Composición del sistema F.I.A. preliminar.

6.4.2. Optimización de las variables F.I.A.

Con los resultados de la preoptimización de las variables químicas y con el montaje de la Figura 6.11, se pasó a optimizar las variables F.I.A. Esta optimización se llevó a cabo mediante el método multivariante *Simplex Modificado*.

Las variables del sistema F.I.A. que se incluyeron en el simplex, fueron: volumen de ácido tánico insertado (V), caudal de portador que circulaba por el canal 3 (Q_1), caudal de medio de reacción que fluía por el canal 4 y del oxidante que circulaba por el canal 5 (Q_2).

Otra posible variable sería la distancia entre la válvula de inyección y la celda del detector, pero como el portador era agua y no existía reacción entre el analito, no era necesario un camino de reacción, por esta razón, esta distancia se fijó en 50.0 cm, correspondiente a la mínima longitud para la conexión, evitando en la medida de lo posible la dispersión de la muestra.

Durante todo el ensayo se mantuvieron constantes las variables químicas optimizadas anteriormente, descritas en Tabla 6.4. Los intervalos de cada variable fijados para el primer simplex se recogen en la Tabla 6.5.

Variable	Intervalo estudiado
Q_1 (ml·min ⁻¹)	0.5-4.0
Q_2 (ml·min ⁻¹)	0.5-4.0
V (μl)	109.6-1114.9

Tabla 6.5: Intervalo estudiados para cada variable en el primer simplex.

En la Tabla 6.6, se muestran los resultados del primer simplex junto con las señales y las desviaciones estándar relativas obtenidas para cada vértice, tomadas como la señal media de 10 picos F.I.A. para 100.0 ppm de ácido tánico. Con este primer simplex se obtuvieron 16 vértices no nulos, entendiéndose como vértice nulo cuando el programa proporciona algún parámetro con un valor fuera de los límites establecidos.

Vértice	Q ₁ (ml·min ⁻¹)	Q ₂ (ml·min ⁻¹)	V (μl)	Señal (kHz)	dsr(%)
1	0.5	0.5	109.6	20.5	3.2
2	3.8	1.4	345.8	351.2	2.2
3	1.4	1.4	1054.6	158.5	3.0
4	1.4	3.8	330.8	31.1	2.1
5	2.2	2.2	582.0	116.6	1.5
6	3.8	3.8	1054.6	247.4	0.2
7	2.1	2.1	556.9	93.4	0.8
8	2.6	1.6	652.5	271.7	1.6
9	2.4	1.7	642.4	268.3	0.4
10	2.6	1.5	682.6	347.0	0.6
11	2.9	0.9	803.3	319.0	1.2
12	2.7	1.3	727.9	445.7	2.2
13	3.0	1.4	572.0	383.7	3.0
14	2.8	1.4	632.4	337.8	2.9
15	3.1	1.3	567.0	464.6	1.2
16	3.7	1.0	496.6	261.0	1.4

Tabla 6.6: Resultados del primer simplex. En negrita se destacan los vértices que mayor emisión quimioluminiscente presentaron.

Según los resultados del primer simplex, se observó que las señales analíticas más elevadas (vértices 12 y 15) se obtenían para un caudal del portador (Q₁) elevado, velocidades de flujo pequeñas para el oxidante y el medio de reacción (Q₂), y volúmenes grandes de ácido tánico insertado (V). Para refinar los resultados, se

decidió realizar un segundo simplex reduciéndose los intervalos de cada variable F.I.A. a la zona donde se habían observado los mejores vértices en el primer simplex. Los nuevos intervalos fijados se muestran en la Tabla 6.7.

Variable	Intervalo estudiado
Q_1 (ml·min ⁻¹)	1.9-4.0
Q_2 (ml·min ⁻¹)	0.5-2.7
V (μl)	360.9-880.0

Tabla 6.7: Intervalos fijados de las variables F.I.A. para el estudio del segundo simplex.

Los resultados de este segundo simplex, junto con las señales quimioluminiscentes y las desviaciones estándar relativas obtenidas para cada vértice tomadas como la señal media de 10 picos F.I.A. para 100.0 ppm de ácido tánico, se pueden observar en la Tabla 6.8. Con este segundo simplex se obtuvieron 9 vértices no nulos.

Vértice	Q_1 (ml·min ⁻¹)	Q_2 (ml·min ⁻¹)	V (μl)	Señal (kHz)	dsr(%)
1	1.9	0.5	360.9	263.0	0.5
2	3.8	1.1	476.6	458.3	1.5
3	2.4	1.1	833.4	545.0	2.9
4	2.4	2.6	476.6	172.5	0.8
5	2.5	1.0	557.0	466.3	0.5
6	2.7	1.2	546.9	549.9	1.8
7	3.0	1.1	617.3	506.4	3.6
8	4.0	1.8	880.0	828.2	0.7
9	2.6	1.0	572.0	512.5	1.0

Tabla 6.8: Resultados del segundo simplex.

Tras este estudio se seleccionó el *vértice* 8, con un caudal de portador de 4.0 ml·min⁻¹, 1.8 ml·min⁻¹ para el oxidante y el medio de reacción que confluye con el mismo y un volumen de muestra insertado de 880 µl, porque de entre todas las combinaciones posibles era el que ofrecía un mejor compromiso entre altura de pico y repetitividad de la señal quimioluminiscente para una serie de 10 picos F.I.A.

6.4.3. Precalibrado

Con los parámetros F.I.A. optimizados y con las variables químicas establecidas anteriormente, se decidió realizar un calibrado de ácido tánico (n=9) entre 1.0 y 100.0 ppm con el fin de seleccionar una concentración adecuada de trabajo, ya que, tras las anteriores optimizaciones la señal inicial se había multiplicado por seis.

En la Figura 6.12 aparece representada la gráfica intensidad-concentración de ácido tánico, a partir de este momento se seleccionó una concentración de 25.0 ppm de ácido tánico para posteriores estudios.

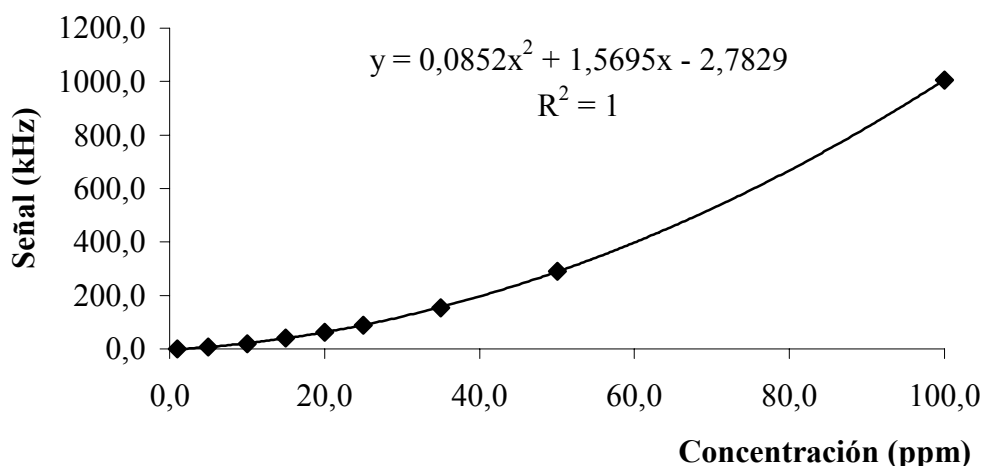


Figura 6.12: Calibrado de ácido tánico entre 1.0 y 100.0 ppm.

6.4.4. Influencia de la presencia de agentes tensoactivos

Los medios organizados (normalmente agentes tensoactivos) pueden aumentar la intensidad de la emisión quimioluminiscente^{189,194,363,364} debido a que protegen el analito y minimizan la pérdida de energía del estado excitado a otras formas distintas a la emisión radiante. Por este motivo, se ensayaron distintos tipos de tensoactivos Triton X-100 (no iónico), sodio dodecilsulfato (SDS) (aniónico), cloruro de hexadecilpiridinio (HD) (catiónico) y β -ciclodextrina que no es un tensoactivo en sentido estricto, pero dadas sus características estructurales puede considerarse que actúa como un medio organizado, capturando solutos en el interior de las asociaciones moleculares anulares que forma en disolución.

Dichos compuestos, se introdujeron en el sistema de la Figura 6.11 por el canal 1 junto con la muestra (25.0 ppm de ácido tánico) y en el canal 2 con el medio de reacción ácido perclórico ($8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), y se ensayaron a una concentración próxima o ligeramente superior a la concentración micelar crítica (c.m.c.)^{320,321}. Cabe destacar que el hexadecilpiridinio no pudo ser ensayado porque precipitaba con el medio de reacción.

Las concentraciones ensayadas fueron: $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ para la β -ciclodextrina, 0.02 % ($0.70 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) para el sodio dodecilsulfato y 0.02 % ($0.30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) para el Triton X-100.

Las señales obtenidas en presencia del tensoactivo se compararon con la señal de referencia, que correspondía a la emisión quimioluminiscente en ausencia del mismo. En la Figura 6.13 quedan reflejados los resultados.

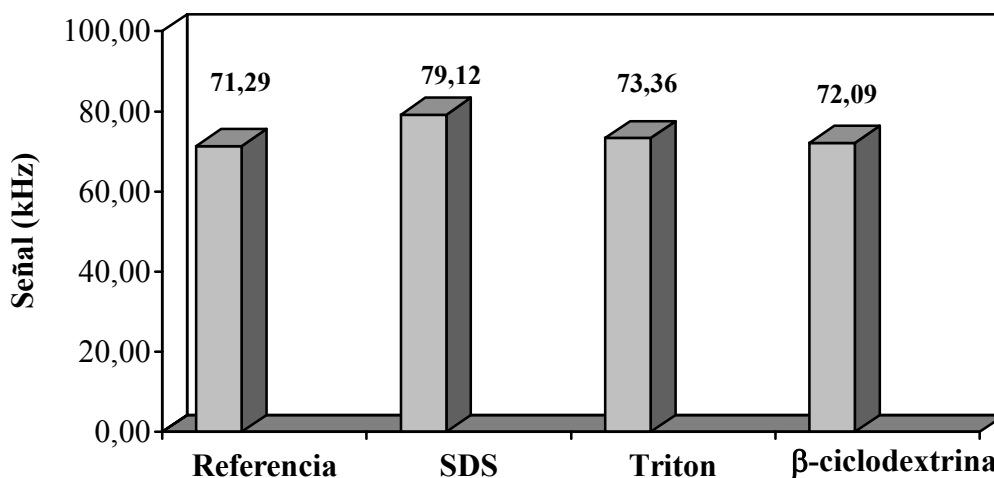


Figura 6.13: Influencia de la presencia de tensoactivos.

Como se observa en la Figura 6.13, con ninguno de ellos se produjo un aumento significativo en la emisión quimioluminiscente, únicamente con el sodio dodecilsulfato se incrementó en un 11% la señal analítica respecto a la de referencia (sin tensoactivo), pero este aumento no compensaba su utilización. Considerando estos hechos, no se incluyeron tensoactivos en el sistema quimioluminiscente.

6.4.5. Influencia de la presencia de sustancias sensibilizadoras

En ciertas reacciones quimioluminiscentes^{152,155,198,365}, se han utilizado compuestos fluoróforos como reactivos para la transferencia de energía, en donde el sensibilizador actúa como aceptor fluorescente responsable de la emisión final, convirtiendo los métodos quimioluminiscentes directos en indirectos.

Las sustancias sensibilizadoras ensayadas fueron: acetona, acetonitrilo, mezcla acetona/acetonitrilo, etanol, dioxano, sulfito sódico, ácido fórmico, sulfato de quinina, 8-hidroxiquinoleína (oxina), dimetilformamida, naranja de acridina, rodamina 6G y rodamina B.

El estudio de la influencia de la presencia de los sensibilizadores se llevó a cabo mediante el montaje de la Figura 6.11, introduciendo el sensibilizador en el canal 1 disuelto con la muestra (25.0 ppm de ácido tánico) y en el canal 2 disuelto con el medio de reacción ácido HClO₄ (8.0x10⁻² mol·l⁻¹). Las rodaminas 6G y B no se pudieron probar, ya que cuando se preparaban junto con el ácido perclórico precipitaban.

Cada uno de ellos se preparó a la concentración indicada en la Tabla 6.9 y se compararon las señales analíticas obtenidas en presencia del sensibilizador con la de referencia, que correspondía a la emisión quimioluminiscente en ausencia del mismo. En la Tabla 6.9 quedan reflejados los resultados obtenidos.

Sensibilizador	Blanco	Señal (kHz)	Señal-Blanco (kHz)
Referencia (sin sensibilizador)	0.0	76.4	76.4
Oxina 5.0x10⁻⁴ mol·l⁻¹	257.0	1030.5	773.5
Acetona 0.5%	0.0	67.1	67.1
Acetona 0.5%/ Acetonitrilo 20.0%	0.0	3.4	3.4
Acetonitrilo 20.0%	0.0	3.6	3.6
Dimetilformamida 5.0%	0.0	57.0	57.0
Dioxano 5.0%	2.1	94.1	92.0
Etanol 20.0%	1.3	178.0	176.7
HCOOH 0.5%	2.4	127.8	125.4
HCOOH 5.0%	5.6	232.0	226.4
Naranja de acridina 5.0x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	33.1	187.2	154.1
Sulfato de quinina 5.0x10⁻⁴ mol·l⁻¹	8.9	299.1	290.2
Sulfito sódico 1.0x10 ⁻³ mol·l ⁻¹	6.4	104.0	97.6

Tabla 6.9: Estudio de la influencia de los sensibilizadores.

Se descartaron aquellos fluoróforos que inhibían la señal quimioluminiscente como: la acetona, acetonitrilo, acetona/acetonitrilo y dimetilformamida, y se seleccionaron los sensibilizadores que incrementaron en más de un 150% la señal

analítica respecto a la de referencia, como la oxina, el ácido fórmico 5.0% y el sulfato de quinina, que aumentaron en un 912.43%, 196.33% y 279.84% respectivamente la emisión quimioluminscente.

Con el fin de seleccionar el sensibilizador más adecuado para el desarrollo del nuevo sistema analítico, se realizó un calibrado de ácido tánico de seis concentraciones comprendidas entre 1.0 y 60.0 ppm con cada uno de los fluoróforos, a la concentración indicada en la Tabla 6.9.

De los tres posibles sensibilizadores se seleccionó el *sulfato de quinina*, porque como se observa en la Figura 6.14 mostraba un comportamiento lineal para un amplio intervalo de concentraciones y mejoraba la sensibilidad para concentraciones bajas de analito respecto al ácido fórmico, y aunque las señales analíticas se incrementaba con la oxina, se descartó debido a que presentaba un blanco muy elevado.

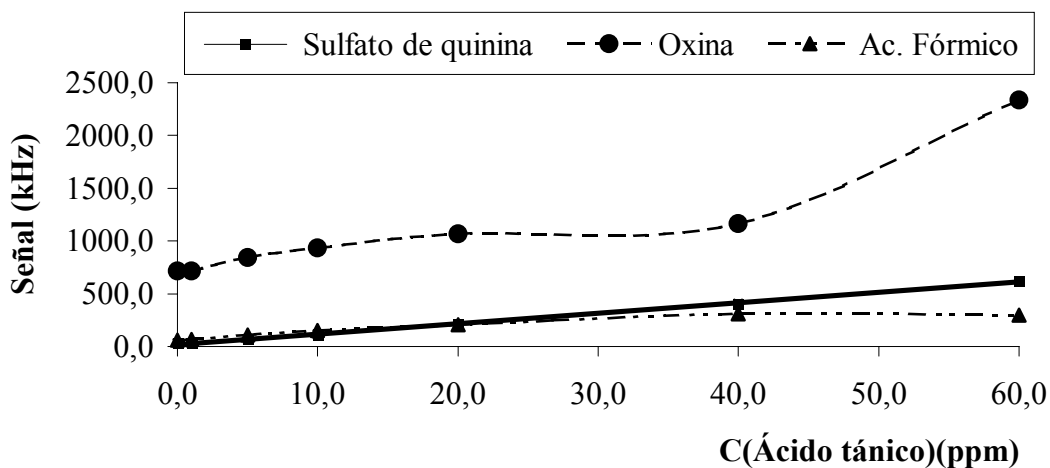


Figura 6.14: Calibrados con oxina, ácido fórmico y sulfato de quinina.

Una vez seleccionado el sensibilizador, se procedió a estudiar la concentración más adecuada del mismo. Con este propósito se varió la concentración del sulfato de quinina en un intervalo comprendido entre 4.0×10^{-4} y

$8.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ y se realizó un calibrado para cada una de las concentraciones de sensibilizador entre 1.0 y 30.0 ppm de ácido tánico. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.10.

Sensibilizador	C ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	Pendiente	Ordenada en el origen	r^2
Sulfato quinina	4.0×10^{-4}	8.863	-6.865	0.9975
	5.0×10^{-4}	10.041	-4.921	1.0000
	6.0×10^{-4}	11.518	-5.411	0.9982
	7.0×10^{-4}	13.403	0.995	0.9995
	8.0×10^{-4}	13.181	0.959	0.9993

Tabla 6.10: Estudio de la concentración de sulfato de quinina.

Atendiendo al criterio de sensibilidad, se seleccionó como concentración óptima de sulfato de quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Finalmente, se ensayaron diversas vías de introducir el sensibilizador en el montaje descrito en la Figura 6.11. Las posibles combinaciones quedan reflejadas en la Tabla 6.11. Cabe destacar que la quinina no se podía ubicar en el canal 4 con el medio ácido perclórico, ya que al confluir con el oxidante, el sulfato de quinina reaccionaba con el permanganato potásico consumiendo el mismo.

Combinaciones	
1	Canal 1: Muestra + Quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
	Canal 2: HClO_4 $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ + Quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
2	Canal 3: Portador (agua + Quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
	Canal 1: Muestra + Quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
3	Canal 2: HClO_4 $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ + Quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
	Canal 3: Portador (agua + Quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Tabla 6.11: Estudio de la ubicación del sensibilizador en el sistema F.I.A. propuesto.

Con cada una de las combinaciones se realizó un calibrado de ácido tánico (n=5) entre 1.0 y 30.0 ppm. Los resultados de dichos calibrados se recogen en la Tabla 6.12.

Combinación	Pendiente	Ordenada en el origen	r²	Observaciones
1	11.148	1.303	0.9983	
2	23.911	-90.632	0.9905	No detecta 1.0-5.0 ppm Picos dobles
3	8.147	2.739	0.9951	Línea base inestable

Tabla 6.12: Calibrados con las tres combinaciones.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 6.12, se seleccionó como óptima la combinación 1, donde el sensibilizador se disolvía en la muestra (canal 1) y en el medio ácido perclórico (canal 2) del montaje de la Figura 6.11.

6.4.6. Influencia de la temperatura

La influencia de la temperatura en el sistema analítico se estudió introduciendo diversas partes del montaje en un baño termostático y ensayándose dos configuraciones distintas:

1) Calentando el oxidante y el medio de reacción que confluye con el mismo, para ello se sumergieron 2.0 metros de tubo de PTFE a la salida de la confluencia de los canales 4-5 en un baño termostático.

2) Calentando el portador, la muestra insertada, el oxidante y el medio de reacción que confluía con el permanganato potásico. Para calentar el portador se introdujeron 2.0 metros de tubo PTFE en el baño termostático y por último para termostatar el volumen de muestra, se introdujo en el baño el bucle externo de la válvula de inyección.

Las diferentes configuraciones ensayadas se encuentran detalladas en la Figura 6.15.

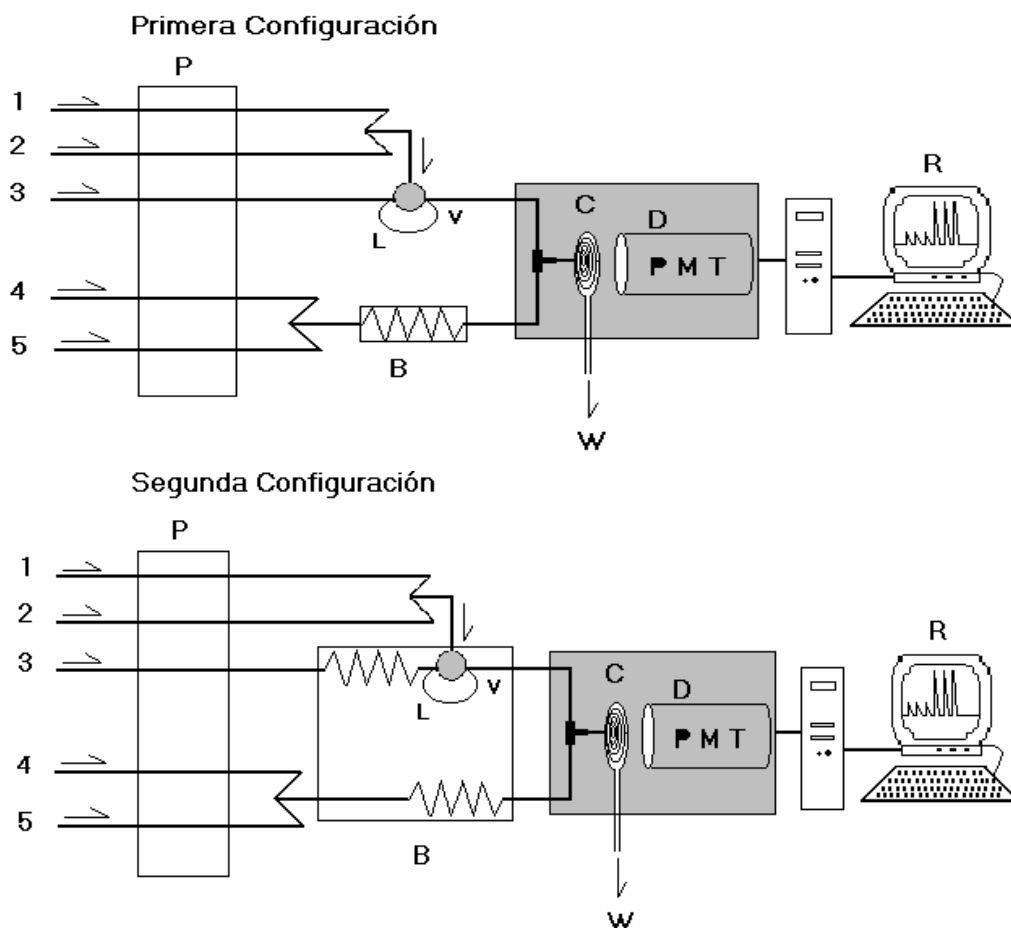


Figura 6.15: Configuraciones para el estudio de la temperatura.

Canal 1: Disolución acuosa de ácido tánico y sulfato de quinina.

Canal 2: Disolución que confluye con la muestra para ajustar el medio de reacción (HClO_4 y sulfato de quinina).

Canal 3: Portador (Agua).

Canal 4: Disolución de HClO_4 que confluye con el oxidante.

Canal 5: Oxidante.

P: Bomba peristáltica; **V:** Válvula de inyección; **L:** Bucle de muestra; **B:** Baño termostático; **C:** Celda de flujo en espiral; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados; **W:** Desecho.

Las temperaturas ensayadas fueron: 24.0°C (ambiente), 40.0°C, 60.0°C, 80.0°C, no se estudiaron temperaturas superiores a 80.0°C para evitar el posible desprendimiento de burbujas al estar el sistema a temperaturas próximas a la de ebullición.

En la Figura 6.16 aparecen representadas las señales obtenidas para 20.0 ppm de ácido tánico con ambas configuraciones y para cada una de las temperaturas ensayadas.

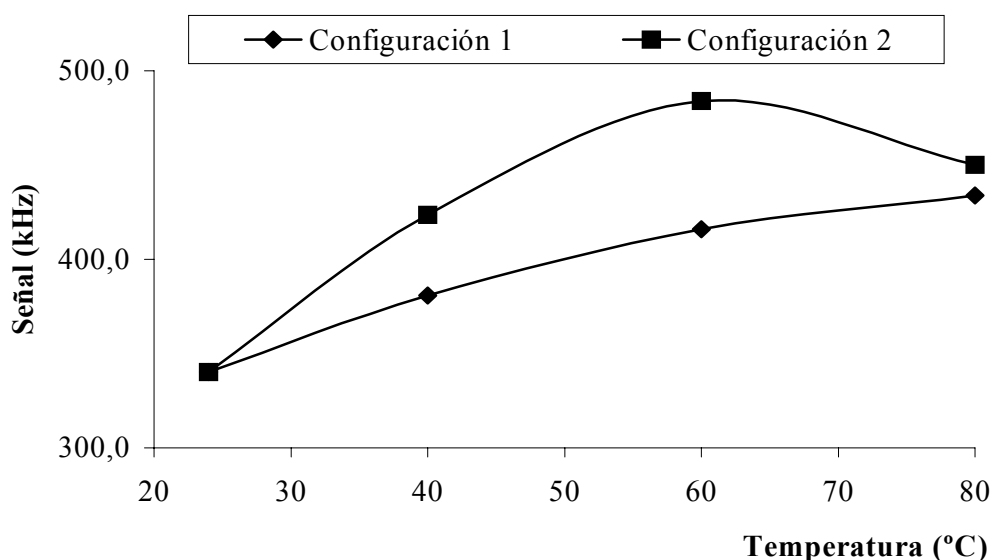


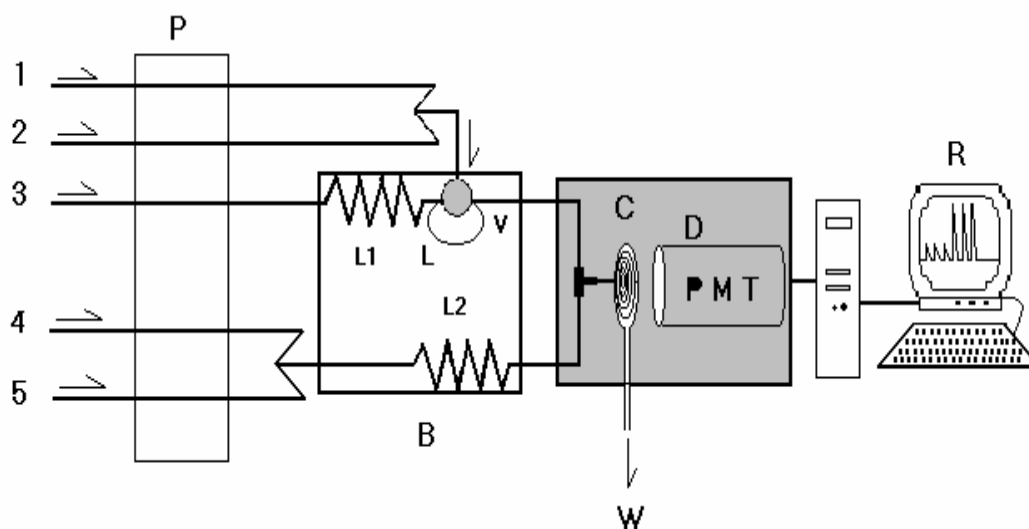
Figura 6.16: Estudio de la influencia de la temperatura.

Tomando la temperatura ambiente (24.0°C) como referencia, se observó que la señal analítica se incrementaba al aumentar la temperatura del sistema, presentando un máximo a 60.0°C con la segunda configuración.

Finalmente, se seleccionó para el desarrollo del nuevo sistema analítico la *segunda configuración*, calentando a 60.0°C el portador, la muestra a insertar, el oxidante y el medio de reacción que confluía con el permanganato potásico, ya que para una misma concentración de ácido tánico la emisión quimioluminiscente era mayor respecto a la obtenida con la primera configuración.

Terminado el proceso de optimización, el sistema F.I.A. preliminar desarrollado para la determinación de ácido tánico por quimioluminiscencia directa, queda reflejado en la Figura 6.17.

Figura 6.17: Montaje F.I.A. preliminar.



Canal 1: Disolución acuosa de ácido tánico; sulfato de quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Canal 2: Disolución que confluye con la muestra para ajustar el medio de reacción HClO_4 $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; sulfato de quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Canal 3: Portador (agua) ($4.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Canal 4: Disolución de HClO_4 $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ que confluye con el oxidante ($1.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Canal 5: Disolución de KMnO_4 $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($1.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

P: Bomba peristáltica.

V: Válvula de inyección.

L: Bucle de muestra termostatado a 60.0°C .

L1 y L2: Longitud del tubo de PTFE introducido en el baño termostatado a 60.0°C .

B: Baño termostatado a 60.0°C .

C: Celda de flujo en espiral.

D: Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador).

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

W: Desecho.

6.5. SELECCIÓN DEL MONTAJE F.I.A. ÓPTIMO

Se estudió una posible simplificación del montaje F.I.A. propuesto en la Figura 6.17. Esta modificación consistió en unificar los canales 1 y 2 para convertirlos en un sólo canal donde la muestra, el medio de reacción y el sensibilizador se preparaban conjuntamente, siendo necesario adecuar las variables químicas, para que en la celda se mantuviesen las concentraciones de los reactivos optimizadas. El montaje resultante de la modificación del sistema F.I.A. preliminar (Figura 6.17) se encuentra descrito en la Figura 6.18.

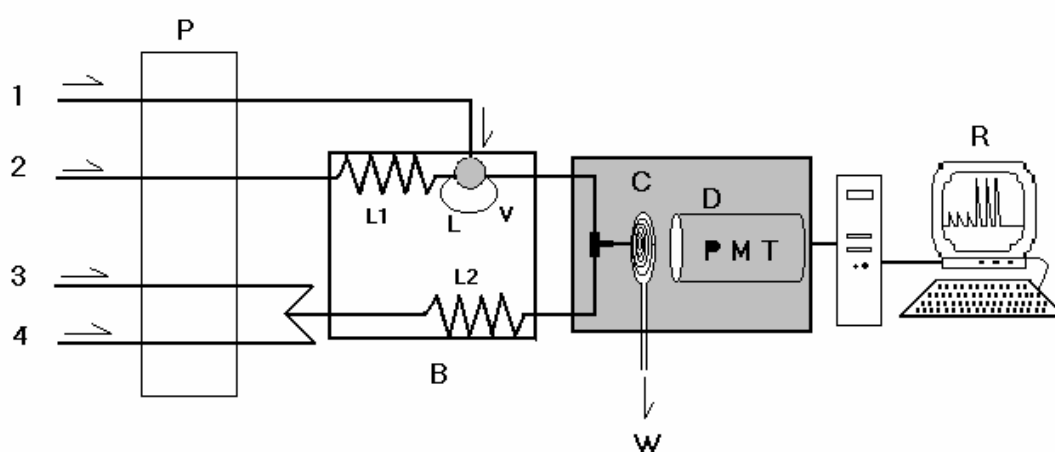


Figura 6.18: Modificación del montaje F.I.A. preliminar.

Canal 1: Disolución de ácido tánico; sulfato de quinina $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; HClO_4 $4.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Canal 2: Portador (agua) ($4.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Canal 3: HClO_4 $8.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($1.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Canal 4: KMnO_4 $8.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($1.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

P: Bomba peristáltica; **V:** Válvula de inyección; **L:** Bucle de muestra; **L1 y L2:** Longitud de tubo de PTFE introducido en el baño termostático; **B:** Baño termostático a 60.0°C ; **C:** Celda de flujo en espiral; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados; **W:** Desecho.

Con el propósito de seleccionar la configuración F.I.A. óptima, se realizó un calibrado de ácido tánico entre 1.0 y 20.0 ppm con cada uno de los montajes

descritos en las Figuras 6.17 y 6.18. Los resultados de esta experiencia quedan reflejados en la Tabla 1.13.

Montaje	Pendiente	Ordenada en el origen	r^2
Figura 6.17	12.649	37.341	0.9438
Figura 6.18	22.952	12.917	0.9851

Tabla 6.13: Selección del montaje F.I.A.

Atendiendo al criterio de sensibilidad y según los resultados de la Tabla 6.13 se seleccionó el montaje F.I.A. descrito en la *Figura 6.18*, ya que la pendiente del calibrado obtenida era mucho mayor. A partir de este momento en un mismo canal se preparaban conjuntamente la muestra, el ácido perclórico y el sensibilizador.

6.6. REOPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES QUÍMICAS

Una vez seleccionado el montaje F.I.A., se procedió a reoptimizar las variables químicas mediante el método univariante, empleando el montaje descrito en la *Figura 6.18*.

De este modo se reoptimizaron las siguientes variables:

- Concentración de HClO_4 en el canal 3.
- Concentración de KMnO_4 .
- Concentración de HClO_4 en el canal 1.
- Concentración de sulfato de quinina.

6.6.1. Reoptimización de la concentración de HClO_4 en el canal 3

Para la reoptimización de la concentración de ácido perclórico en el canal 3 de la Figura 6.18, se ensayaron 7 concentraciones distintas del HClO_4 comprendidas entre 5.0×10^{-2} y $9.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, seleccionándose como concentración óptima la que proporcionó una mayor señal analítica para 10.0 ppm de ácido tánico. Los resultados de esta experiencia se muestran en la Figura 6.19.

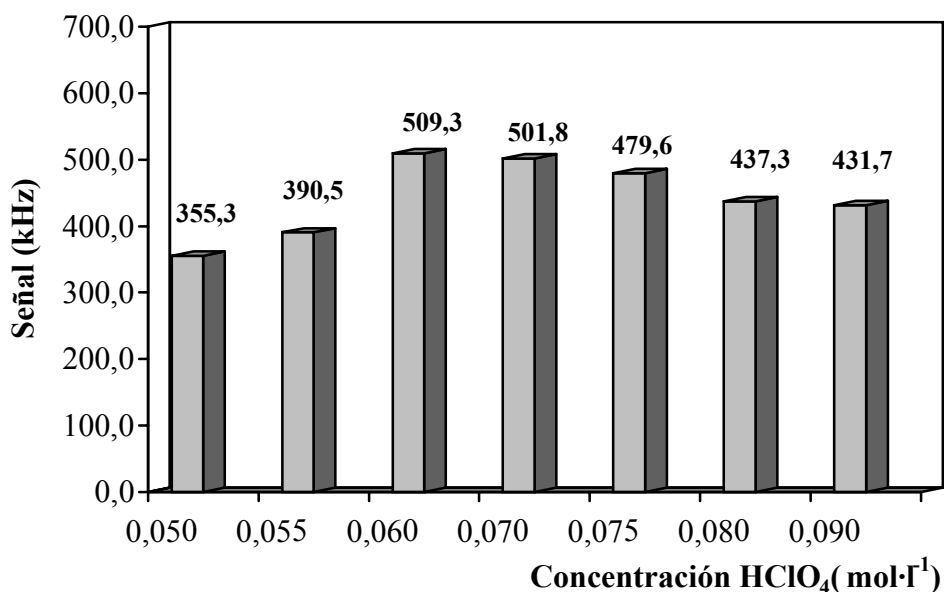


Figura 6.19: Reoptimización de la concentración de HClO_4 en el canal 3.

Para asegurar una mayor reproducibilidad se seleccionó como concentración óptima $0.070 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ para el medio de reacción que confluye con el permanganato potásico por el canal 3, aunque las máximas señales se obtuvieron para una concentración de ácido perclórico $0.060 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

6.6.2. Reoptimización de la concentración de KMnO_4

A continuación se reoptimizó la concentración de oxidante, variable crítica en los procesos quimioluminiscentes.

Para llevar a cabo este estudio, se obtuvieron las señales analíticas para 10.0 ppm de ácido tánico con las siguientes concentraciones de permanganato potásico: 6.0×10^{-4} , 6.5×10^{-4} , 7.0×10^{-4} , 7.5×10^{-4} , 8.0×10^{-4} , 8.5×10^{-4} , $9.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Como se puede apreciar en la Figura 6.20, la máxima emisión quimioluminiscente obtenida para una misma concentración de analito se encontraba comprendida entre 6.5×10^{-4} y $7.5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C=3.18$ y $-\log C=3.12$), por tanto, el valor elegido para la concentración de oxidante que confluye con el HClO_4 $0.07 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ por el canal 4 fue $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C=3.15$).

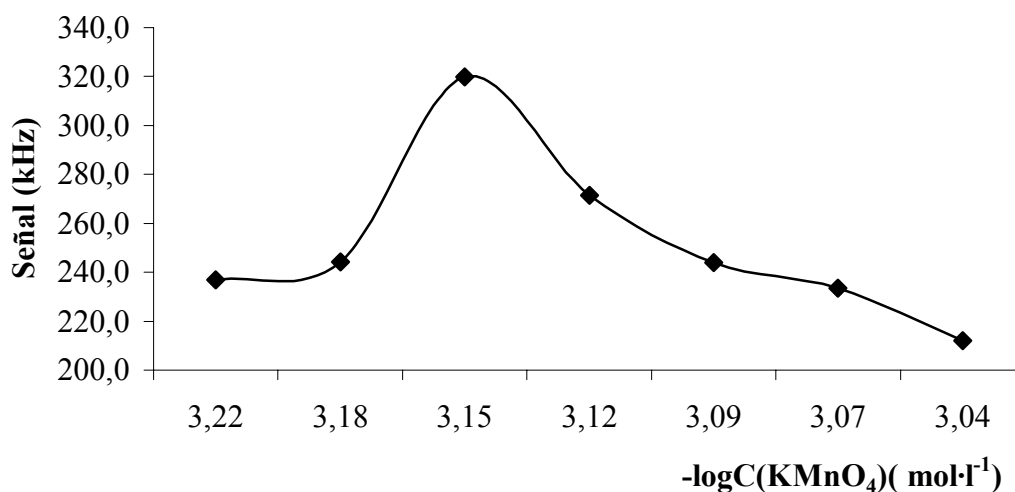


Figura 6.20: Reoptimización de la concentración de KMnO_4 .

6.6.3. Reoptimización de la concentración de HClO_4 en el canal 1

La reoptimización de la concentración del HClO_4 en el canal 1 que se encontraba junto con la muestra y el sensibilizador se llevó a cabo de manera análoga a la del ácido perclórico en el canal 3. Se obtuvieron las señales analíticas para 10.0 ppm de ácido tánico con siete concentraciones distintas de HClO_4 comprendidas entre 2.0×10^{-2} y $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

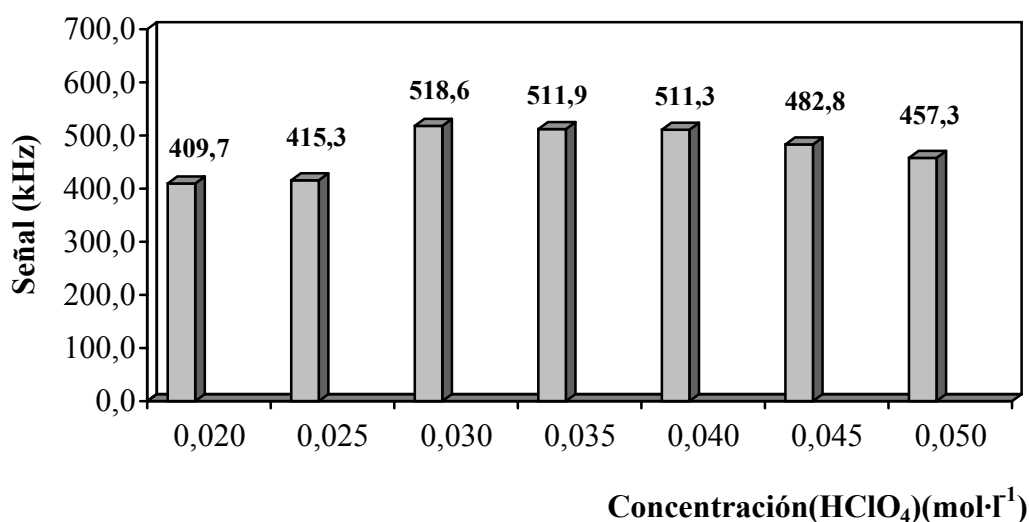


Figura 6.21: Reoptimización de la concentración de HClO_4 en el canal 1.

La Figura 6.21 indica que en el intervalo comprendido entre 0.030 y 0.040 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ para una misma concentración de analito, las señales analíticas se encontraban prácticamente en una meseta.

Con el fin de establecer las condiciones óptimas, se escogieron las concentraciones de ácido (0.030 y 0.035 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) que habían presentado señales analíticas más elevadas y con cada una de ellas se calculó la desviación estándar relativa para una serie de 10 picos F.I.A. Los resultados obtenidos fueron 1.07 y 0.99% respectivamente, por tanto, la concentración seleccionada de HClO_4 en el canal 1 fue 0.035 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

6.6.4. Reoptimización de la concentración de sulfato de quinina

Por último, se reoptimizó la concentración del sensibilizador sulfato de quinina que se encontraba en el mismo canal junto con el analito y el HClO₄. Con este fin, se ensayaron concentraciones del sensibilizador comprendidas entre 6.0x10⁻⁴ y 9.0x10⁻⁴ mol·l⁻¹. Las concentraciones y las señales obtenidas para 10.0 ppm de ácido tánico se encuentran detalladas en la Tabla 6.14.

Aunque los valores obtenidos eran muy similares para todo el intervalo estudiado, se seleccionó como concentración óptima para el sulfato de quinina 7.5x10⁻⁴ mol·l⁻¹ (-logC=3.12), porque en estas condiciones la emisión quimioluminiscente se incrementaba ligeramente.

C(Quinina) (mol·l ⁻¹)	Señal (kHz)
6.0x10 ⁻⁴	503.7
6.5x10 ⁻⁴	539.0
7.0x10 ⁻⁴	552.6
7.5x10⁻⁴	576.3
8.0x10 ⁻⁴	562.8
8.5x10 ⁻⁴	563.2
9.0x10 ⁻⁴	554.7

Tabla 6.14: Valores obtenidos en la reoptimización de la concentración del sensibilizador.

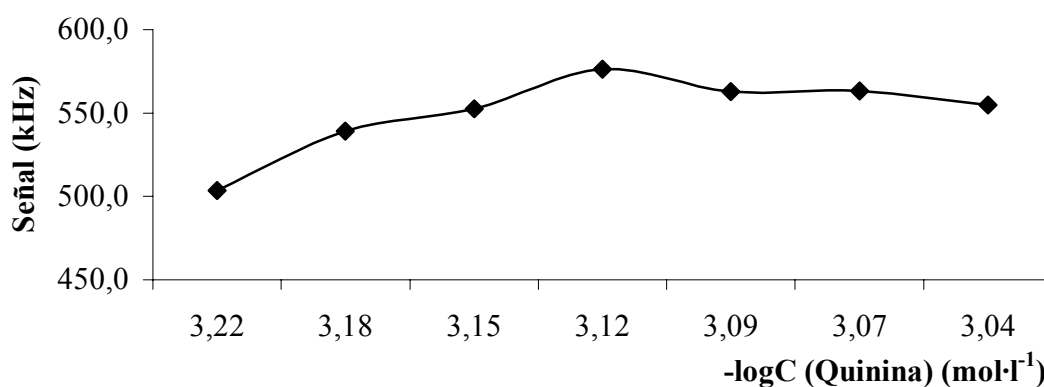


Figura 6.22: Influencia de la concentración de sensibilizador en la emisión quimioluminiscente, según los valores de la Tabla 6.14.

6.7. SISTEMA F.I.A. OPTIMIZADO

De acuerdo con todos los resultados expuestos hasta el momento, la configuración del sistema F.I.A. para la determinación de ácido tánico por quimioluminiscencia directa fue la siguiente:

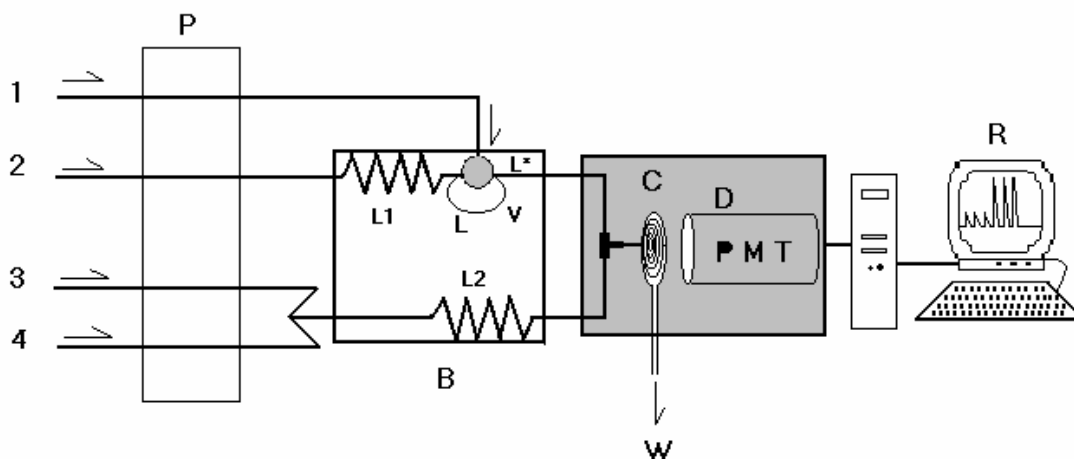


Figura 6.23: Configuración definitiva del sistema F.I.A.

Canal 1: Disolución de ácido tánico; sulfato de quinina $7.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; HClO_4 $3.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Canal 2: Portador (agua) termostatado a 60.0°C ($4.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Canal 3: HClO_4 $7.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($1.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Canal 4: KMnO_4 $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($1.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

P: Bomba peristáltica.

V: Válvula de inyección.

L: Volumen de muestra insertado termostatado a 60.0°C ($880 \mu\text{l}$).

L*: Longitud que afecta a la dispersión de la muestra en el portador (50.0 cm).

L1 y L2: Longitud de tubo de PTFE (2.0 metros) introducido en el baño termostatado a 60.0°C .

B: Baño termostatado a 60.0°C .

C: Celda de flujo en espiral.

D: Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador).

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

W: Desecho.

6.8. APLICACIONES ANALÍTICAS

Tras la optimización del sistema del sistema F.I.A. y con el montaje descrito en la Figura 6.23, se procedió a estudiar las características analíticas del sistema: intervalo de linealidad, repetitividad, velocidad de inserción, límite de detección, reproducibilidad y robustez química (denominada seguridad de la reacción en la bibliografía), para finalmente aplicar el método F.I.A. propuesto a la determinación de ácido tánico por quimioluminiscencia directa en muestras reales.

6.8.1. Estudio del intervalo de linealidad

El intervalo de linealidad se estableció ensayando un total de 10 concentraciones de ácido tánico comprendidas entre 0.1 y 60.0 ppm. El intervalo completo presentaba el comportamiento correspondiente a una ecuación de segundo grado $S = -0.4632C^2 + 31.798C - 12.521$ con un coeficiente de correlación 0.9946, donde la señal quimioluminiscente se expresada en kHz y la concentración de ácido tánico en ppm. El calibrado resultó lineal entre 0.5 y 20.0 ppm como puede observarse en la Figura 6.24.

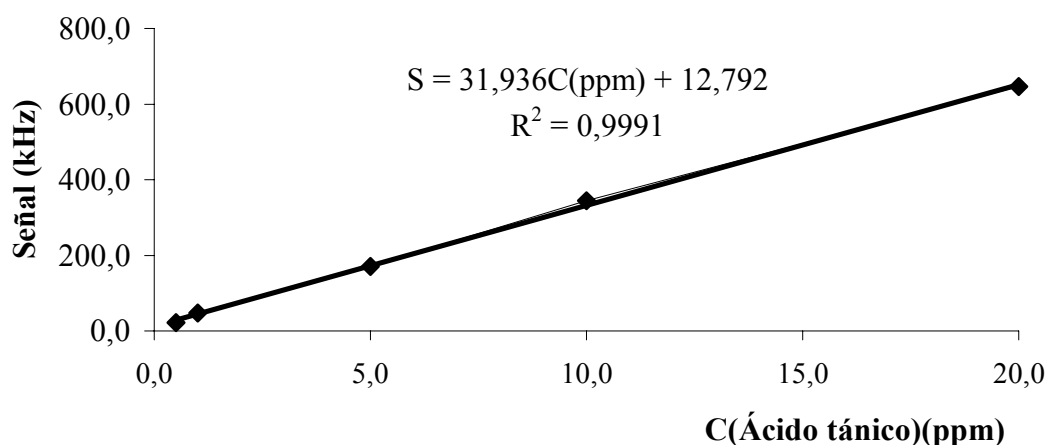


Figura 6.24: Calibrado de ácido tánico en el intervalo de linealidad.

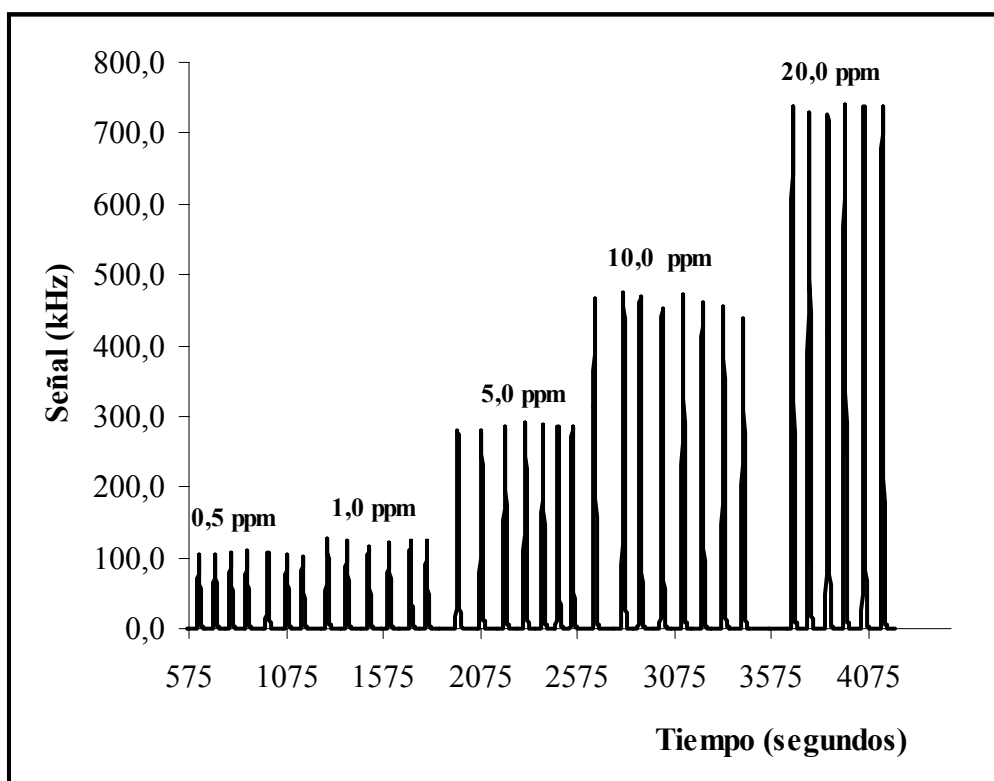


Figura 6.25: Diagrama de un calibrado de ácido tánico entre 0.5 y 20.0 ppm.

6.8.2. Estudio de la repetitividad y de la frecuencia de inserción

El estudio de la repetitividad y de la frecuencia de inserción se estableció empíricamente a partir de una serie de 25 inserciones consecutivas de ácido tánico de 5.0 ppm. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.15.

C(Ácido tánico) (ppm)	Repetitividad (n=25) (dsr %)	Frecuencia de inserción (muestras·h ⁻¹)
5.0	2.1	54

Tabla 6.15: Repetitividad y frecuencia de inserción.

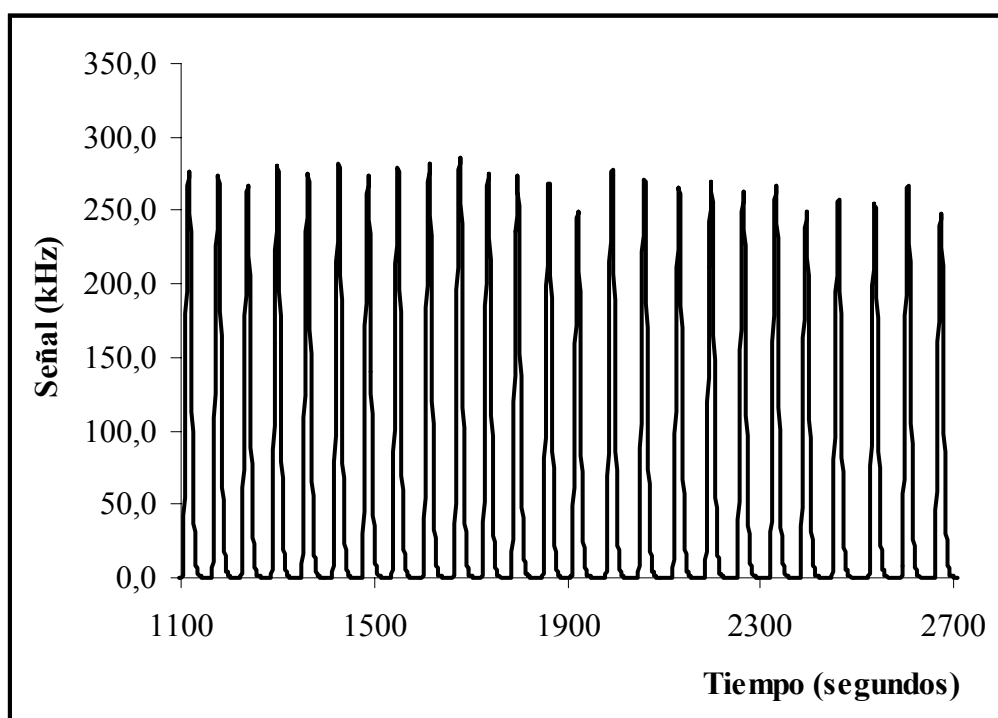


Figura 6.26: Fiagrama del estudio de la repetitividad 5.0 ppm de ácido tánico.

6.8.3. Límite de detección

El límite de detección se estableció como la mínima concentración de analito, en este caso ácido tánico, detectable por el método analítico propuesto.

Este parámetro analítico se consiguió, disminuyendo la concentración de analito hasta llegar a la mínima concentración cuya señal analítica era igual o superior al promedio de la señal de 10 inserciones de blanco más dos veces la desviación estándar del blanco. El límite de detección obtenido de este modo fue 0.1 ppm (100 ppb).

6.8.4. Reproducibilidad

Para llevar a cabo el estudio de la reproducibilidad del método analítico, se realizaron cinco calibrados de ácido tánico en distintos días y con disoluciones de cada uno de los reactivos recién preparadas, obteniéndose las respectivas ecuaciones de las rectas de calibrado. El intervalo de concentraciones estudiadas de ácido tánico estuvo comprendido entre 0.5 y 20.0 ppm.

Posteriormente, se calculó el promedio y la desviación estándar relativa de los valores de las pendientes de la rectas. El valor medio obtenido de la pendiente para los cinco calibrados fue de 31.2066 ppm⁻¹ con una desviación estándar relativa de 4.4%. Los valores numéricos de las rectas de calibrado se encuentran detallados en la Tabla 6.16.

Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
29.422	30.156	0.9796
30.019	18.439	0.9882
32.119	7.786	0.9930
32.537	23.412	0.9800
31.936	12.792	0.9991

Tabla 6.16: Reproducibilidad entre días con disoluciones recién preparadas.

6.8.5. Estudio de la robustez química

El estudio de la robustez o reproducibilidad química (también denominada *seguridad de la reacción* según la bibliografía), se realizó con el fin de comprobar que la utilización de tres de los reactivos empleados en el desarrollo del trabajo procedentes de distintas casas comerciales, no afectaba significativamente a la señal quimioluminiscente. En la Tabla 6.17, se describen los distintos reactivos y las casas comerciales utilizadas para el estudio de la reproducibilidad química.

Reactivos	Casa Comercial
HClO ₄	Panreac U.C.B.
KMnO ₄	Panreac Probus
Sulfato de quinina	Guinama Scharlau
Ácido tánico	Guinama

Tabla 1.17: Reactivos y casas comerciales empleadas.

Con estos reactivos se prepararon diversas disoluciones, para obtener todas las posibles combinaciones entre los componentes responsables de la emisión quimioluminiscente.

A continuación, se midió la señal analítica para 6.0 y 12.0 ppm de ácido tánico y se calculó el error relativo respecto a la señal de referencia (obtenida con los reactivos empleados durante el trabajo), así como la reproducibilidad entre los valores de la señal de todas las combinaciones obtenidas durante el ensayo. Los resultados pueden observarse en la Tabla 6.18.

Como se muestra en la Tabla 6.18, en ningún caso se perdió la señal quimioluminiscente y la desviación estándar relativa de la media de las señales con 6.0 y 12.0 ppm de ácido tánico fueron 6.1 % y 4.6 % respectivamente. Se puede afirmar, pues, que se trata de un método químicamente robusto o dicho con otras palabras, la seguridad del procedimiento analítico es adecuada.

Nº	Combinación reactivos	Er(%)	Er(%)
		6.0 ppm	12.0 ppm
1	HClO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ <i>Panreac</i> / Quinina <i>Guinama</i> / AT <i>Guinama</i>	Ref*	Ref*
2	HClO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ Probus / Quinina <i>Guinama</i> / AT <i>Guinama</i>	1.0	-2.5
3	HClO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ <i>Panreac</i> / Quinina Scharlau / AT <i>Guinama</i>	1.5	-0.2
4	HClO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ Probus / Quinina Scharlau / AT <i>Guinama</i>	-0.5	0.7
5	HClO ₄ U.C.B. /KMnO ₄ Probus / Quinina Scharlau / AT <i>Guinama</i>	-3.7	-4.3
6	HClO ₄ U.C.B. /KMnO ₄ <i>Panreac</i> / Quinina <i>Guinama</i> / AT <i>Guinama</i>	-6.1	-6.0
7	HClO ₄ U.C.B. /KMnO ₄ Probus / Quinina <i>Guinama</i> / AT <i>Guinama</i>	-12.5	-8.1
8	HClO ₄ U.C.B. /KMnO ₄ <i>Panreac</i> / Quinina Scharlau / AT <i>Guinama</i>	-14.8	-11.6

Tabla 6.18: Estudio de la robustez química para 6.0 y 12.0 ppm de ácido tánico. En negrita se muestran las casas comerciales, distintas a las de referencia, empleadas en cada caso; Nº: Número de combinaciones; Ref*: Referencia (señal obtenida con los reactivos empleados en todo el trabajo).

6.8.6. Estudio de interferentes

Antes de proceder a la aplicación del método quimioluminiscente desarrollado a la determinación de ácido tánico en muestras reales, se efectuó un estudio de la influencia que podían tener sobre la señal analítica, sustancias que pueden acompañar al ácido tánico en los distintos tipos de muestras analizadas por el

método analítico propuesto como preparaciones farmacéuticas, formulaciones galénicas, orina humana y aguas superficiales.

Para el estudio de los interferentes se modificó el montaje descrito en la Figura 6.23, adicionando un canal más por el que fluía la disolución acuosa de interferente, para confluir posteriormente mediante una conexión en punta de flecha con la disolución de ácido tánico preparada en medio ácido y en presencia del sensibilizador. Además, fue necesario adecuar las variables químicas para que en la celda de flujo se mantuvieran las concentraciones optimizadas de cada reactivo.

Por tanto, se prepararon disoluciones que contenían 10.0 ppm de ácido tánico y se hicieron confluir con disoluciones de concentraciones de interferente superiores, teniendo en cuenta la proporción en la que aparecen en las muestras reales.

Se obtuvieron un mínimo de 6 inserciones para cada interferente estudiado y se comparó con la señal analítica de referencia obtenida con ácido tánico 10.0 ppm sin adicionar ningún interferente (fluyendo por el canal auxiliar exclusivamente agua desionizada), considerando que la sustancia no interfería cuando ocasionaba errores relativos inferiores al 3 ó 4 % respecto a la disolución patrón de ácido tánico.

El presente estudio de interferentes se dividió en tres grupos de compuestos: en primer lugar se ensayaron algunos componentes presentes en la *matriz de orina humana* como cationes, aniones inorgánicos, así como la glucosa y el ácido gálico que son los metabolitos resultantes de la degradación del ácido tánico en el organismo humano³²⁹.

En segundo lugar se consideró la influencia de especies como metales pesados o iones inorgánicos presentes en *aguas superficiales*. Por último se estudiaron diversas sustancias que pueden acompañar al ácido tánico en *formulaciones farmacéuticas y preparaciones galénicas* como principios activos, excipientes y conservantes.

En la Tabla 6.19 se agrupan los resultados para algunos de los componentes de la orina humana estudiados. En la Tabla 6.20 y 6.21 se muestran los resultados obtenidos para las especies ensayadas presentes en aguas superficiales y en Tabla 6.22 aparecen las sustancias empleadas para el estudio de interferentes en preparaciones farmacéuticas y galénicas, junto con los errores obtenidos en cada caso.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Ácido gálico	20.0	1.6
Calcio (Ca(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O)	200.0*	-1.6
Cloruro (KCl)	200.0*	-3.0
Fosfato (KH ₂ PO ₄)	100.0	-2.9
Glucosa	100.0	2.9
Magnesio (Mg(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O)	200.0*	0.9
Potasio (KNO ₃)	126.0*	2.0
Sodio (NaNO ₃)	200.0*	1.0
Sulfato (Na ₂ SO ₄ ·10 H ₂ O)	100.0	-2.1

*Concentración máxima ensayada.

Tabla 6.19: Estudio de posible interferentes en orina humana. Entre paréntesis aparece la sal utilizada.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Cloruro (KCl)	200.0*	-3.0
Fosfato (KH ₂ PO ₄)	100.0	-2.9
Nitrato (KNO ₃)	200.0*	2.0
Sulfato (Na ₂ SO ₄ ·10 H ₂ O)	100.0	-2.1

* Concentración máxima ensayada

Tabla 6.20: Estudio de posibles aniones presentes en aguas superficiales. Entre paréntesis aparece la sal utilizada.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Aluminio ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$)	200.0*	-0.8
Cadmio ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	200.0*	-2.8
Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)	200.0*	-1.6
Cobalto ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	200.0*	-3.7
Cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)	20.0	-1.5
Hierro ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$) (1)	1.0	3.5
Magnesio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	200.0*	0.9
Mercurio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	20.0	1.5
Níquel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	200.0*	1.7
Sodio (NaNO_3)	200.0*	1.0

* Concentración máxima ensayada.

Tabla 6.21: Estudio de posibles cationes presentes en aguas superficiales. Entre paréntesis aparece la sal utilizada.

(1) Era de destacar la interferencia del hierro, probablemente por la formación de complejos con el ácido tánico de elevada estabilidad (según datos bibliográficos³³⁸).

Tabla 6.22: Estudio de posible interferentes en preparaciones farmacéuticas y galénicas.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Ácido bórico	200.0*	2.8
Ácido cítrico	200.0*	-3.6
Ácido pícrico	200.0*	-3.5
Ácido salicílico	1227.0*	0.6
Alcohol de romero	926.0*	-2.7
Benzocaína (2)	10.0	2.3
Bromuro magnésico (1)	1.0	22.7
Calamina	200.0*	-1.5
Citrato sódico	200.0*	-1.3
Cloruro de benzalconio	200.0*	1.9

Continuación Tabla 6.22.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Cloruro de magnesio	100.0	-2.3
Cloruro de zinc	100.0	0.9
Dexametazona	50.0	0.7
Difenhidramina	100.0	-4.0
Etanol 10%	100000	14.0
Fenol	20.0	1.2
Glicerina	300.0	-1.9
Hidrocortisona	100.0*	1.7
Ioduro potásico	50.0	-4
Mentol	100.0	-0.2
Metilparaben	1.0	-4.1
Nicotinamida	200.0 *	-0.1
Novocaína (2)	1.0	2.6
Oxido de magnesio	200.0*	1.8
Oxido de zinc	200.0*	-2.0
Sacarosa	200.0*	1.3
Sal de aluminio-potasio-sulfato	200.0*	-0.8
Sulfanilamida	50.0	-3.0
Sulfatiazol (2)	1.0	-2.9
Sulfato de neomicina	200.0*	2.6
Sulfato de zinc	200.0*	-3.6
Sulfito sódico (1)	1.0	4.0

* Concentración máxima ensayada.

(1) Era destacable la interferencia de los compuestos inorgánicos sulfito y bromuro que afectaban a la reacción de oxidación (consumiendo el KMnO_4), interfiriendo incluso a concentraciones inferiores a 1.0 ppm.

(2) Para los tres fármacos novocaína, benzocaína y sulfatiazol, fue necesario disminuir la concentración ensayada para alcanzar errores relativos respecto al de referencia inferiores al 3%. Por ello, se decidió obtener señales analíticas para cada

uno de los mismos en ausencia del ácido tánico, observándose que con el sistema analítico propuesto se podían determinar estos fármacos, siendo estos errores imputables a la propia emisión quimioluminiscente de los interferentes.

6.8.7. Análisis de muestras reales

A continuación, se aplicó el método analítico a la determinación de ácido tánico en dos formulaciones farmacéuticas comerciales, en dos preparaciones galénicas, en dos aguas superficiales (acequia y barranco) procedentes de un municipio de la Comunidad Valenciana y en una matriz compleja (orina humana). La presentación, procedencia y composición de cada muestra empleada aparece descrita en la Tabla 6.23 y 6.24.

Tipo de preparado	Procedencia	Composición
SOLUCIÓN (1) Preparación galénica 1		Acido tánico, 10 g Glicerina, 100 ml Alcohol etílico, 100 ml
SOLUCIÓN (2) Preparación galénica 2		Ácido tánico, 2 g Alcohol de romero, 100 g
AGUA SUPERFICIAL (Acequia de riego)	Puig (Valencia)	
AGUA SUPERFICIAL (Barranco)	Puig (Valencia)	
ORINA	Humana	

Tabla 6.23: Composición de las muestras reales a las que se aplicó el método.

Aplicación farmacológica de las preparaciones galénicas

- ❖ **Solución 1**, para prevenir y curar las grietas del pecho y las úlceras de decúbito.
- ❖ **Solución 2**, para el tratamiento de la seborrea del cuero cabelludo.

Nombre comercial y tipo de preparado	Procedencia	Composición*
DEPURATIVO	Laboratorio	Cada 100 g contiene:
RICHELET	Vitafarma	Ácido tánico, 150 mg
(Suspensión oral)		Extracto vegetal, 4.177 g
		Ácido salicílico, 100 mg
		Tintura gentiana lútea, 706 mg
		Ioduro potásico, 761 mg
		Yodo en combinación orgánica formando ácido iodotánico, 66 mg
		Cloruro magnésico, 800 mg
		Bromuro magnésico, 50 mg
		Nicotinamida, 63 mg
		Sacarosa, 18.66 mg
		Etanol, 1 ml
		Otros excipientes
		Contenido del frasco (280g=260ml)
ANTIHEMORROIDAL	Laboratorio	Cada gramo de pomada contiene:
CINFA	Cinfa S.A.	Ácido tánico, 10 mg
Pomada		Hidrocortisona, 25 mg
(Vía tópica rectal)		Sulfato de neomicina, 3.5 mg
		Benzocaína, 15 mg
		Otros excipientes

Tabla 6.24: Composición de las formulaciones farmacéuticas comerciales a las que se les aplicó el método analítico propuesto. *Composición según etiquetado.

El tratamiento previo a que se sometieron las muestras reales fue el siguiente:

➤ En la preparación de la suspensión oral *Depurativo Richelet*, el único pretratamiento necesario, fue la dilución con el material volumétrico adecuado hasta

una concentración final de 12.9 ppm situada dentro del intervalo de linealidad del método propuesto.

Teniendo en cuenta la equivalencia entre gramos y mililitros especificada en la formulación farmacéutica, se pipetearon (con pipeta aforada) directamente del preparado 10 ml lo que correspondía con 0.01615 g de ácido tánico y se transfirió la alícuota a un matraz aforado de 100 ml llevándose a volumen con agua desionizada. El proceso se repitió por triplicado para finalmente tener tres disoluciones madres de 161.5 ppm de ácido tánico.

De cada una de las tres réplicas de las disoluciones madre preparadas, se tomaron también con pipeta aforada 2 ml, se transvasaron a un matraz aforado de 25 ml a los cuales se adicionó las cantidades necesarias de sulfato de quinina y de ácido perclórico para obtener las concentraciones optimizadas, enrasándose hasta 25 ml con agua desionizada. Finalmente la concentración de ácido tánico presente en la formulación farmacéutica de cada una de las réplicas, se determinó del modo habitual por interpolación en la recta de calibrado de 1.0 a 18.0 ppm obtenida a partir de las disoluciones patrón.

➤ El procedimiento de la preparación de la pomada *Antihemorroidal Cinfa* fue más complicado, debido a la dificultad que conlleva el trabajar con muestras de este tipo. Básicamente consistió en una extracción sólido-líquido y en una centrifugación.

El pretratamiento descrito a continuación, se realizó por triplicado con cada una de las tres muestras preparadas y consistió en las siguientes etapas:

- En primer lugar, se pesó en un vaso de precipitados y con balanza analítica una cantidad de pomada (exactamente alrededor de 0.468 g) equivalente a 4 mg de ácido tánico, se disolvió en 35 ml de agua desionizada medidos con pipeta aforada y se calentó la disolución en placa calefactora a 60°C con agitación simultánea durante

30 minutos, de esta forma se conseguía que todo lo que fuera soluble en agua se encontrara en la disolución y aquello no soluble precipitara en el fondo del vaso de precipitados.

- En segundo lugar, transcurridos los 30 minutos se trasvasó la disolución resultante a varios tubos de centrifuga y se centrifugaron durante 40 minutos a 4000 r.p.m. con objeto de que la cantidad no soluble en agua quedara adherida a las paredes del tubo. Posteriormente se decantó el sobrenadante de cada uno de los tubos de centrifuga y se juntaron las porciones decantadas en un vaso de precipitados.

- En tercer lugar, del vaso de precipitados se tomó el volumen de muestra necesario para tener una concentración de ácido tánico situada en la parte central del intervalo de linealidad. Así que se pipeteó una alícuota de 2 ml medida con el material volumétrico adecuado y se transfirió a un matraz aforado de 25 ml junto con el sensibilizador y el medio ácido, llevándose finalmente a volumen con agua desionizada.

- Por último, las tres réplicas fueron insertadas en el montaje F.I.A. optimizado junto con el calibrado de ácido tánico comprendido entre 1.0 y 18.0 ppm y se calculó la cantidad de analito contenida en las muestras por interpolación de la señales en la recta de calibrado obtenida a partir de las disoluciones patrón.

Los resultados obtenidos para las dos formulaciones farmacéuticas por el método propuesto se compararon por los declarados por el fabricante y con la concentración determinada con el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizado para la cuantificación de táninos en vino o bebidas alcohólicas descrito en el AOAC³⁴⁴. Este método se basa en la oxidación de los polifenoles por el sistema $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ácido fosfomolibdico y H_3PO_4 (reactivo de Folin-Denis) y la posterior determinación colorimétrica a 760 nm del color azul producido transcurridos 30 minutos.

Para ello, en primer lugar se realizó un calibrado de ácido tánico entre 2.0 y 10.0 ppm, adicionando a cada patrón y sin alterar el orden, el volumen necesario de la solución madre de analito, 2.5 ml del reactivo de Folin-Denis, 5 ml de Na_2CO_3 y agua desionizada hasta 50 ml. Posteriormente se agitó vigorosamente y se midieron las absorbancias a 760 nm transcurridos 30 minutos.

En segundo lugar se prepararon tres réplicas de cada una de las formulaciones farmacéuticas. Para el *Depurativo de Richelet* al igual que se efectuó con el método propuesto se tomaron 10 ml del frasco y se depositaron en un matraz aforado de 100 ml llevándose a volumen con agua desionizada, posteriormente se pipetearon 2 ml medidos con pipeta aforada (cantidad necesaria para tener una concentración dentro del calibrado) y se transvasaron a un matraz aforado de 50 ml a los que se les adicionó las cantidades de los reactivos para llevar a cabo el método de referencia. Para la preparación de las muestras de *Antihemorroidal Cinfa*, simplemente se tomaron 2 ml del vaso de precipitados donde se encontraba la muestra tras el pretratamiento descrito en el método propuesto, se llevaron a un matraz de 50 ml y se adicionaron las cantidades necesarias de los reactivos. Transcurridos 30 minutos se midieron las absorbancias de las muestras junto con la de los patrones, y por interpolación de las señales en la recta de calibrado se determinó la cantidad de ácido tánico en las formulaciones farmacéuticas por el método de referencia.

En la Tabla 6.25 se muestran los resultados junto con las desviaciones estándar relativa de la réplicas realizadas. En la misma tabla se comparan los resultados obtenidos por el método F.I.A. propuesto con el valor declarado por el fabricante y con el obtenido por el método de referencia para las dos formulaciones farmacéuticas.

Muestra	Método propuesto (dsr%)	Método referencia (dsr%)	Cantidad declarada fabricante	Er(%) del método propuesto respecto referencia	Er(%) del método propuesto respecto fabricante
Depurativo					
Richelet mg ácido tánico /100 g muestra	141.1 (0.4)	149.3 (4.7)	150.0	-5.4	-5.9
Antihemorroidal					
Cinfa mg ácido tánico /1 g muestra	9.0 (6.8)	8.6 (3.6)	10.0	4.6	-10.0

Tabla 6.25: Resultados de la determinación de ácido tánico en formulaciones farmacéuticas.

➤ Las *formulaciones galénicas* se elaboraron en el laboratorio según el procedimiento y composición descrita en el Formulario Magistral del Ilustre Colegio de Farmacéuticos de Murcia²⁹⁴. En ambas formulaciones las únicas operaciones necesarias fueron pesar en balanza analítica con la mayor precisión posible la cantidad de ácido tánico especificada en la composición, pulverizarlo en un mortero de ágata y posteriormente mezclarlo y disolverlo con los demás componentes de la formulación. Una vez preparadas las dos muestras se guardaron en la oscuridad.

El procedimiento de preparación de las muestras fue idéntico para sendas formulaciones galénicas. Al ser las dos soluciones bastante viscosas se decidió pesar en vez de pipetear la cantidad necesaria de muestra para tener una madre de ácido tánico de 100.0 ppm. Para la *solución 1* se pesaron en balanza analítica (exactamente alrededor de 0.214 g), mientras que para la *solución 2* se pesaron (alrededor de 0.503 g), se disolvieron en un cierta cantidad de agua desionizada y posteriormente se transvasaron a un matraz aforado de 100 ml llevándose a volumen con agua desionizada. De esta forma se prepararon tres disoluciones madre independientes de 100.0 ppm para las dos preparaciones galénicas. De cada una de las disoluciones

madre se pipetearon 2.5 ml (cantidad necesaria para obtener una concentración final comprendida dentro del intervalo de linealidad) y se llevaron a un matraz aforado a los que se les adicionó las cantidades de sulfato de quinina y ácido perclórico para obtener las concentraciones previamente optimizadas, enrasándose con agua desionizada hasta completar los 25 ml, siendo la concentración final de analito en cada una de las réplicas de las dos preparaciones gálénicas de 10.0 ppm.

Cada una de las disoluciones se insertaron en el montaje F.I.A. optimizado junto con el calibrado de ácido tánico comprendido entre 0.5 y 20.0 ppm, se interpolaron las señales analíticas en la recta de calibrado obtenida a partir de las disoluciones patrón y se comparó la concentración encontrada con el método propuesto respecto a la contenida (10.0 ppm).

➤ Para el análisis de las muestras de *agua de barranco y de acequia*, se tomaron las muestras en un recipiente adecuado previamente enjuagado con la misma agua, recogiénola desde la superficie a la parte inferior para evitar la mezcla entre varias capas. Una vez recogidas las muestras se guardaron en el refrigerador a 3°C y en la oscuridad hasta que fueran analizadas.

El procedimiento a seguir para la preparación de las dos aguas superficiales fue idéntico para ambas muestras. En primer lugar las dos muestras de agua se filtraron con placa filtrante (de tamaño de poro 4), seguidamente se pesó en balanza analítica la cantidad necesaria de ácido tánico (exactamente alrededor de 0.025 g), se transfirió a un matraz aforado de 100 ml, se agitó y se enrasó con el agua filtrada, de esta forma tendríamos tres disoluciones madre para cada una de la muestras de agua dopadas con 250.0 ppm de ácido tánico. A partir de cada una de estas disoluciones se pipeteó una alícuota de 1 ml con el material volumétrico adecuado (pipeta aforada) y se llevaron a un matraz aforado de 25 ml junto con el sensibilizador y el medio ácido, enrasándose hasta 25 ml con agua desionizada. Finalmente la concentración de ácido tánico obtenida tras esta dilución fue de 10.0 ppm tánico, encontrándose situada dentro del intervalo de linealidad del método quimioluminiscente propuesto.

Por último, la concentración de ácido tánico presente en cada una de las aguas se determinó interpolando los valores de las señales obtenidas en la recta de calibrado comprendida entre 0.5 y 20.0 ppm, comparando los resultados obtenidos con el método propuesto respecto a la cantidad de analito adicionada a las muestras.

➤ Para el análisis de la muestra de *orina humana*, se recogió la muestra de la primera hora de la mañana y se filtró con placa filtrante (de tamaño de poro 4). A continuación se pesó en balanza analítica la cantidad necesaria de ácido tánico para preparar una madre de 250.0 ppm, se pesaron exactamente alrededor de (0.025 g). Esta cantidad se transfirió a un matraz aforado de 100 ml, se agitó y se enrasó hasta 100 ml con la orina filtrada. El procedimiento se repitió por triplicado de forma que se obtuvieron tres disoluciones madre de 250.0 ppm.

Seguidamente se tomaron de cada una de estas disoluciones una alícuota de 1 ml medida con pipeta aforada y se transvasó a un matraz aforado de 25 ml, adicionando las cantidades necesarias de sulfato de quinina y de ácido perclórico para conseguir las concentraciones optimizadas, completando hasta 25 ml con agua desionizada. La concentración final obtenida, fue de 10.0 ppm para cada una de las réplicas, encontrándose situada dentro del intervalo de linealidad del método propuesto.

Para finalizar, en el montaje F.I.A. optimizado se insertaron los patrones de ácido tánico, las muestras y, además, fue necesario introducir un blanco de orina (exclusivamente la orina) que se tuvo que restar al valor que ofrecía la muestra antes de interpolar en la recta de calibrado.

La concentración de ácido tánico en las muestras de orina se calculó interpolando las señales obtenidas para las réplicas de cada una de las muestras en la recta de calibrado comprendida entre 0.5 y 20.0 ppm, comparando la concentración encontrada respecto a la adicionada.

En la Tabla 6.26 se muestran los resultados, junto con las desviaciones estándar relativa de las réplicas realizadas. En la misma tabla se comparan los resultados obtenidos por el método F.I.A. propuesto respecto a cantidad de analito adicionada o contenida.

Muestra	Cantidad adicionada o contenida	Método propuesto (dsr%)	Er(%) del método propuesto respecto a la cantidad adicionada o contenida
Preparación galénica (1)	5% (peso/volumen) 10.00 ppm **	9.94 ppm (0.25)	-0.6
Preparación Galénica (2)	2% (peso/peso) 10.00 ppm**	10.49 ppm (0.33)	4.9
Agua Acequia*	10.00 ppm	9.95 ppm (0.66)	-0.5
Agua Barranco*	10.00 ppm	9.69 ppm (0.62)	-3.1
Orina humana*	10.00 ppm	9.96 ppm (0.46)	-0.4

*Muestras dopadas con ácido tánico.

** Concentración resultante tras las diluciones oportunas de cada una de las muestras galénicas.

Tabla 6.26: Resultados obtenidos para el resto de muestras ensayadas.

6.9. CONCLUSIONES

El método F.I.A. propuesto permite la determinación del ácido tánico por vez primera, mediante la oxidación quimioluminiscente del analito. La emisión quimioluminiscente se exalta con el sensibilizador sulfato de quinina.

En el sistema seleccionado, un volumen (880 μl) de la disolución acuosa de ácido tánico en ácido perclórico $3.5 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ con sulfato de quinina $7.5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ termostatada a 60.0°C , es insertada en un portador a 60.0°C constituido exclusivamente por agua desionizada que circula a caudal de $4.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, siendo las disoluciones de muestra y portador calentadas introduciendo el bucle de muestra externo de la válvula de inyección y 2 metros de PTFE en el baño termostatado. Por un tercer canal se introduce a una velocidad de flujo de $1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ el ácido perclórico $7.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ que confluye mediante una conexión en punta de flecha con la disolución acuosa de oxidante permanganato potásico $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ que circula por un cuarto canal a un caudal de $1.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, calentando a 60.0°C la mezcla de ambos canales sumergiendo 2 metros de PTFE a la salida de la confluencia.

Finalmente el portador y la mezcla oxidante-medio confluyen en una pieza en forma de T que se encuentra a la entrada de la celda de flujo en espiral, donde se detecta la señal quimioluminiscente del producto de la reacción.

El método propuesto presenta una velocidad de muestro óptima (56 h^{-1}), una adecuada repetitividad entre muestras ($\text{dsr}=2.1\%$, $n=25$, 5.0 ppm) y una reproducibilidad entre días y disoluciones que proporciona unos resultados favorables ($\text{dsr}_{\text{pendiente de la recta}}=4.4 \%$, $n=5$).

El sistema presenta las ventajas comunes de la detección quimioluminiscente, es decir, una buena sensibilidad, un límite de detección bajo en comparación con los obtenidos en otros artículos publicados^{337,358,366} y un intervalo de linealidad desde 0.5 a 20.0 ppm. Por otro lado, el estudio de la robustez química revela resultados satisfactorios (dsr= 4.6%, n= 8, 12.0 ppm), por tanto, se puede afirmar que es un método analítico químicamente robusto.

Por último, cabe destacar *la selectividad* del método propuesto, considerando la gran cantidad de sustancias ensayadas que no interfieren en la determinación del analito. Por esta razón ha sido posible aplicar con éxito el sistema analítico a la determinación de ácido tánico en formulaciones farmacéuticas, en preparaciones galénicas, en orina humana y en aguas superficiales.

Capítulo séptimo

DETERMINACIÓN DE HIDROQUINONA POR
QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA

INTRODUCCIÓN

7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA HIDROQUINONA

7.1.1. Descripción y propiedades físicas

La hidroquinona es un hidroxiderivado del benceno que se utiliza como agente reductor y revelador en fotografía, como antioxidante, y como despigmentante dermatológico. Es un compuesto orgánico de fórmula empírica $C_6H_6O_2$ y de peso molecular $110.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Su estructura molecular es la que se muestra en la Figura 7.1.

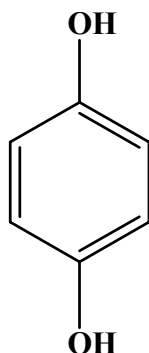


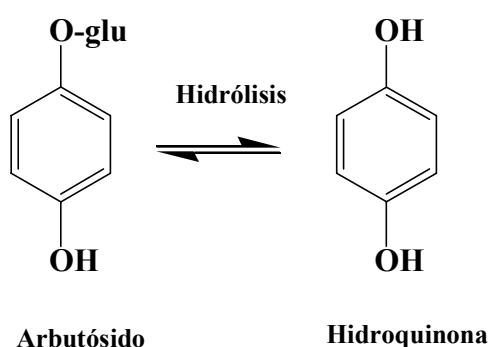
Figura 7.1: Estructura molecular de la hidroquinona.

El nombre de la I.U.P.A.C. de la hidroquinona es el 1,4-dihidroxibenceno; y otros nombres asignados a este compuesto son: 1,4-bencenodiol, p-dihidroxibenceno, hidroquinol, quinol, eldoquin, eldopaque y tecquinol³⁶⁷.

La hidroquinona se presenta en forma de cristales incoloros, inodoros y de sabor dulzaino³⁶⁸, que funden entre $170\text{-}171^\circ\text{C}$ con un punto de ebullición a 287°C . Es muy soluble en agua³⁶⁹ (1 g en 17 ml), alcohol (1 g en 4 ml), éter (1 g en 16.5 ml), cloroformo (1 g en 51 ml), glicerina y débilmente soluble en benceno.

La hidroquinona disuelta en metanol muestra una absorbancia máxima y mínima³⁰⁴ en el UV para longitudes de onda de 292 y 252 nm respectivamente.

La hidroquinona fue descubierta en 1880. De forma natural se encuentra en productos derivados del trigo, en el café, en el té, en frutas como el arándano, en vegetales como el brocoli, los espárragos, en el vino tinto, en algunas cervezas y en la hoja de la gayuba como glucósido del arbutósido, que por hidrólisis libera un difenol que inmediatamente se oxida a hidroquinona³⁷⁰.



Sintéticamente la hidroquinona se obtiene a partir de la oxidación de la anilina, por reducción de la quinona y por oxidación del fenol con persulfato³⁶⁷.

7.1.2. Estabilidad y degradación

La hidroquinona es estable en su forma cristalina y debe conservarse a temperatura ambiente en un recipiente hermético y protegido de la luz. Las disoluciones de hidroquinona en presencia de aire y de luz se oxidan adquiriendo una tonalidad marrón, que se acelera en medios alcalinos, donde estas disoluciones muestran un cierto grado de inestabilidad.

La estabilidad de las disoluciones acuosas de hidroquinona ha sido estudiada en nuestro laboratorio obteniendo espectros en el UV-visible periódicamente (n=8) durante 17 días. Para ello, se midieron las absorbancias de tres disoluciones de

hidroquinona 10.0 ppm en presencia de luz, en la oscuridad y en la nevera a 3°C. En todos los casos se realizó un espectro entre 200 y 350 nm, obteniéndose un máximo de absorbancia para 222 nm. Considerando los resultados obtenidos (espectros prácticamente superponibles) se concluye que las disoluciones acuosas de hidroquinona son estables al menos durante 15 días en las tres condiciones estudiadas.

7.1.3. Aplicaciones de la hidroquinona

La hidroquinona se utiliza principalmente en la industria fotográfica, en cosmética como despigmentante de la piel y antioxidante, al reducir la oxidación de las células, favorecer la eliminación de radicales libres y reforzar el sistema inmunológico.

a) En fotografía, la hidroquinona constituye uno de los principales componentes químicos de un revelador fotográfico en blanco y negro. Se emplea como agente reductor para producir las imágenes de alto contraste en presencia de una base fuerte y como agente revelador junto con otras sustancias como el metol, para producir el revelado propiamente dicho.

b) En cosmética, la hidroquinona se emplea como despigmentante dermatológico al impedir los procesos metabólicos de los melanocitos e inhibir la acción de la enzima tirosinasa que transforma la tirosina en melanina³⁷¹. Se puede afirmar pues, que la hidroquinona y sus derivados son inhibidores de la síntesis de la melanina.

La hidroquinona se emplea para aclarar áreas localizadas de la piel con hiperpigmentación melanínica, como lunares cutáneos, cicatrices, manchas del embarazo, pecas, lentigo y manchas asociadas a la vejez. La actividad antimelanínica de la hidroquinona es temporal debido a que sólo interfiere en la formación de nueva

melalina, de modo que es necesario repetir las aplicaciones exclusivamente en las superficies dañadas y evitar tratamientos prolongados (no más de tres meses), así como la exposición de las zonas tratadas a la radiación ultravioleta que causará una repigmentación, por esta razón la hidroquinona suele combinarse con protectores solares de amplio espectro.

Los agentes despigmentantes pueden causar irritación, dermatitis, eritema en personas con pieles muy sensibles y en tratamientos prolongados con altas dosis de hidroquinona se ha observado ocronosis exógena (alteración de la coloración cutánea), principalmente en individuos de raza negra, en donde la utilización de despigmentantes es un auténtico fenómeno social; de hecho se han desmantelado redes de comercio ilícito de blanqueadores. Por todas estas razones la Comunidad Económica Europea establece mediante la directiva 84/415³⁷², la cantidad máxima permitida de hidroquinona en productos cosméticos, fijada en 2% (p/p). Por último destacar que estos despigmentantes dermatológicos están contraindicados en presencia de quemaduras solares y no deben de ser administrados a niños menores de 12 años ni a las mujeres, durante el embarazo o la lactancia.

Además, la exposición constante y extrema a vapores de hidroquinona (como en el caso de personas que trabajan con esta sustancia) puede causar daño a los ojos, decoloración de los mismos e incluso problemas en la visión.

7.2. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN

7.2.1. Métodos volumétricos

La Farmacopea de Estados Unidos³⁷³ recomienda una valoración con sulfato de cerio 0.1 N, tras adicionar 250 mg de hidroquinona a 100 ml agua, 10 ml de ácido sulfúrico 0.1 N y unos gotas de difenilamina. El punto final se determina cuando el

indicador vira de rojo a violeta y de este modo 1 ml de sulfato de cerio consumido equivale a 5.506 mg de hidroquinona.

Satake y col.³⁷⁴ proponen una valoración redox para la determinación de hidroquinona, empleando como oxidante un derivado de hidantoína (1,3-dibromo-5-etil-metilhidantoína) en lugar de la N- bromosuccinimida³⁷⁵ y como indicador químico el negro de eriocromo. El punto final de la valoración se establece cuando el indicador cambia de color violeta a amarillo.

7.2.2. Métodos espectrofotométricos

Zhong y col.³⁷⁶ describen un método espectrofotométrico para la determinación de hidroquinona en crema. Para ello, es necesario realizar un pretratamiento de la muestra que consiste en disolver con 20 ml de anhídrido etanólico caliente una cantidad de la misma, enfriar la mezcla, filtrar y diluir el filtrado con etanol. Para posteriormente medir la absorbancia de la muestra a 295 nm. El intervalo de linealidad se establece desde 4 a 32 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la recuperación es del 99.4%.

La Farmacopea de Estados Unidos³⁷³ recomienda un método que permite la cuantificación de hidroquinona en cremas cuyo contenido en el principio activo no sea superior al 100%. Este básicamente consiste en pesar una cantidad de muestra equivalente a 20 mg de hidroquinona, triturarla con 50 ml de metanol, filtrarla y disolverla en 500 ml de metanol y realizar las diluciones oportunas para obtener una concentración de 10 ppm. Para finalmente medir las absorbancias de la muestra y de un patrón de hidroquinona de 10 ppm a 293 nm frente al blanco (metanol), calculando la cantidad de hidroquinona expresada en mg por gramo de crema mediante una fórmula especificada en la Farmacopea.

He y col.³⁷⁷ determinan la hidroquinona en presencia de fenol y catecol por espectrofotometría derivada. Para ello, miden la absorbancia de la mezcla entre 260 y 330 nm, calculan la primera derivada para cada uno de los tres componentes a 10 longitudes de onda y determinan la concentración de cada analito en la muestra resolviendo simultáneamente las tres ecuaciones. El intervalo de linealidad para la hidroquinona abarca desde 42.5 μM a 0.7 mM y presenta una recuperación del 98.6 y 100.1%.

Afkhami y col.³⁷⁸ desarrollan un método cinético basado en la reacción con nitrito, que permite la cuantificación de hidroquinona en formulaciones farmacéuticas, mediante la determinación del nitrito no reaccionado con el rojo neutro y la posterior medida a tiempo fijo de la disminución de la absorbancia a 530 nm.

Otros autores³⁷⁹ determinan el principio activo utilizando reactivos como el Ce (IV) y el Arsenazo (III). Con este propósito, la muestra se trata con 200 μg de Ce (IV) y se ajusta a un pH entre 3 y 4, a continuación se adicionan 4.6 ml de arsenazo (III) 0.05% y se diluye hasta 50 ml con agua, para finalmente medir la absorbancia a 655 nm frente al blanco. En este caso el intervalo de linealidad se fija entre 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Muralikrishna³⁸⁰ propone un nuevo reactivo analítico que permite la determinación espectrofotométrica de la hidroquinona, al hacer reaccionar exclusivamente el ácido fosfovanadotungstico con la muestra a pH 1.5, midiendo la disminución de la absorbancia producida a una longitud de onda de 360 nm. Las gráficas de calibrado son lineales entre 1 y 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Cabe destacar que se han desarrollado otros métodos^{381,382} espectrofotométricos que permiten la determinación de trazas de hidroquinona en aguas residuales.

7.2.3. Técnicas de separación

a) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se han utilizado métodos de HPLC para determinar hidroquinona en productos cosméticos, orina, reveladores fotográficos, y en el tabaco entre otras muestras.

Gagliardi y col.³⁸³ proponen un método que permite la identificación y cuantificación de hidroquinona en cremas tonificantes para la piel mediante cromatografía líquida en fase inversa con detección a 294 nm. La separación cromatográfica tiene lugar en una columna Erbasil C-18 empleando acetronitrilo-agua (5:95) como fase móvil y el 2-fenilfenol como patrón interno. Firth³⁸⁴ describe otro método que permite la cuantificación de hidroquinona a 226 nm en este mismo tipo de muestras, mediante una columna rellena de S5-ODS y metanol al 10% como fase móvil.

Borremas y col.³⁸⁵ determinan hidroquinona y éteres derivados del fenol en productos cosméticos. Como pretratamiento de la muestra, es necesario disolver en caliente una cantidad de la misma con 25 ml de metanol-agua (1:1), enfriar, diluir hasta 50 ml con metanol-agua (1:1) y filtrar, para separar los compuestos en tan sólo nueve minutos mediante una columna de Fenil Bondapak, utilizando THF-agua (9:11) como fase móvil y detección a 295 nm.

La hidroquinona se ha determinado en la orina³⁸⁶ de trabajadores expuestos al benceno, mediante HPLC con una columna Hitachi 3056 (15 cm x 3 mm) a 45 °C, acetronitrilo-ácido acético-agua (30:3:167) como fase móvil y detección a 280 nm. Con este método el límite de detección se establece en 1 mg·l⁻¹. Lee³⁸⁷ describe otro trabajo en donde también se determina la hidroquinona en orina de fumadores de tabaco y trabajadores de refinerías de petróleo mediante cromatografía líquida de alta resolución y detección fluorimétrica.

Otros autores³⁸⁸ emplean la detección amperométrica para determinar los pares iónicos formados entre la hidroquinona y el metol de un revelador fotográfico, con un componente de la fase móvil. El intervalo de linealidad se establece entre 15 y 100 mM.

Cui y col.³⁸⁹ proponen un método que permite la determinación de hidroquinona y otros polifenoles en tabaco mediante HPLC. Los distintos compuestos se separan con una columna RP-C18 a 37°C utilizando distintos gradientes de elución como fase móvil, para finalmente ser detectados debido a la capacidad de estos polifenoles para inhibir la quimioluminiscencia producida por el sistema luminol-hexacianoferrato (III).

b) Cromatografía en capa fina (TLC)

Sharma y col.³⁵¹ describen la separación e identificación de hidroquinona de una disolución de compuestos fenólicos mediante cromatografía en capa fina. Con este fin se emplean placas de sílica gel, benceno-dioxano-acido acético (85:15:1) como fase móvil y reactivos como el vapor de yodo, cloruro férrico para revelar las manchas.

Otros autores³⁹⁰ determinan simultáneamente hidroquinona, pirocatecol y 2-naftol por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Una porción de muestra disuelta en metanol se aplica a la placa, se eluye con tolueno-etilacetato (80:20) y se detecta espectrofotométrica a 254 nm.

Existe en la bibliografía otro trabajo³⁹¹ que identifica y separa la hidroquinona por TLC, empleando como disolvente para el desarrollo cromatográfico una mezcla de benceno-dioxano-ácido acético glacial (90:25:4) y para visualizar las manchas una pequeña cantidad de *o*-toluidina diazotizada pulverizada.

c) Cromatografía electrocinética micelar (MECC)

Los primeros estudios de la separación electrocinética con micelas en un capilar modelo tubo abierto fueron desarrollados por Terabe y col.³⁹² en 1984. Estos autores describen un método que permite la separación y cuantificación a 270 nm de derivados fenólicos como la hidroquinona y nitrocompuestos de bajo peso molecular mediante el uso de un tensoactivo aniónico, como el sodio dodecilsulfato, presente a una concentración en la que se formen las micelas en una disolución reguladora de tampón fosfato-borato.

Sakodinskaya y col.³⁹³ proponen la MECC para la determinación de hidroquinona y otros éteres derivados de la misma en cremas tonificantes para la piel. Para ello utilizan un capilar de sílice fundida, tampón borato 0.01 M como disolución reguladora al que se le adiciona sodio dodecilsulfato en concentración superior a la cmc (75 mM) y metanol al 10% para mejorar la capacidad de resolución. La detección tiene lugar a 254 nm, utilizando la cafeína como patrón interno. El intervalo de linealidad para la hidroquinona se establece entre 0.05 mM y 0.8 mM.

d) Electrocromatografía capilar (CEC)

Desiderio y col.³⁹⁴ utilizan la electrocromatografía capilar para la cuantificación de hidroquinona y otros éteres derivados de la hidroquinona en productos cosméticos. Mediante un capilar de sílice fundida relleno de octadecilsilica (ODS) como fase estacionaria y acetato amónico-acetonitrilo como fase móvil, mediante la cual se consigue un adecuado flujo electrosmótico que permite separar y cuantificar a 205 nm los distintos analitos en menos de 6 minutos. Las gráficas de calibrado son lineales entre 5 y 90 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

7.2.4. Métodos electroquímicos

Wang³⁹⁵ emplea un electrodo de pasta de carbón para la determinación de agentes despigmentantes como la hidroquinona en productos cosméticos mediante voltametría de pulso diferencial. Con este propósito se pesa una cantidad de muestra, se mezcla con 10 ml de etanol, se calienta a 40°C hasta completa disolución, se centrifuga y el sobrenadante se diluye con 10 ml de etanol. Una alícuota de la disolución se mezcla en la celda voltamétrica con 10 ml de tampón fosfato 0.1 M y se desairea con N₂ durante 4 minutos. La preconcentración se realiza en el electrodo de pasta de carbono entre 0.0 y 1.0 voltios durante 60 segundos en agitación. Posteriormente, la determinación por voltametría de pulso diferencial se realiza en tampón fosfato 0.1 M a +0.22 V, para la hidroquinona, empleándose un electrodo de calomelanos saturado de referencia. El intervalo de linealidad para la hidroquinona se establece entre 0.07 a 8.8 mg·l⁻¹.

Zhao y col.³⁹⁶ estudian el comportamiento electroquímico de la hidroquinona por voltametría cíclica, mediante un electrodo modificado preparado por electropolimerización del ácido sulfosalicílico en un electrodo de carbono vítreo frente a un electrodo de Ag/AgCl. La gráfica de calibrado es lineal entre 2 μM y 0.4 mM.

La voltametría con preconcentración y redisolución (stripping)³⁹⁷ mediante un electrodo de pasta de carbón ha sido aplicada con éxito a la determinación simultánea de trazas de metal y hidroquinona en aguas residuales.

7.2.5. Análisis por inyección en flujo F.I.A.

Nakagama²⁹⁷ realiza un barrido con la hidroquinona entre otros compuestos orgánicos y diversos sistemas oxidantes, con el objetivo de obtener una señal quimioluminiscente a partir del producto de una reacción de oxidación. Los

sistemas oxidantes especialmente quimioluminiscentes para la hidroquinona son $S_2O_8^{2-}$ 0.1 M con NaOH 0.1 M y Ag(I) 0.1 mM; H_2O_2 0.3% con NaOH 1mM/ acetronitrilo 50% y Fe(II) 0.1 mM; H_2O_2 0.3% con NaOH 0.01 M/ bromuro de didodecilmetilamonio 0.01 M y Co(II) 0.1 mM.

Du y col.³⁹⁸ han propuesto un método F.I.A. de análisis para la determinación de hidroquinona y otros compuestos fenólicos por quimioluminiscencia, debido al efecto catalítico del ferricianuro y ferrocianuro, que provocan un aumento en la señal quimioluminiscente procedente de la reacción entre estos compuestos y el luminol. Según los autores la reacción puede ser catalizada por el ferricianuro potásico, pero la señal del blanco se incrementa en ausencia de ferrocianuro potásico, porque el ferricianuro potásico puede oxidar también al luminol para generar una fuerte quimioluminiscencia en medio alcalino. El límite de detección establecido para la hidroquinona es de $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Zhou y Wang³⁹⁹ describen un método para la determinación de hidroquinona que incorpora detección amperométrica. La muestra (10 μl) se inserta en un portador de tampón fosfato 0.05 M (pH 7) con metanol al 5% y EDTA 25 mM, para ser detectada en +0.1 V en una celda amperométrica, constituida por un electrodo de carbón vítreo cubierto de cristales de cloruro cuproso junto con un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de platino. El intervalo de linealidad está comprendido entre 2 y 1000 ng y el límite de detección se establece en 1 ng.

Satake y col.⁴⁰⁰ determinan hidroquinona, catecol, resorcinol y pirogalol mediante la metodología F.I.A. y detección amperométrica. El método consiste en insertar 20 μl de muestra en un portador de agua desionizada a $1.14 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, para mezclarse a continuación con una disolución de KIO_3 0.1 mM y KBr 0.42 M en H_2SO_4 a $0.35 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Finalmente la disminución de la concentración de KIO_3 es detectada a + 0.65V en un electrodo de platino.

PARTE EXPERIMENTAL

7.3. ENSAYOS PREVIOS EN FLUJO CONTINUO

Teniendo presente que la intensidad de la señal quimioluminiscente depende del tiempo transcurrido desde el inicio de la reacción⁸² los ensayos previos se llevaron a cabo a tiempo fijo y según la relación de los caudales, en el sistema en flujo continuo que se representa en al Figura 7.2.

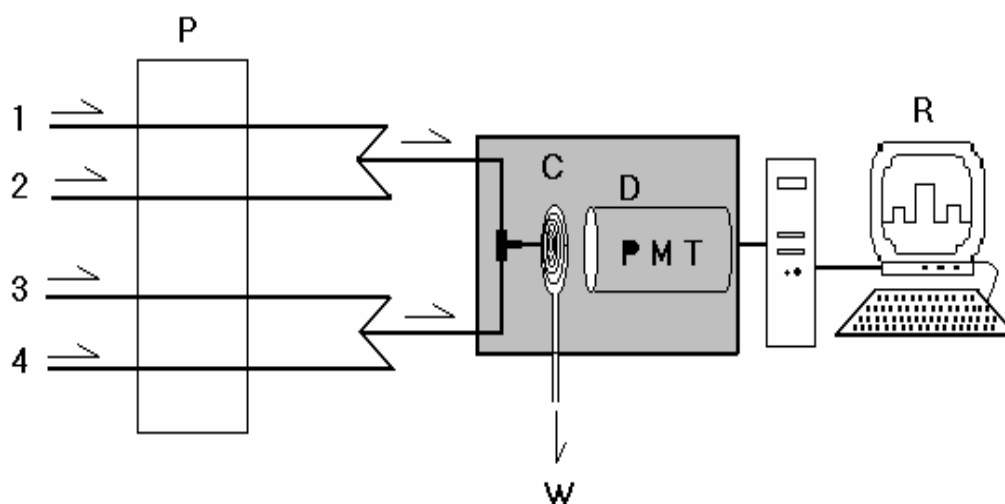


Figura 7.2: Montaje en flujo continuo utilizado en los ensayos previos.

Canal 1: Disolución acuosa de hidroquinona (blanco, agua desionizada); **Canal 2 y 3:** Disolución para ajustar el medio de reacción; **Canal 4:** Oxidante; **P:** Bomba peristáltica; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de datos.

Hay que destacar que en todas las experiencias desarrolladas, la señal analítica expresada en kHz se calculó por diferencia entre la que presentaba la muestra y la generada por el blanco (agua desionizada por el canal 1).

7.3.1. Estudio del sistema oxidante

Con el fin de establecer el sistema oxidante más adecuado para la reacción quimioluminiscente con la hidroquinona, se ensayaron distintos oxidantes fuertes en medio ácido y básico mediante el montaje en flujo continuo descrito en la Figura 7.2.

Las condiciones de esta experiencia así como los resultados obtenidos, se encuentran descritos en el apartado 4.3.3 del capítulo cuarto (conectividad molecular aplicada a la predicción de quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles), concretamente en la Tabla 4.3; en dicha tabla puede apreciarse que prácticamente sólo el permanganato potásico $0.02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en medio ácido sulfúrico $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ producía una señal quimioluminiscente considerable, seleccionándose como oxidante del nuevo sistema analítico para la determinación de hidroquinona.

7.3.2. Influencia de la concentración de oxidante

La concentración del oxidante es una variable muy crítica en los sistemas quimioluminiscentes, ya que una concentración excesivamente baja del oxidante puede disminuir la señal quimioluminiscente o incluso no producirla, mientras que a concentraciones elevadas puede llevar asociados problemas de autoabsorción de la emisión quimioluminiscente por el propio oxidante.

Por esta razón se decidió estudiar la influencia de la concentración del permanganato potásico con el montaje en flujo continuo descrito en la Figura 7.2. El intervalo de concentraciones ensayadas fue el mismo que cuando se efectuó el estudio del comportamiento de los fenoles y polifenoles frente al permanganato potásico en medio ácido (apartado 4.4, capítulo cuarto), este intervalo estuvo comprendido entre 1.0×10^{-4} y $5.0 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($-\log C=4$ a $-\log C=1.3$), pero en este caso para obtener una mayor información, con cada concentración de oxidante se realizó un calibrado de hidroquinona.

Como se observa en la Figura 7.3 las señales quimioluminiscentes para una concentración de $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ($-\log C = 2.3$) eran mayores, por ello, se seleccionó como concentración óptima de oxidante para el desarrollo del posterior trabajo.

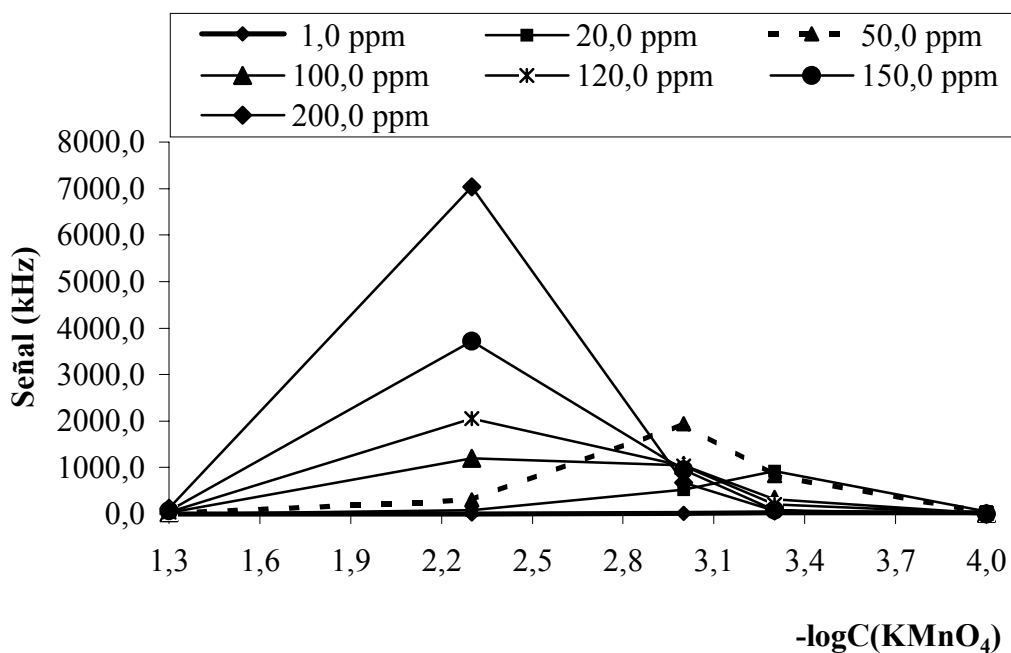


Figura 7.3: Influencia de la concentración de oxidante para distintas concentraciones de analito.

7.3.3. Influencia de la naturaleza del medio de reacción

Una vez seleccionada la concentración de permanganato potásico, y puesto que la reacción quimioluminiscente tenía lugar en medio ácido, con el mismo sistema en flujo continuo se estudió la influencia de la naturaleza del medio. Para ello, se ensayaron H_2SO_4 , HNO_3 , H_3PO_4 , HClO_4 y HCl todos ellos a la misma concentración 1.0 mol l^{-1} , circulando por los canales 3 y 4 de la Figura 7.2. Este ensayo se realizó empleando una disolución acuosa de hidroquinona de 150.0 ppm.

Como se observa en la Figura 7.4, la menor señal analítica correspondió al H_3PO_4 , por lo que se descartó.

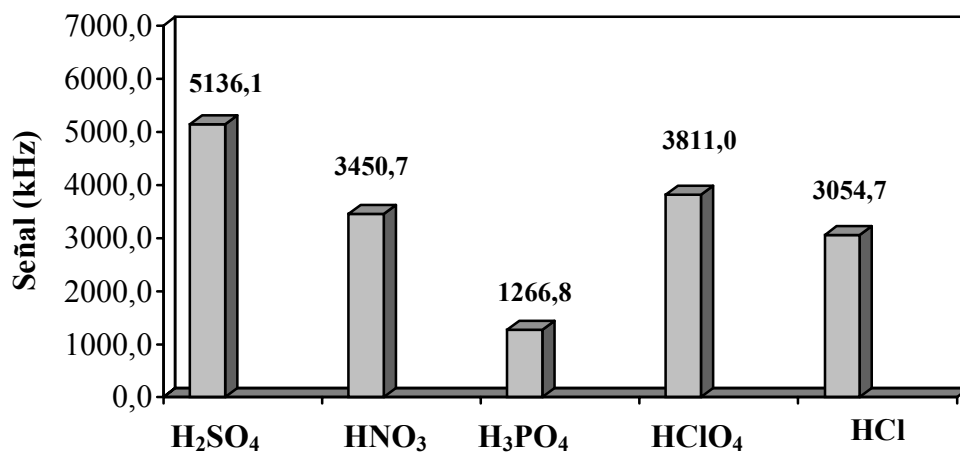


Figura 7.4: Influencia del medio ácido.

Posteriormente, se decidió realizar un calibrado de hidroquinona para cada uno de los medios ácidos. Según los resultados que se muestran en la Figura 7.5, se seleccionó como medio de la reacción quimioluminiscente el H_2SO_4 , por ofrecer señales quimioluminiscentes más elevadas.

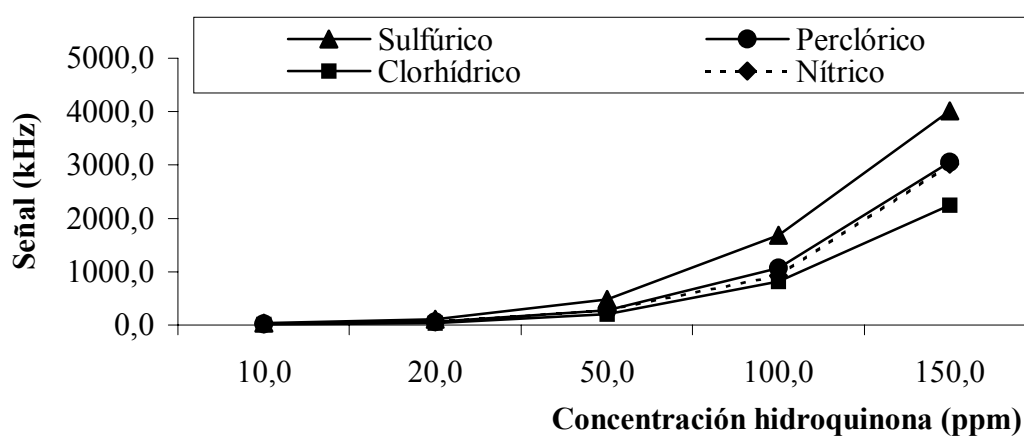


Figura 7.5: Variación de la concentración de analito con diferentes medios ácidos.

7.3.4. Estudio de la concentración del medio de reacción

Una vez seleccionado el medio de reacción, se estudió la influencia de la concentración de ácido sulfúrico. Para llevar a cabo este ensayo se varió la concentración del medio entre 0.05 y 2.00 mol·l⁻¹ y se realizó un calibrado de hidroquinona con cada uno de los puntos experimentales.

Como se muestra en la Figura 7.6, las señales analíticas eran mayores conforme se incrementaba la concentración de H₂SO₄, no obstante las diferencias eran mínimas entre 0.5 y 2.0 mol·l⁻¹. Por otro lado trabajar a concentraciones de medio ácido sulfúrico superiores a 1.0 mol l⁻¹, podía suponer problemas prácticos de rotura frecuente de tubos de bomba. Por todo ello, finalmente se seleccionó como concentración óptima 0.6 mol·l⁻¹, situada dentro del intervalo 0.5-1.0 mol·l⁻¹, donde se habían obtenido las máximas señales analíticas.

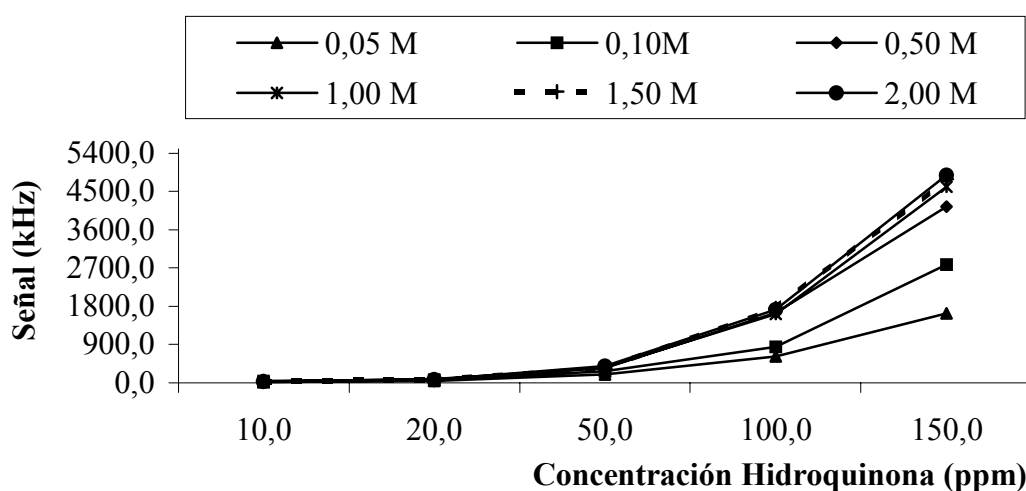


Figura 7.6: Influencia de la concentración de ácido sulfúrico

7.3.5. Influencia de la temperatura

A continuación se estudió la influencia de la temperatura en el sistema quimioluminiscente. Para ello se sumergieron 2.0 metros de tubo de PTFE en un

baño de agua termostataado a la salida de cada una de las dos confluencias del canal 1-2 y del canal 3-4 correspondientes al montaje en flujo continuo de la Figura 7.2.

Para dos concentraciones de hidroquinona se estudiaron las siguientes temperaturas: ambiente (24.0°C), 40.0°C, 60.0°C y 80.0°C; no se ensayaron temperaturas superiores a 80.0°C, para evitar en la medida de lo posible la formación de burbujas, al estar el sistema a temperaturas próximas a la ebullición.

Los resultados de la Figura 7.7 mostraron que a medida que aumentaba la temperatura la señal analítica disminuía, por esta razón se decidió en principio trabajar a temperatura ambiente.

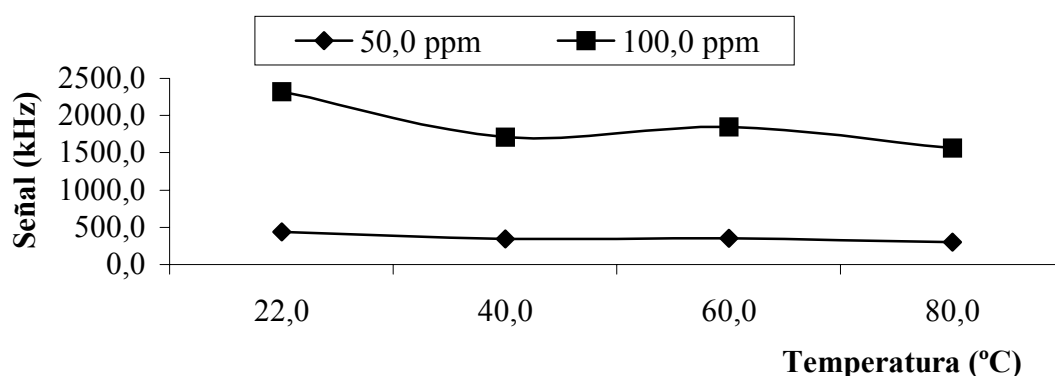


Figura 7.7: Influencia de la temperatura.

La composición preliminar del montaje en flujo continuo descrito en la Figura 7.2 fue la siguiente:

Canal	Disoluciones	Caudal (ml·min ⁻¹)
1	Disolución acuosa de hidroquinona	2.8
2	H ₂ SO ₄ 0.6 mol·l ⁻¹	2.8
3	H ₂ SO ₄ 0.6 mol·l ⁻¹	2.8
4	KMnO ₄ 5.0x10 ⁻³ mol·l ⁻¹	2.8

Tabla 7.1: Composición preliminar del sistema en flujo continuo.

7.4. ENSAYOS EN FLUJO POR MULTICOMMUTACIÓN

7.4.1. Pruebas previas con multicommutación

El siguiente ensayo consistió en adecuar las variables químicas previamente optimizadas en el sistema en flujo continuo a un montaje con válvulas solenoide, donde el tiempo que circulaban la muestra y los reactivos a través del sistema era controlado vía “software” mediante dos posiciones distintas ON/OFF de la válvula, de esta forma, se conseguía insertar alternativamente un bolo o fragmentos de muestra y de reactivo, en el portador o en la corriente portador-reactivo.

Así que en la celda de flujo se mantenían las mismas concentraciones finales de los reactivos optimizadas en el sistema en flujo continuo (Figura 7.2, Tabla 7.1), la única modificación era que las disoluciones de muestra y oxidante se preparaban en medio ácido.

En primer lugar se estudiaron *tres montajes* que se diferenciaban en el número de válvulas, de canales y en la ubicación de la bomba peristáltica. Para cada uno de los montajes se optimizó mediante el método multivariante *Simplex Modificado*, las variables propias de la multicommutación como son: el caudal, el tiempo en el que la válvula se encuentra en la posición ON/OFF para controlar de esta manera el volumen de muestra o de reactivos insertados en el sistema, así como el número de fragmentos de oxidante y de muestra intercalados en el portador o en la corriente portador-reactivo.

7.4.1.1. Simplex Modificado para el primer montaje

Este primer montaje se caracterizaba por tener una única válvula solenoide, ubicada dentro del luminómetro lo más cerca posible de la celda de flujo para evitar

la dispersión de la muestra. Además, las disoluciones eran aspiradas por la bomba peristáltica ubicada después del detector. El montaje descrito se encuentra en la Figura 7.8.

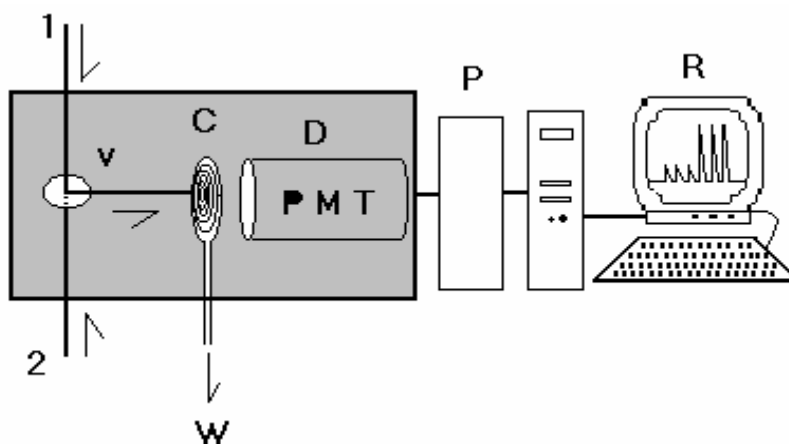


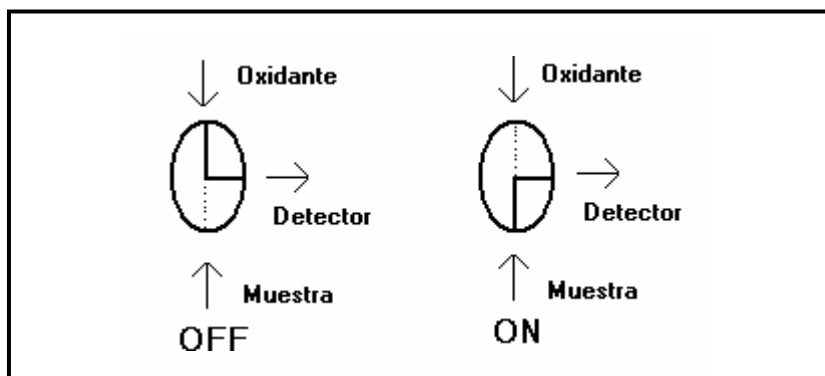
Figura 7.8: Primer montaje.

Canal 1: KMnO_4 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; **Canal 2:** Hidroquinona en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; **V:** Válvula solenoide; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** desecho; **P:** Bomba peristáltica; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

Las válvulas solenoide se comportaban como interruptores entre dos estados de posición ON/OFF; cuando la válvula se encontraba en posición OFF la solución de oxidante era aspirada hacia el detector, un impulso eléctrico de una longitud determinaba el tiempo en el que la válvula permanecía en la posición ON, siendo insertada la muestra en el sistema. Los volúmenes de muestra y de oxidante incorporados al sistema podían ser modificados cambiando la secuencia de inserción, de esta forma segmentos de muestra de la misma o distinta longitud eran intercalados alternativamente en la disolución de oxidante.

Las posiciones de la válvula en este montaje, que regulaban la entrada del oxidante o de la muestra al sistema se encuentran detalladas en la Figura 7.9.

Figura 7.9: Posiciones y funcionamiento de la válvula.



En multicommutación tanto la secuencia como los perfiles de inserción, aportan mayor información sobre el funcionamiento de las válvulas solenoide. En la Figura 7.10 y 7.11 se observa como cada cierto intervalo, controlado por el tiempo en que la válvula está en posición OFF/ON, cuatro fragmentos de oxidante se insertan alternativamente con cuatro segmentos de muestra para obtener tras su posterior mezclado en la celda de flujo un pico representativo de la señal quimioluminiscente.



Figura 7.10: Secuencia de inserción.



Figura 7.11: Perfil de inserción.

El simplex modificado se realizó con objeto de encontrar una combinación de las variables que generaran una mejor señal quimioluminiscente. Las variables estudiadas fueron: caudal de muestra y oxidante (Q), tamaño o volumen del permanganato potásico (Tk), tamaño o volumen de muestra (Tm), número de segmentos de muestra (Sm) y número de segmentos de oxidante (Sk). Los intervalos de cada variable se recogen en la Tabla 7.2.

Variable	Intervalo estudiado
Q (ml·min ⁻¹)	2.8-7.7
Tk (s)	0.06-1.00
Tm (s)	0.06-1.00
Sk	2-16
Sm	2-16

Tabla 7.2: Intervalos estudiados para cada variable en el simplex.

En la Tabla 7.3 se muestran los resultados del simplex junto con las señales y las desviaciones estándar relativa obtenidas para cada vértice tomadas como la señal media de 10 picos para 50.0 ppm de hidroquinona. Con este primer montaje se obtuvieron 16 vértices no nulos. En negrita se destacan las combinaciones que produjeron una mayor señal quimioluminiscente.

Vértice	Q(ml·min ⁻¹)	Tk (s)	Tm (s)	Sk	Sm	Señal (kHz)	dsr(%)
1	2.8	0.06	0.06	2	2	3.6	10.1
2	7.2	0.20	0.20	5	5	204.7	1.9
3	3.7	0.90	0.20	5	5	22.6	7.1
4	3.7	0.20	0.90	5	5	686.2	1.6
5	7.2	0.30	0.30	5	5	276.0	2.7
6	3.7	0.90	0.30	5	5	67.5	2.1
7	3.7	0.30	0.90	5	5	845.0	2.3
8	3.7	0.30	0.30	14	14	618.0	3.1
9	4.7	0.40	0.40	7	7	483.3	2.4
10	6.7	0.80	0.80	13	13	1668.2	2.0
11	4.7	0.43	0.43	7	7	585.8	1.4
12	4.9	0.30	0.47	8	8	1270.3	2.9
13	4.9	0.31	0.47	8	8	1066.6	1.5
14	4.2	0.31	0.52	9	9	1183.2	1.5
15	7.2	0.26	0.26	5	5	507.8	2.7
16	7.2	0.27	0.27	5	5	425.8	4.5

Tabla 7.3: Resultados del simplex con el primer montaje.

7.4.1.2. Simplex Modificado para el segundo montaje

Este segundo montaje se caracterizaba por tener dos válvulas solenoide en paralelo, ubicadas dentro del luminómetro lo más cerca posible de la celda de flujo para evitar la dispersión de la muestra, además, las disoluciones eran impulsadas por la bomba peristáltica. El montaje se muestra en la Figura 7.12.

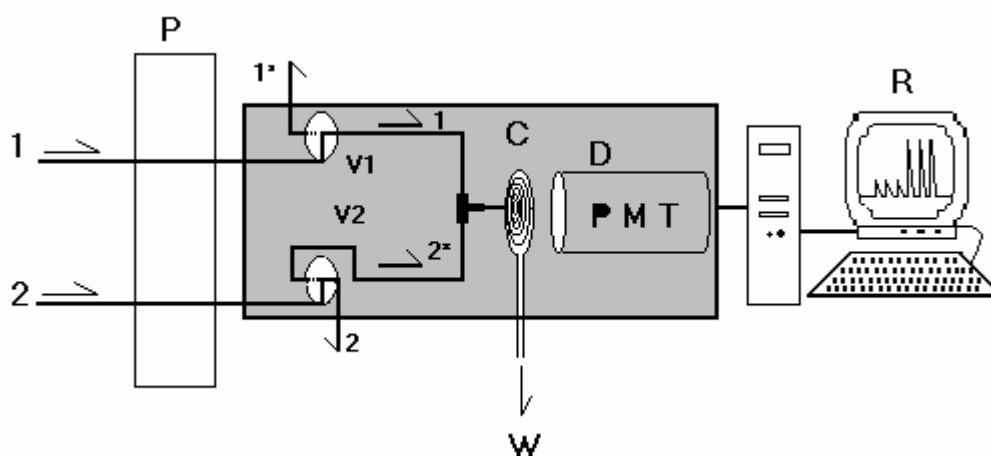


Figura 7.12: Segundo montaje.

Canal 1: KMnO_4 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (posición OFF 1 hacia el detector, en posición ON 1* se recircula o desecho); **Canal 2:** Hidroquinona en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (posición OFF 2 desecho o recircula, posición ON 2* hacia el detector); **P:** Bomba peristáltica; **V1:** Válvula solenoide 1; **V2:** Válvula solenoide 2; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

En este montaje el funcionamiento de las válvulas fue el siguiente:

Válvula 1

- En posición OFF el permanganato en medio ácido sulfúrico era impulsado hacia la confluencia en forma de T ubicada delante de la celda de flujo.
- En posición ON dicha disolución era impulsada hacia el desecho o se recirculaba.

Válvula 2

- En posición OFF la muestra era impulsada hacia el desecho o se recirculaba.
- En posición ON la muestra se impulsada hacia la confluencia en forma de T ubicada delante de la celda de flujo.

Las posiciones de las válvulas que regulaban la inserción alternativa de fragmentos de muestra y oxidante se encuentran detalladas en la Figura 7.13.

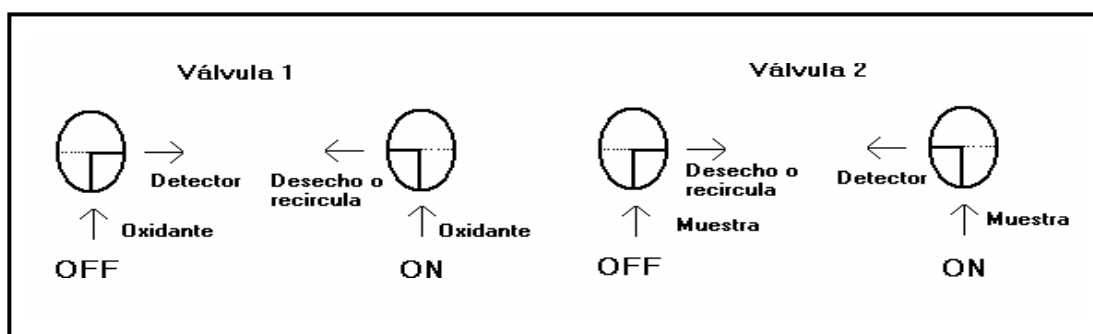


Figura 7.13: Posiciones y funcionamiento de las válvulas solenoide.

En las Figura 7.14 se observa la secuencia y el perfil de inserción de cinco segmentos de oxidante y muestra incorporados alternativamente en el sistema, controlados vía “software” por el tiempo en que las válvulas 1 y 2 se encontraban en posición OFF, para insertar exclusivamente el KMnO_4 y en posición ON para introducir los fragmentos de muestra, de forma que tras su mezclado en la celda de flujo se obtuviera la señal quimioluminiscente.

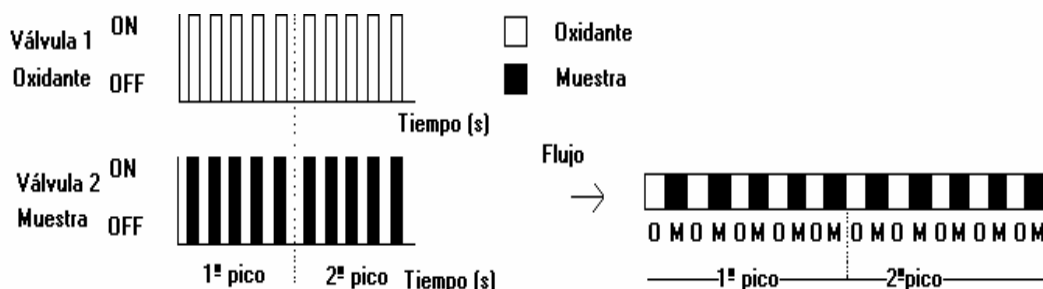


Figura 7.14: Secuencia y perfil de inserción del segundo montaje.

Las variables y los intervalos a estudiar en este simplex fueron los mismos que los descritos para el primer montaje (Tabla 7.2), para poder comparar los resultados obtenidos con el montaje anterior y seleccionar el óptimo.

En la Tabla 7.4 se recogen los resultados del simplex junto con las señales y las desviaciones estándar relativa obtenidas para cada vértice tomadas como la señal media de 10 picos para 50.0 ppm de hidroquinona. Con este segundo montaje se obtuvieron 19 vértices no nulos.

Vértice	Q(ml·min ⁻¹)	Tk (s)	Tm (s)	Sk	Sm	Señal (kHz)	dsr(%)
1	2.8	0.06	0.06	2	2	3.1	19.8
2	5.9	0.26	0.26	5	5	360.2	3.8
3	3.4	0.93	0.26	5	5	116.3	3.6
4	3.4	0.26	0.93	5	5	855.1	2.9
5	3.4	0.30	0.30	14	14	827.7	1.5
6	4.0	0.40	0.40	7	7	649.2	2.0
7	5.7	0.80	0.80	13	13	1842.6	4.1
8	4.2	0.30	0.40	8	8	874.0	4.6
9	4.0	0.30	0.50	8	8	944.4	2.9
10	3.7	0.30	0.50	9	9	1029.6	2.3
11	3.4	0.10	0.30	10	10	901.4	1.6
12	3.7	0.30	0.60	7	7	927.8	1.3
13	3.7	0.20	0.40	10	10	888.0	3.6
14	4.2	0.30	0.06	13	13	36.2	5.5
15	3.1	0.20	0.60	10	10	939.1	2.2
16	3.7	0.30	0.60	6	6	728.0	2.8
17	4.0	0.30	0.60	6	6	761.0	2.3
18	3.7	0.30	0.50	9	9	902.0	5.0
19	3.7	0.30	0.40	10	10	757.0	2.1

Tabla 7.4: Resultados del simplex con el segundo montaje. Las combinaciones que produjeron una mayor señal se destacan en negrita.

7.4.1.3 Simplex Modificado para el tercer montaje

El tercer montaje constaba de tres válvulas solenoide en paralelo ubicadas dentro del luminómetro lo más cerca posible de la celda de flujo para minimizar la dispersión de la muestra, y se caracterizaba por insertar al mismo tiempo un único segmento de mayor o menor tamaño de la mezcla oxidante-muestra en una corriente de arrastre de agua. Además, las disoluciones reactivas eran impulsadas por la bomba peristáltica. En la Figura 7.15 se encuentra detallado el montaje.

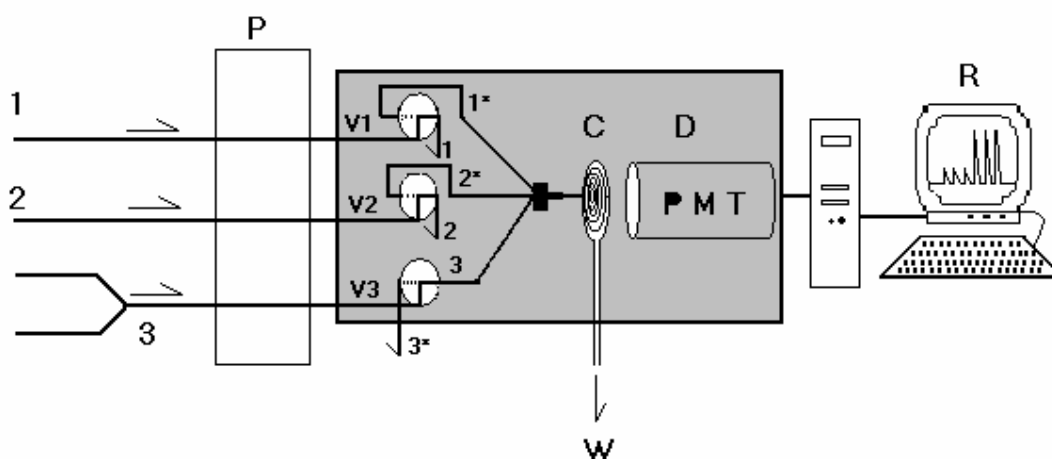


Figura 7.15: Tercer montaje.

Canal 1: KMnO_4 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (posición OFF 1 se recircula o desecho, posición ON 1* hacia el detector); **Canal 2:** Hidroquinona en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (posición OFF 2 se recircula o desecho, posición ON 2* hacia el detector); **Canal 3:** Agua (posición OFF 3 hacia el detector, posición ON 3* a desecho); **V1:** Válvula solenoide 1; **V2:** Válvula solenoide 2; **V3:** Válvula solenoide 3; **P:** Bomba peristáltica; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

Para poder comparar este nuevo simplex con los anteriores había que tener en cuenta que al insertar al mismo tiempo un bolo de muestra y de oxidante los caudales se duplicaban, por esta razón los caudales de la disolución de oxidante, muestra y agua se redujeron a la mitad, para que cuando confluyeran en la celda se mantuviera

la misma velocidad de flujo que en los montajes anteriores. En cuanto a la corriente de arrastre (agua) fue necesario incorporar dos canales que confluían en una confluencia en forma de punta de flecha, para que el caudal del agua cuando fuera impulsada hacia la celda de flujo, correspondiera con la misma velocidad de flujo a la que se insertaba el segmento de oxidante-muestra.

En este montaje el funcionamiento de las válvulas fue el siguiente:

Válvula 1

- En posición OFF la solución de oxidante era impulsada hacia el desecho o se recirculaba.
- En posición ON dicha disolución era impulsada hacia la confluencia de tres vías, ubicada delante de la celda de flujo.

Válvula 2

- En posición OFF la muestra era impulsada hacia el desecho o se recirculaba.
- En posición ON la muestra era impulsada, hacia la confluencia de tres vías, ubicada delante de la celda de flujo.

Válvula 3

- En posición OFF el agua era impulsada hacia la confluencia de tres vías, ubicada delante de la celda de flujo.
- En posición ON el agua era impulsada, hacia el desecho.

Las posiciones de las válvulas que permitían insertar al mismo tiempo un único fragmento de muestra y de oxidante en la corriente de agua para obtener un señal analítica en forma de pico, tras el posterior mezclado en la celda de flujo se describen en la Figura 7.16. En las Figura 7.17 se muestra la secuencia y el perfil de inserción de un segmento de oxidante y de muestra insertados cuando las válvulas 1, 2 y 3 se encontraban en posición ON.

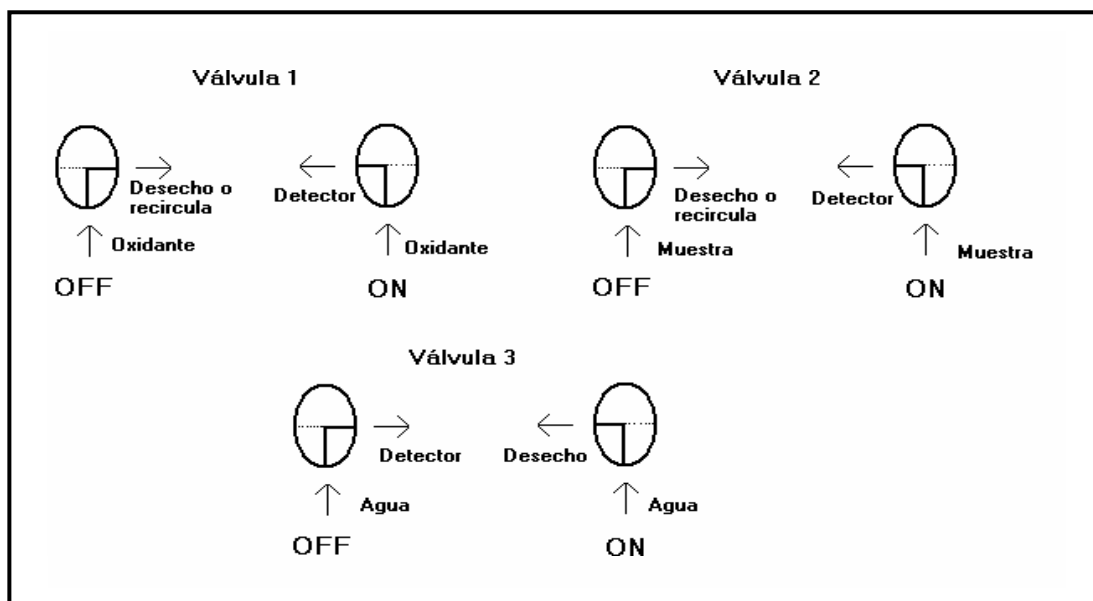


Figura 7.16: Posiciones y funcionamiento de las válvulas solenoide.

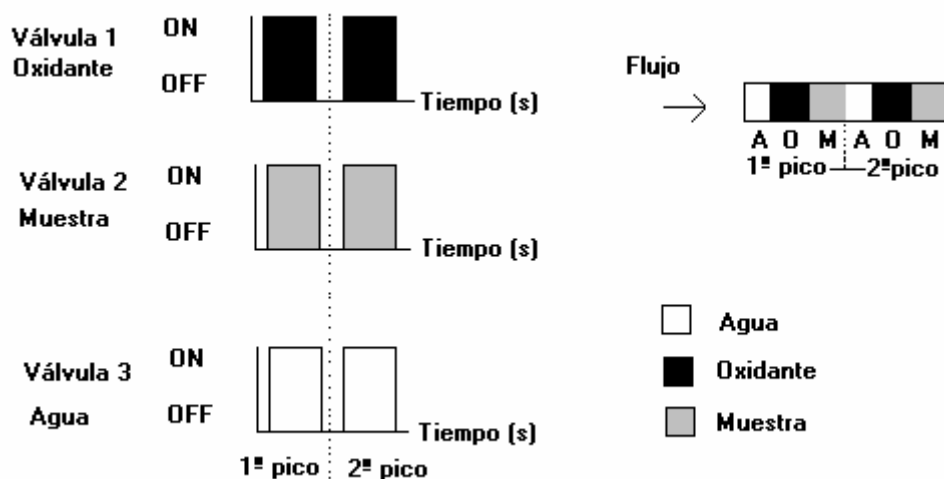


Figura 7.17: Secuencia y perfil de inserción del tercer montaje.

Las variables a estudiar en este nuevo simplex fueron: caudal de muestra, permanganato potásico y agua (Q), tamaño o volumen de muestra y permanganato potásico (T). Los intervalos de cada variable se recogen en la Tabla 7.5.

Variable	Intervalo estudiado
Q (ml·min ⁻¹)	1.4-3.8
T (s)	0.1-10

Tabla 7.5: Intervalos estudiados para cada variable en el simplex.

En la Tabla 7.6 se recogen los resultados del simplex junto con las señales y las desviaciones estándar relativa obtenidas para cada vértice tomadas como la señal media de 10 picos para 50.0 ppm de hidroquinona. Con este tercer montaje se obtuvieron 12 vértices no nulos.

Vértice	Q(ml·min ⁻¹)	T (s)	Señal (kHz)	dsr(%)
1	1.4	0.1	19.6	21.4
2	3.6	2.6	636.8	2.4
3	2.0	9.6	1035.2	2.5
4	2.9	6.1	865.9	3.2
5	2.5	8.0	926.6	4.6
6	2.8	6.5	787.7	4.9
7	2.2	9.2	1086.4	3.0
8	2.6	7.4	939.8	3.6
9	2.3	8.5	944.5	2.0
10	1.8	10.0	858.0	3.3
11	2.1	9.0	862.9	3.9
12	2.0	9.4	824.0	3.6

Tabla 7.6: Resultados del simplex con el tercer montaje.

7.4.1.4. Estudio de la reproducibilidad de los montajes

Entre las posibles combinaciones que aparecen descritas en las Tablas 7.3, 7.4 y 7.6, tras el simplex con cada uno de los tres montajes, se escogieron aquellos vértices que proporcionaban mayores señales analíticas y menor desviación estándar

relativa y se obtuvo un calibrado de hidroquinona ($n=4$) comprendido entre 5.0 y 50.0 ppm para las distintas combinaciones, además para cada concentración del calibrado se realizaron 15 picos para determinar a su vez, la desviación estándar relativa.

Montaje 1

De los vértices que mejores señales quimioluminiscentes presentaron, 7, 10, 12, 13 y 14 mostrados en la Tabla 7.3, se seleccionaron para su estudio el *vértice 7* que aunque la señal analítica era menor la reproducibilidad era bastante buena, el *vértice 10* y entre las combinaciones 12, 13, 14 que presentaban unas variables muy parecidas se escogió el *vértice 12* porque la señal analítica obtenida era mayor.

Vértice 7: Las disoluciones eran aspiradas a una velocidad de flujo de 3.7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 5 para cada uno y de un tamaño de 0.3 segundos para el permanganato y 0.9 segundos para la muestra.

Vértice 10: Las disoluciones eran aspiradas a una velocidad de flujo de 6.7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 13 para cada uno y del mismo tamaño 0.8 segundos.

Vértice 12: Las disoluciones eran aspiradas a una velocidad de flujo de 4.9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 8 para cada uno y de un tamaño de 0.30 segundos para el permanganato potásico y 0.47 segundos para la muestra.

Según los resultados mostrados en la Tabla 7.7, se seleccionó como combinación óptima el *vértice 7*, porque presentaba una mejor reproducibilidad aunque la sensibilidad fuera menor.

Vértice	Pendiente	Ordenada en el origen	r^2	dsr(%)			
				5.0 ppm	10.0 ppm	20.0 ppm	50.0 ppm
7	21.25	-114.55	0.9877	3.2	2.6	1.8	2.3
10	27.12	-124.34	0.9917	4.5	5.6	4.2	3.7
12	29.14	-185.21	0.9850	5.8	6.4	6.0	2.7

Tabla 7.7: Resultados de los calibrados con los vértices seleccionados en el primer montaje.

Montaje 2

De entre los vértices que mejor señal analítica presentaron, 7, 9, 10, 11, 12, 15 y 18 descritos en la Tabla 7.4, se seleccionaron los *vértices* 7, 11, entre las combinaciones 9 y 10 cuyas variables eran prácticamente iguales se eligió el *vértice* 10 porque el valor de la señal analítica obtenida era mayor, mientras que entre las combinaciones 12, 15, 18 cuyas señales quimioluminiscentes eran del mismo orden, se seleccionó el *vértice* 12 porque presentaba una menor desviación estándar relativa.

Vértice 7: Las disoluciones eran impulsadas a una velocidad de flujo de 5.7 ml·min⁻¹, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 13 para cada uno y del mismo tamaño 0.8 segundos.

Vértice 10: Las disoluciones eran impulsadas a una velocidad de flujo de 3.7 ml·min⁻¹, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 9 para cada uno, de un tamaño de 0.3 segundos para el oxidante y 0.5 segundos para la muestra.

Vértice 11: Las disoluciones eran impulsadas a una velocidad de flujo de 3.4 ml·min⁻¹, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 10 para cada uno, de un tamaño de 0.1 segundos para el oxidante y 0.3 segundos para la muestra.

Vértice 12: Las disoluciones eran impulsadas a una velocidad de flujo de 3.7 ml·min⁻¹, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 7 para cada uno, de un tamaño de 0.3 segundos para el oxidante y 0.6 segundos para la muestra.

En la Tabla 7.8 se muestran los resultados de los calibrados con las combinaciones del segundo montaje. De entre las cuatro posibles, se seleccionó el *vértice 7*, porque la pendiente del calibrado era mayor.

Vértice	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²	dsr(%)			
				5.0 ppm	10.0 ppm	20.0 ppm	50.0 ppm
7	28.41	-156.86	0.9807	4.4	4.8	4.3	2.9
10	18.24	-117.99	0.9855	5.8	6	4.5	4.3
11	16.12	-101.00	0.9919	5.7	4.9	4.2	3.5
12	19.52	-131.89	0.9809	4.1	5.1	4.8	2.8

Tabla 7.8: Resultados de los calibrados con los vértices seleccionados del segundo montaje.

Montaje 3

Los vértices que mejor señal analítica presentaron fueron 3, 5, 7, 8 y 9, como se observa en la Tabla 7.6 en todos los casos el valor de las señales era parecido, por esta razón se seleccionó el *vértice 9*, ya que presentaba una menor desviación estándar relativa. Los resultados se muestran en la Tabla 7.9.

Vértice 9: Las disoluciones eran impulsadas a una velocidad de flujo de 2.3 ml·min⁻¹, se insertaba un único segmento de la mezcla muestra-oxidante durante 8.5 segundos en la corriente de arrastre (agua).

Vértice	Pendiente	Ordenada en el origen	r^2	dsr(%)			
				5.0 ppm	10.0 ppm	20.0 ppm	50.0 ppm
9	20.5	-163.3	0.9604	3.07	2.6	3.7	1.9

Tabla 7.9: Resultado del calibrado con la mejor condición del tercer montaje.

Finalmente se compararon los valores de las pendientes de los calibrados para las condiciones seleccionadas con cada una de las tres configuraciones (Tablas 7.7, 7.8 y 7.9) y se observó que con el tercer montaje la pendiente del calibrado y el coeficiente de correlación obtenidos eran menor que con los otros dos montajes, esto se traducía en una disminución de la emisión quimioluminiscente cuando se insertaba al mismo tiempo un único segmento de muestra y oxidante, por esta razón se decidió insertar alternativamente diversos segmentos del mismo o distinto tamaño de las disoluciones de oxidante y de muestra, descartándose el tercer montaje.

7.4.1.5. Selección del montaje en flujo por multiconmutación

Una vez eliminado el tercer montaje, se decidió realizar más estudios con el primer y segundo montaje con el objeto de seleccionar aquella configuración, donde se encontrara el mejor compromiso entre la señal analítica y la reproducibilidad entre las medidas.

Para este nuevo estudio, se acopló en ambas configuraciones una válvula más por donde circulaba una corriente de arrastre de agua desionizada. De esta forma se reducía el consumo de permanganato potásico que en los montajes anteriores circulaba continuamente, salvo cuando se hacían inserciones de los segmentos de muestra.

Con esta modificación lo que fluía de manera continua era el agua y cada cierto tiempo se insertaban alternativamente fragmentos de muestra y de oxidante para obtener la señal analítica tras el posterior mezclado en la celda de flujo.

Montaje 1

En el primer montaje la nueva válvula se dispuso en serie con la anterior, lo más cerca posible de la celda de flujo para evitar la dispersión de la muestra, siendo las disoluciones reactivas aspiradas por la bomba peristáltica ubicada después del detector. El nuevo montaje se encuentra descrito en la Figura 7.18.

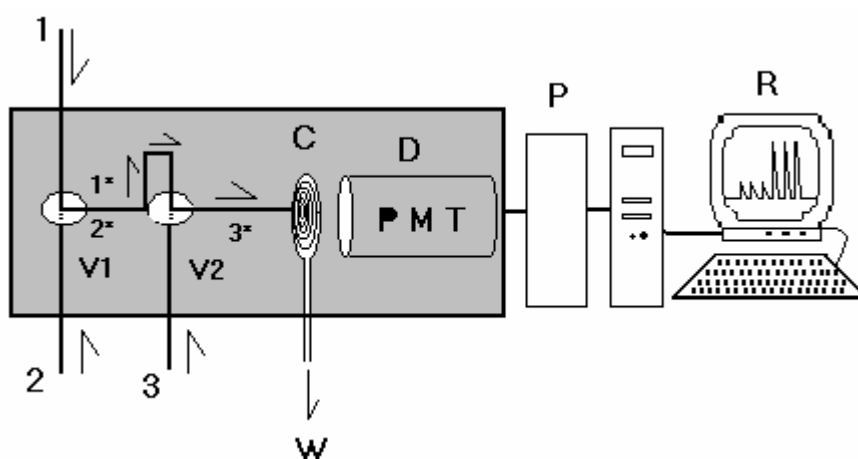


Figura 7.18: Modificación del primer montaje.

Canal 1: Corriente de arrastre (agua) (posición OFF 1* circula hacia la válvula 2 y posteriormente al detector); **Canal 2:** KMnO_4 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (posición ON 2* circula hacia la válvula 2 y a continuación hacia el detector); **Canal 3:** Hidroquinona en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (posición ON 3* circula hacia el detector); **V1:** Válvula solenoide 1; **V2:** Válvula solenoide 2; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho; **P:** Bomba peristáltica; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

El funcionamiento y la posición de las válvulas (Figura 7.19) con esta modificación del primer montaje se encuentra descrito a continuación:

Válvula 1

- En posición OFF el agua circulaba continuamente hacia la válvula 2, que se encontraba en posición OFF y de ahí al detector.

- En posición ON la disolución de permanganato potásico era aspirada hacia la válvula 2, que permanecía en posición OFF y posteriormente al detector.

Válvula 2

- En posición OFF el agua o la disolución de oxidante circulaba hacia el detector.
- En posición ON la muestra era aspirada hacia el detector.

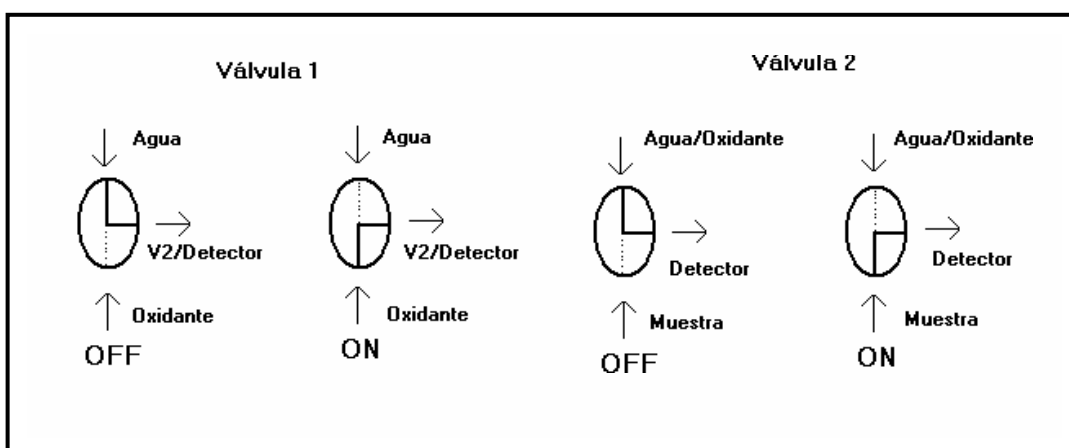


Figura 7.19: Posiciones y funcionamiento de las válvulas.

En este nuevo montaje y tomando como referencia las condiciones seleccionadas en los estudios anteriores, *vértice 7* (Tabla 7.7, apartado 7.4.1.4), las disoluciones eran aspiradas a una velocidad de flujo de $3.7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 5 para cada uno y de un tamaño de 0.3 segundos para el permanganato potásico y 0.9 segundos para la muestra.

En la secuencia de inserción descrita en la Figura 7.20 se observa como durante el primer segundo del ciclo, la válvula 1 se encontraba en posición OFF para que el agua circulara hacia el detector, para ello era necesario que en este periodo de tiempo la válvula 2 estuviera en posición OFF para permitir su paso. Transcurrido este primer segundo la válvula 1 conmutaba a posición ON y se mantenía en esta posición durante 6.2 segundos para que únicamente fuera aspirada la disolución de oxidante y pudieran ser insertados alternativamente 5 segmentos de oxidante y 5 de

muestra. Durante este intervalo de 6.2 segundos, los primeros 0.5 segundos la válvula 2 se mantenía en posición OFF para insertar un fragmento de 0.2 segundos de permanganato potásico que asegurara el llenado del tubo de PTFE que distaba entre la válvula 1 y 2 y el primer segmento de 0.3 segundos de la secuencia de inserción, ya que antes de insertar la muestra era necesario que en la celda de flujo hubiera permanganato para que reaccionaran. A partir de este momento, durante 5.7 segundos la válvula 2 cambiaba alternativamente de la posición OFF a ON para insertar fragmentos de muestra y de permanganato potásico. Una vez se había obtenido el pico, las dos válvulas conmutaban a la posición OFF y únicamente circulaba por el sistema el agua durante 27.8 segundos para restablecer la línea base, repitiéndose a los 35 segundos un nuevo ciclo para obtener otro pico. *El tiempo del ciclo* se denomina al tiempo necesario para obtener un pico, en este caso era de 35 segundos e incluye todos los intervalos de tiempo en los que las válvulas se encuentran en posición ON y OFF.

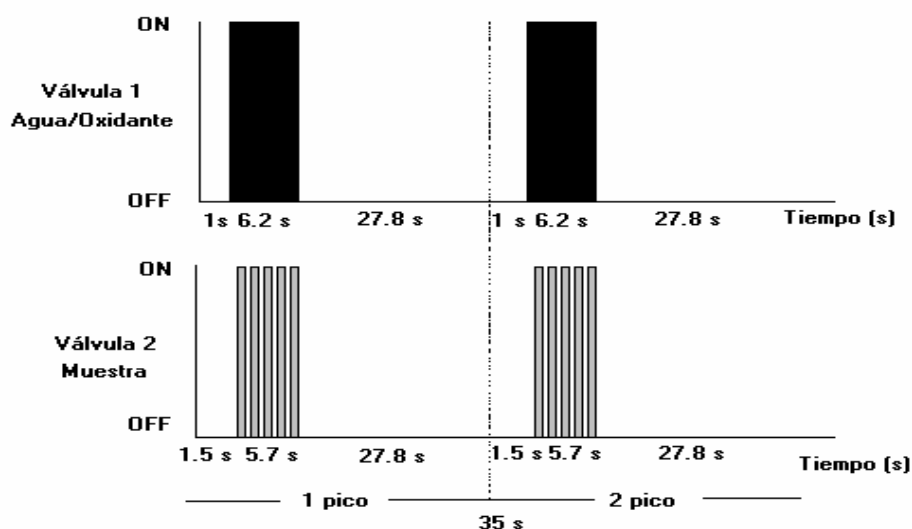


Figura 7.20: Secuencia de inserción.

En la Figura 7.21 se describe el perfil de inserción, donde se puede observar como se insertaban alternativamente 5 segmentos de oxidante y 5 segmentos de muestra ambos de distinto tamaño en la corriente de arrastre (agua) y como transcurrido el tiempo del ciclo (35 segundos) se repetía nuevamente la secuencia de inserción.

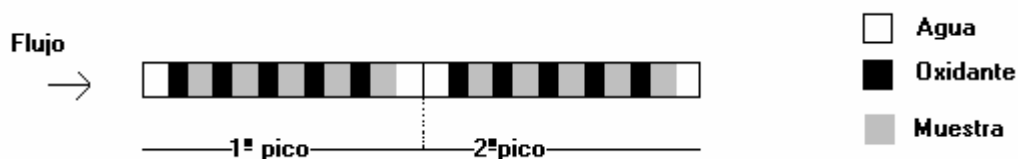


Figura 7.21: Perfil de inserción

Montaje 2

En segundo montaje la nueva válvula se dispuso en paralelo con las otras dos lo más cerca posible de la celda de flujo para evitar la dispersión de la muestra siendo, las disoluciones reactivas impulsadas por la bomba peristáltica. Esta modificación del montaje dos aparece en la Figura 7.22.

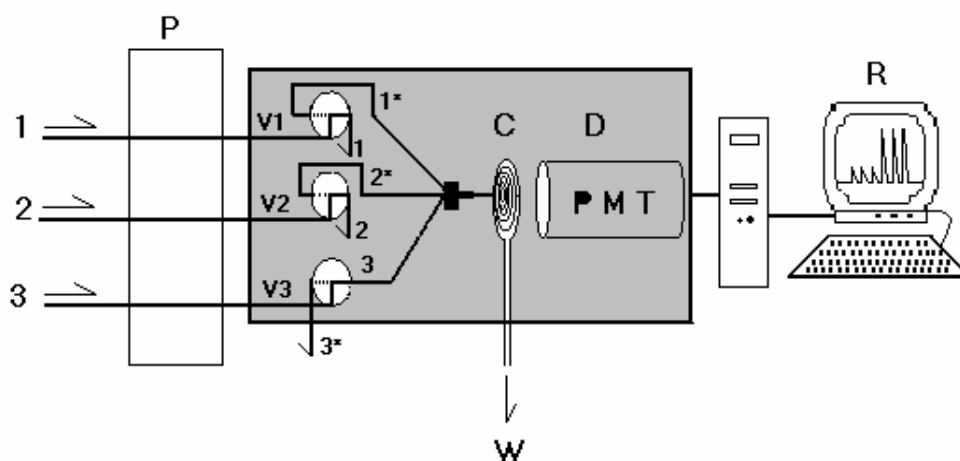


Figura 7.22: Modificación segundo montaje.

Canal 1: KMnO_4 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (posición OFF 1 desecho o recircula, posición ON 1* circula hacia el detector); **Canal 2:** Hidroquinona en H_2SO_4 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (posición OFF 2 desecho o recircula, posición ON 2* circula hacia el detector); **Canal 3:** Corriente de arrastre (agua) (posición OFF 3 circula hacia el detector, posición ON 3* desecho); **P:** Bomba peristáltica; **V1:** Válvula solenoide 1; **V2:** Válvula solenoide 2; **V3:** Válvula solenoide 3; **C:** Celda de flujo; **D:** Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador); **W:** Desecho; **R:** Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

El funcionamiento y la posición de las válvulas (Figura 7.23) con esta modificación del segundo montaje se encuentra descrito a continuación:

Válvula 1

- En posición OFF el oxidante se recirculaba o se enviaba al desecho.
- En posición ON el oxidante era impulsado hacia una confluencia de tres vías ubicada delante de la celda de flujo.

Válvula 2

- En posición OFF la muestra se enviaba al desecho o se recirculaba.
- En posición ON la muestra era impulsada hacia una confluencia de tres vías ubicada delante de la celda de flujo.

Válvula 3

- En posición OFF la corriente de arrastre (agua) era impulsada hacia una confluencia de tres vías ubicada delante de la celda de flujo.
- En posición ON el agua era impulsada hacia el desecho.

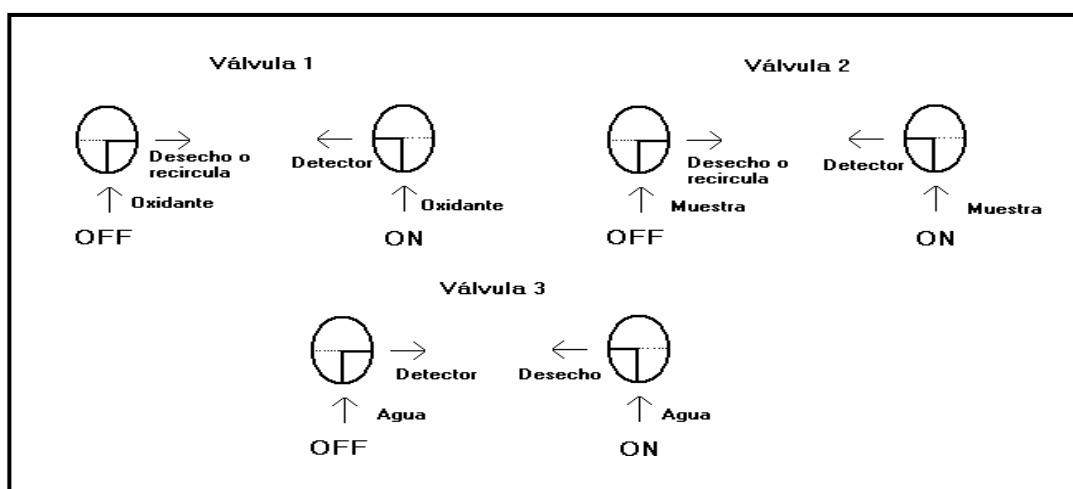


Figura 7.23: Posiciones y funcionamiento de las válvulas.

En este nuevo montaje y tomando como referencia las condiciones seleccionadas en los estudios anteriores, *vértice 7*, (Tabla 7.8, apartado 7.4.1.4) las disoluciones eran impulsadas a una velocidad de flujo de $5.7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, el número de segmentos insertados alternativamente de oxidante y de muestra eran 13 para cada uno y del mismo tamaño, 0.8 segundos.

En la Figura 7.24 se describe la secuencia de inserción, donde se observa como durante el primer segundo del ciclo las válvulas 1, 2 y 3 se encontraban en la posición OFF circulando exclusivamente el agua hacia el detector, transcurrido este tiempo la válvula 3 conmutaba hacia la posición ON, de forma que sólo se impulsaban el oxidante y la muestra hacia el detector, permaneciendo la válvula 3 en esta posición el tiempo necesario (20.8 segundos) para que fueran insertados los 13 segmentos de muestra y 13 permanganato potásico. Durante el intervalo de 20.8 segundos, los primeros 0.8 segundos la válvula 2 permanecía en posición OFF, ya que antes de insertar un fragmento de muestra era necesario que en la celda de flujo hubiera permanganato potásico para que reaccionaran, mientras que la válvula 1 conmutaba a la posición ON, para introducir el primer segmento de oxidante. A partir de este momento y durante un intervalo de 20 segundos las válvulas 1 y 2 funcionaban alternativamente, para insertar los segmentos de muestra y oxidante, de forma que cuando una válvula se encontraba en la posición ON, la otra estaba en posición OFF y viceversa. Insertados todos los segmentos se obtenía un pico y durante el tiempo restante para completar el ciclo, las válvulas retornaban a su posición inicial, circulando únicamente durante 13.2 segundos el agua por el sistema analítico para restablecer la línea base, repitiéndose a los 35 segundos un nuevo ciclo para obtener otro pico.

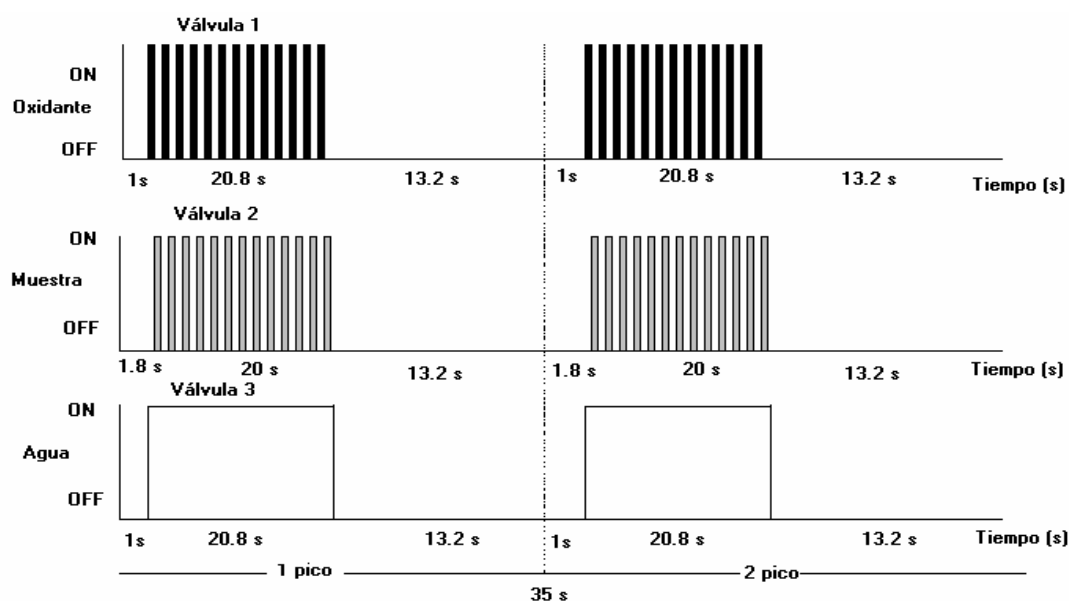


Figura 7.24: Secuencia de inserción.

En la Figura 7.25 se describe el perfil de inserción, donde se observa como 13 segmentos de oxidante y con 13 segmentos de muestra del mismo tamaño eran insertados alternativamente en la corriente de agua y como transcurrido el tiempo del ciclo (35 segundos) se repetía nuevamente la secuencia de inserción, para obtener un nuevo pico.

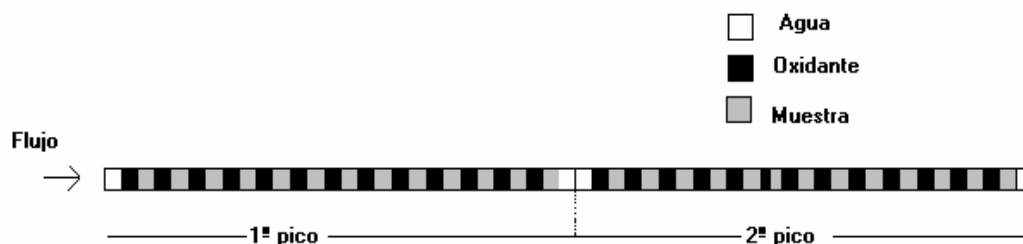


Figura 7.25: Perfil de inserción.

Con las condiciones escogidas para cada uno de los dos montajes, en ambos casos *el vértice 7*, se obtuvo un calibrado de hidroquinona ($n=4$) entre 5.0 y 50.0 ppm; a su vez para cada concentración del calibrado se realizaron 15 picos con el fin de calcular la desviación estándar relativa entre las medidas.

Los resultados obtenidos con las dos nuevas configuraciones se muestran en la Tabla 7.10 y Figura 7.26.

Montaje	dsr(%)			
	5.0 ppm	10.0 ppm	20.0 ppm	50.0 ppm
Figura 7.18	2.7	2.2	3.5	4.2
Figura 7.22	3.8	4.0	3.7	3.4

Tabla 7.10: Desviación estándar relativa para cada concentración con cada uno de los montajes.

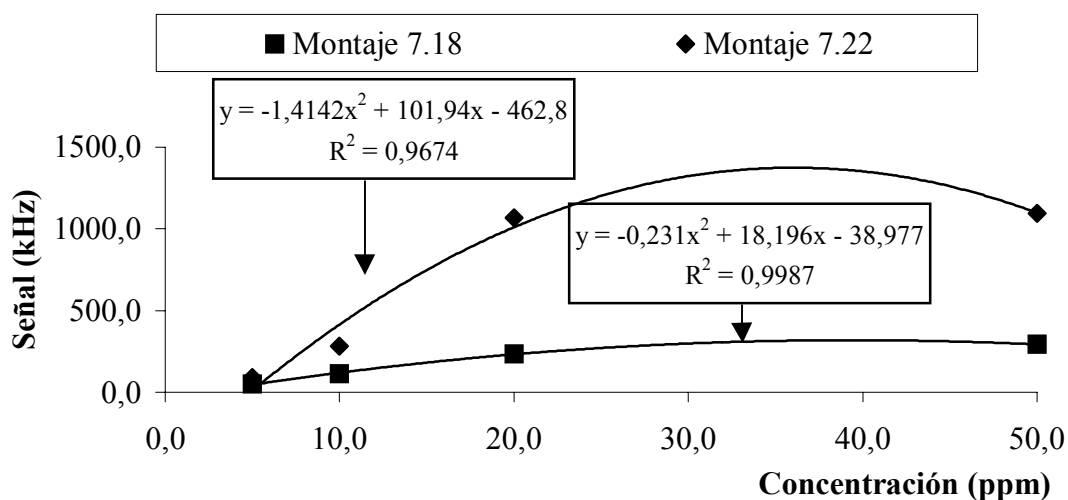


Figura 7.26: Calibrados con cada uno de los montajes.

Con ambos montajes las reproducibilidades eran del mismo orden, pero las señales analíticas alcanzadas con el segundo montaje (Figura 7.22) eran mayores.

Sin embargo, esta experiencia no fue suficiente para seleccionar el montaje óptimo, por esa razón se decidió realizar otro calibrado para concentraciones menores de hidrogenoclorato de hidroxifenilacetato ($n=6$) entre 2.5 y 20.0 ppm con cada una de las configuraciones y se calculó la desviación estándar relativa para cada punto del calibrado. Además, para llevar a cabo este ensayo se escogió de los resultados del simplex (Tabla 7.3 y 7.4) una única combinación para cada configuración con un valor de señal analítica elevada, que presentaran unas condiciones como: caudal, número de segmentos, tamaño de segmento de muestra y de oxidante similares para que se pudieran comparar entre sí. Las condiciones seleccionadas se muestran en la Tabla 7.11.

Montaje	Caudal ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	Tk (s)	Tm(s)	Sk	Sm
Figura 7.18 (vértice 12)	4.9	0.3	0.47	8	8
Figura 7.22 (vértice 10)	3.7	0.3	0.5	9	9

Tabla 7.11: Condiciones elegidas para cada montaje de los simplex representados en la Tabla 7.3 y 7.4.

En las Figuras 7.27 y 7.28 se encuentran detalladas las secuencias de inserción para cada uno de los montajes con las condiciones escogidas.

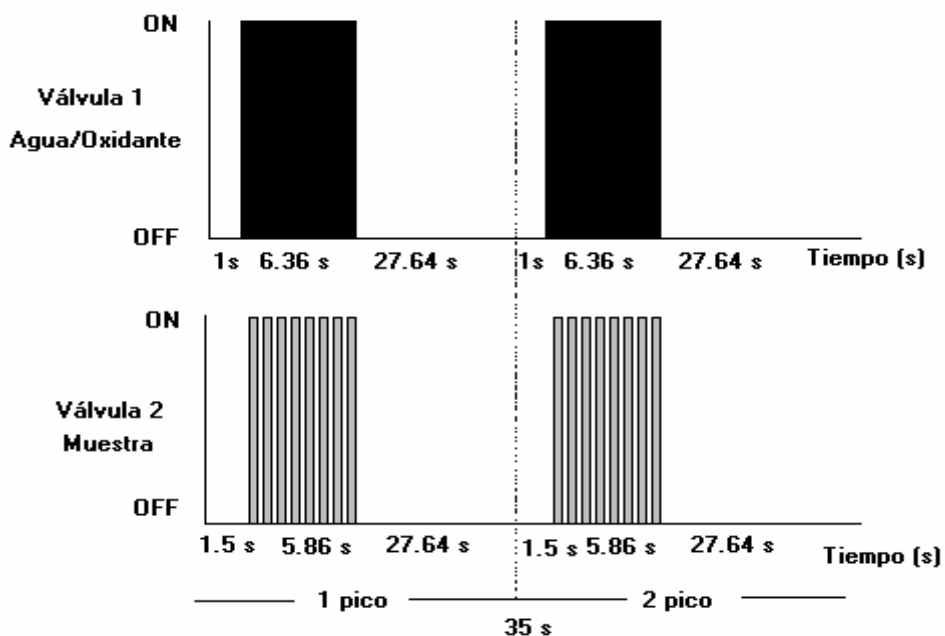


Figura 7.27: Secuencia de inserción para el montaje 7.18 (Vértice 12).

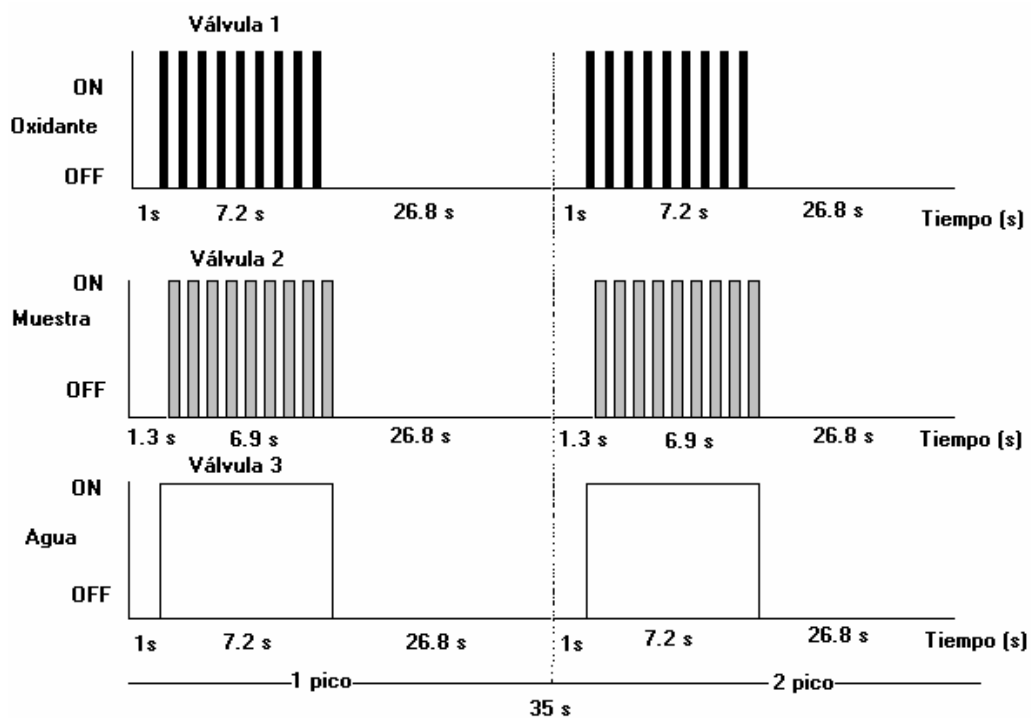


Figura 7.28: Secuencia de inserción para el montaje 7.22 (Vértice 10).

Como se observa en la Tabla 7.12, donde quedan reflejados los resultados de ambos calibrados, la sensibilidad y el coeficiente correlación alcanzados con el primer montaje eran mayores, por otro lado, al ser las disoluciones aspiradas aparecían problemas de irregularidad en los caudales que ocasionaban una menor reproducibilidad del método, por esta razón y por presentar mejor desviación estándar relativa para todos los puntos ensayados, se decidió seleccionar como montaje óptimo el descrito en la *Figura 7.22*.

Montaje	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²	Concentración (ppm)					
				2.5	5.0	10.0	12.5	15.0	20.0
Figura 7.18	20.228	-51.716	0.9752	5.3	5.6	4.6	4.8	5.3	4.1
Figura 7.22	14.764	-54.271	0.9299	3.5	2.5	4.5	3.9	4.4	4.4

Tabla 7.12: Calibrados con ambos montajes (Selección del montaje óptimo).

En la Tabla 7.13, se muestran las condiciones seleccionadas para el nuevo sistema en flujo desarrollado para la determinación de hidroquinona, descrito en la *Figura 7.22*.

Canal	Caudal (ml·min ⁻¹)	Tk (s)	Tm(s)	Sk	Sm
1-2-3	3.7	0.3	0.5	9	9

Tabla 7.13: Condiciones seleccionadas para el montaje en flujo por multiconmutación.

7.4.2. Influencia de la presencia de agentes tensoactivos

Los medios organizados (normalmente agentes tensoactivos) pueden aumentar la intensidad de la emisión quimioluminiscente^{207,222,318}, debido a que protegen al analito y evitan la pérdida de energía en otras formas distintas a la de

emisión; por este motivo se ensayaron diferentes tipos de agentes tensoactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos: Triton X-100 (no iónico), Tween 80 (no iónico), sodio dodecilsulfato (SDS) (aniónico), cloruro de hexadecilpiridinio (HD) (catiónico), cloruro de benzalconio (BAC) (catiónico), cetil trimetilamonibromuro (CTAB) (catiónico) y β -ciclodextrina, que no es un tensoactivo en sentido estricto pero que dadas sus características estructurales, se comporta como un medio organizado al capturar los solutos en el interior de su estructura.

Cada uno de ellos se preparó junto con la muestra (hidroquinona 5.0 ppm en medio ácido sulfúrico 0.3 mol·l⁻¹) a una concentración superior a la c.m.c.^{320,321} aproximadamente el doble de la concentración micelar crítica. A continuación en la Tabla 7.14 se muestran los valores obtenidos y evaluados frente a las correspondientes alturas de pico de la disolución exenta de agente tensoactivo.

Tensoactivo	Blanco (kHz)	Señal(kHz)	Señal-Blanco (kHz)
Referencia (sin tensoactivo)	0.0	26.7	26.7
SDS 16.00 mmol·l ⁻¹	0.3	35.2	34.9
CTAB 1.84 mmol·l ⁻¹	0.4	69.7	69.3
HD 2.00 mmol·l⁻¹	1.4	181.2	179.8
Triton X-100 0.48 mmol·l ⁻¹	0.4	37.8	37.4
BAC 12.00 mmol·l⁻¹	3.5	232.4	228.9
Tween 80 0.02%	2.9	29.0	26.1
β -ciclodextrina 2.00 mmol·l ⁻¹	0.3	37.9	37.6

Tabla 7.14: Influencia presencia de los tensoactivos.

Los mejores resultados se obtuvieron con el hexadecilpiridinio (HD) 2 mmol·l⁻¹ y el cloruro de benzalconio (BAC) 12 mmol·l⁻¹, que incrementaron en un 573.40% y en un 757.30 % la emisión quimioluminiscente respecto a la señal de referencia.

Con el fin de elegir el tensoactivo más adecuado, se realizó un calibrado de hidroquinona de seis puntos comprendidos entre 2.5 y 20.0 ppm con sendos tensoactivos.

En la Figura 7.29 se muestran los resultados de los calibrados para ambos tensoactivos, donde se puede observar que el valor de la pendiente era prácticamente similar. Además, tanto con el HD como con el BAC se generaba un precipitado, por esta razón se decidió estudiar la influencia de la concentración del tensoactivo, en la formación del mismo.

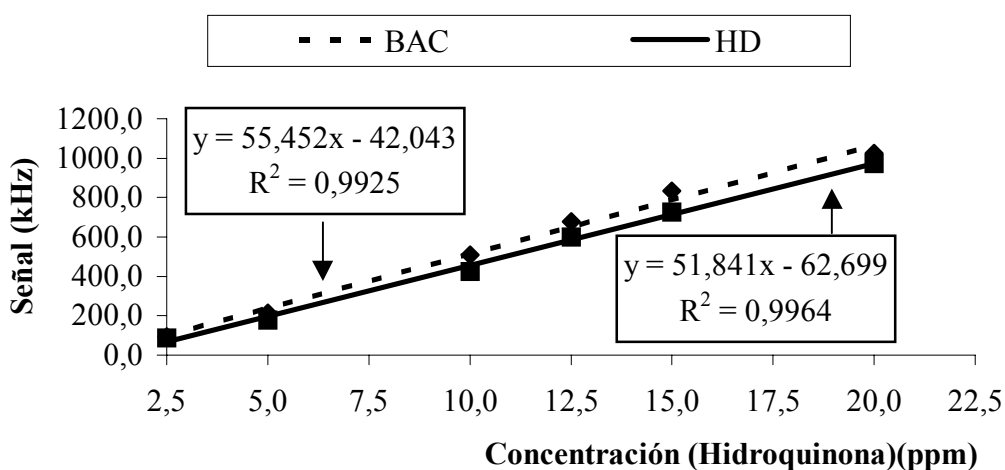


Figura 7.29: Resultados de los calibrados con HD y BAC.

Para realizar este ensayo se varió la concentración del tensoactivo alrededor de la concentración micelar crítica y para cada concentración se realizó un calibrado de hidroquinona de cinco puntos comprendidos entre 1.0 y 15.0 ppm.

Fue necesario incluir un tiempo de lavado tras cada punto del calibrado para eliminar la posible presencia de precipitado en el sistema, este lavado consistía en hacer fluir únicamente la disolución de arrastre (agua) durante unos minutos; para ello todas las válvulas se encontraban en posición OFF. Los resultados quedan reflejados en la Tabla 7.15.

Tensoactivo	C(Tensoactivo) mmol·l ⁻¹	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
HD	0.5	20.466	-21.397	0.9834
	1.0 (Cmc)	42.608	-62.504	0.9776
	2.0	57.572	-54.755	0.9870
BAC	6.0 (Cmc)	45.122	-27.081	0.9898
	10.0	83.771	-146.830	0.9443
	12.0	69.940	-86.649	0.9906

Cmc: Concentración micelar crítica.

Tabla 7.15: Resultados de la influencia de la concentración del tensoactivo.

En el caso del HD se decidió no aumentar más la concentración de tensoactivo, ya que conforme se incrementaba, el precipitado formado era mayor; mientras que con el cloruro de benzalconio (BAC) se fue disminuyendo la concentración hasta la concentración micelar crítica, observándose una mayor sensibilidad para el cloruro de benzalconio a 10.00 mmol·l⁻¹. Por esta razón, finalmente se seleccionó el *cloruro de benzalconio* a esta misma concentración, con el objeto de incrementar la señal quimioluminiscente.

7.4.3. Influencia de la presencia de sensibilizadores

En ciertas reacciones quimioluminiscentes^{153,154,220} se han utilizado compuestos, normalmente fluoróforos, como reactivos para la transferencia de energía, que convierte los métodos quimioluminiscentes directos en indirectos. El producto de reacción no es quien emite la luz, si no que transfiere su exceso de energía a un aceptor fluorescente (fluoróforo) que al volver al estado fundamental, resulta ser el responsable de la emisión final.

Las sustancias sensibilizadoras ensayadas fueron: acetona, acetona/acetonitrilo, acetonitrilo, etanol, dioxano, sulfito sódico, ácido fórmico,

sulfato de quinina, 8-hidroxiquinoleina (oxina), dimetilformamida, naranja de acridina, rodamina 6G y rodamina B. Cada uno de ellos se preparó a una concentración determinada junto con 5.0 ppm de hidroquinona en medio ácido. Los resultados se muestran en la Tabla 7.16.

Sensibilizador	Blanco (kHz)	Señal(kHz)	Señal-Blanco (kHz)
Referencia (sin sensibilizador)	0.0	26.6	26.6
Acetona 0.5 %	0.0	28.0	28.0
Acetona 0.5%/ Acetonitrilo 20.0%	0.1	1.9	1.8
Acetonitrilo 20.0%	0.0	2.1	2.1
Etanol 20.0%	10.0	151.4	141.4
Dioxano 5.0%	1.9	28.7	26.8
Sulfito sódico $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	0.0	55.9	55.9
Ácido fórmico 5.0%	0.9	90.3	89.4
Sulfato quinina $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	12.5	163.0	150.5
Oxina $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	622.9	811.9	189.0
Dimetilformamida 5.0%	0.84	19.8	18.9
Naranja de acridina $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	169.3	288.3	119.0
Rodamina 6G $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	1668.4	1555.2	-113.3
Rodamina B $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	2437.1	2675.6	238.5

Tabla 7.16: Estudio de la influencia de los sensibilizadores.

Se descartaron aquellos fluoróforos que presentaban un blanco muy elevado como la oxina, naranja de acridina, rodamina B y la rodamina 6G, además de los que inhibían la señal quimioluminiscente como la acetona/acetonitrilo, el acetonitrilo y la dimetilformamida. Los que mejor resultado ofrecieron fueron: etanol, ácido fórmico, sulfato de quinina y el sulfito sódico que aumentaron en 431.57%, 236.09% ,465.78 % y 110.15% respectivamente la señal analítica respecto a la disolución de referencia.

A continuación se realizó un calibrado de seis puntos de hidroquinona comprendido entre 1.0 y 15.0 ppm para cada uno de los sensibilizadores preseleccionados. Tras esta experiencia se descartaron el sulfito sódico y el ácido fórmico porque las pendientes del calibrado eran menores. En la Tabla 7.17 se muestran los resultados obtenidos.

Sensibilizador	Pendiente	Ordenada en origen	r ²
Etanol 20.0%	48.757	-71.921	0.9709
HCOOH 5.0%	25.404	-30.606	0.9786
Sulfato quinina 5.0x10⁻⁴ mol·l⁻¹	35.388	-13.204	0.9952
Sulfito sódico 1.0x10 ⁻³ mol·l ⁻¹	17.524	-27.960	0.9671

Tabla 7.17: Calibrado con diversos sensibilizadores preseleccionados.

El siguiente ensayo, consistió en estudiar la variación de la concentración del sensibilizador (etanol y sulfato de quinina) en presencia del tensoactivo (BAC) cloruro de benzalconio anteriormente seleccionado, a una concentración de 10.0 mmol·l⁻¹. Para todas las concentraciones estudiadas se realizó un calibrado de hidroquinona entre 1.0 y 15.0 ppm, incluyendo un lavado con la corriente de agua durante 2 minutos, después de cada punto del calibrado para eliminar la posible formación de precipitado en el sistema. Los resultados aparecen en la Tabla 7.18.

Sensibilizador	C(Sensibilizador)	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
Etanol	10.0 %	75.430	-49.077	0.9864
	20.0%	97.933	-54.002	0.9933
	30.0%	77.425	34.139	0.9610
Quinina	1.0x10 ⁻⁵ mol·l ⁻¹	45.018	-20.922	0.9968
	1.0x10 ⁻⁴ mol·l ⁻¹	51.179	-42.923	0.9612
	5.0x10⁻⁴ mol·l⁻¹	63.556	-60.154	0.9817

Tabla 7.18: Influencia de la concentración de los sensibilizadores con BAC.

Con el sulfato de quinina, se observó que conforme aumentaba la concentración del mismo las señales quimioluminiscentes eran más elevadas; por esta razón se decidió probar una concentración superior de sensibilizador, pero la elevada señal del blanco al incrementar la concentración del mismo, marcó el límite superior a estudiar, establecido en $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

La concentración de sensibilizador que ofrecía una mayor pendiente del calibrado fue para el etanol 20.0%, pero presentaba el inconveniente de generar burbujas en el flujo, que provocaban problemas de irreproducibilidad entre las muestras que podrían agravarse si posteriormente tuviéramos que calentar. Por todas estas razones se seleccionó como sensibilizador el *sulfato de quinina* a una concentración de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

En la Tabla 7.19 se indican el conjunto de variables seleccionadas hasta el momento, para el sistema en flujo con multiconmutación desarrollado en la Figura 7.22.

Canal Válvula	Disoluciones	Caudal ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)
1	$\text{KMnO}_4 2.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} + \text{H}_2\text{SO}_4 0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tamaño de segmento 0.3 segundos Número de segmentos 9	3.7
2	Muestra $+ \text{H}_2\text{SO}_4 0.3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} + \text{Quinina } 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ $+ \text{BAC } 10.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tamaño de segmento 0.5 segundos Número de segmentos 9	3.7
3	Corriente de arrastre (agua)	3.7

Tabla 7.19: Composición preliminar del sistema en flujo por multiconmutación.

7.4.4. Estudio de la relación entre la temperatura y la velocidad de flujo

En primer lugar era necesario comprobar que realmente a temperaturas superiores se producía un aumento significativo en la respuesta. Esto quedaba demostrado, ya que en las mismas condiciones descritas en la Tabla 7.19, la señal obtenida para 10.0 ppm de hidroquinona a temperatura ambiente (666.9 kHz) aumentaba en un 11% a una temperatura de 60.0°C (740.0 kHz).

Este ensayo se realizó con el objeto de constatar que el aumento de la temperatura implicaba un aumento de la velocidad de reacción, además de que si no se incrementaba la velocidad de flujo, la emisión quimioluminiscente tendría lugar antes de llegar a la celda de flujo, quedando enmascarada el correspondiente incremento de la señal y no siendo recogida toda la luz producida por la reacción química en el tubo fotomultiplicador.

Para realizar este ensayo, se sumergieron en un baño termostataado a 60.0°C las disoluciones del oxidante, agua, y de la muestra (hidroquinona 10.0 ppm preparada en medio ácido con el sensibilizador y el tensoactivo) y se obtuvieron una serie de 10 picos con el propósito de estudiar la reproducibilidad del sistema para 4 velocidades de flujo distintas, comprendidas entre 1.7 y 7.8 ml·min⁻¹. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 7.20.

Caudal (ml·min⁻¹)	Señal (kHz)	dsr(%)
1.7	345.4	3.7
3.7	740.0	2.0
5.6	1139.2	2.7
7.8	1577.7	2.1

Tabla 7.20: Influencia de la variación de la señal quimioluminiscente con el caudal a la temperatura de 60.0°C.

Esta experiencia sirvió para comprobar que las señales analíticas aumentaban, conforme se incrementaba la velocidad de flujo y de reacción a temperaturas superiores a la ambiente. Además, a temperaturas elevadas, el precipitado se disolvía y permitía trabajar sin necesidad de realizar un lavado con agua desionizada después de cada muestra. Por último, destacar que en estas condiciones la reproducibilidad del sistema mejoraba significativamente.

7.5. REOPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

A continuación, se procedió a la reoptimización de las variables experimentales descritas en la Tabla 7.19, mediante el método multivariante *Simplex Modificado*.

En este simplex se incluyó como variable a optimizar la temperatura, por estar intrínsecamente relacionada con la altura de pico, como se observó en el apartado 7.4.4. Para ello en cada uno de los 3 canales (oxidante, muestra y agua) se sumergieron 2 metros de tubo de PTFE en un baño de agua termostatado, de forma que las disoluciones eran calentadas antes de entrar en el luminómetro, dentro del cual se encontraban las válvulas solenoide.

Las variables a reoptimizar fueron las siguientes: caudal de la disolución de arrastre (agua) (Q_a), caudal de la muestra y del oxidante (Q_{mo}), tamaño de segmento del permanganato potásico (T_k), tamaño del segmento de la muestra (T_m), número de segmentos de muestra (S_m), número de segmentos de oxidante (S_k), concentración de sulfato de quinina (C_q), concentración de cloruro de benzalconio (C_{bac}), concentración de ácido sulfúrico (C_s), concentración de permanganato potásico (C_k) y la temperatura (T^a). Los intervalos fijados para cada variable se muestran en la Tabla 7.21.

Variable	Intervalo estudiado
Qa (ml·min ⁻¹)	3.0-7.8
Qmo (ml·min ⁻¹)	3.0-7.8
Tk (Segundos)	0.1-0.8
Tm (Segundos)	0.1-0.8
Sm	5.0-16.0
Sk	5.0-16.0
Cq (mmol·l ⁻¹)	0.001-1.000
Cbac (mmol·l ⁻¹)	6.0-14.0
Cs (mol·l ⁻¹)	0.1-1.5
Ck (mmol·l ⁻¹)	0.01-10.00
T ^a (°C)	20.0-80.0

Tabla 7.21: Intervalos estudiados para cada variable en el simplex.

Los intervalos se seleccionaron según las experiencias realizadas anteriormente; para la temperatura se estudió un intervalo que no superara un valor de 80.0°C, por la posible aparición de burbujas, al estar el sistema a temperaturas próximas a la de ebullición; la velocidad de flujo debía ser superior a 3.0 ml·min⁻¹ para alcanzar buenas señales; el tamaño de los segmentos no podía ser ni muy grande ni muy pequeño porque el mezclado de las fragmentos de oxidante y muestra no era eficiente; se requería un mínimo número de segmentos fijado en 5 y un máximo de 16 tanto de oxidante como de muestra, ya que estos se insertaban alternativamente hasta un total de 32, que era el máximo número de segmentos que permitía incorporar el ordenador; el intervalo de la concentraciones de quinina a estudiar se fijó en un máximo 1.0 mmol·l⁻¹, debido a que a mayor concentración los blancos aumentaban significativamente; la concentración del tensoactivo se varió por encima de la concentración micelar crítica (6.0 mmol·l⁻¹); la concentración del medio se fijó con un máximo de 1.5 mol·l⁻¹ para no trabajar con un medio sulfúrico muy concentrado y por último el permanganato potásico, que al ser una variable crítica en quimioluminiscencia, se decidió estudiar en un amplio intervalo entre 0.01 y 10 mmol·l⁻¹.

En la Tabla 7.22 se recogen los resultados del primer simplex junto con las señales y las desviaciones estándar relativa obtenidas para cada vértice, tomadas

como la señal media de 10 picos. Con este primer simplex se obtuvieron 14 vértices no nulos, trabajando siempre con 10.0 ppm de hidroquinona.

V	Qa	Qmo	Tk	Tm	Sk	Sm	Cq	C bac	Cs	Ck	T ^a	Señal (kHz)	dsr (%)
1	3.0	3.0	0.1	0.1	5.0	5.0	0.001	6.0	0.1	0.01	20	3.6	1.9
2	3.7	3.7	0.2	0.2	7.0	7.0	0.100	7.0	0.3	1.00	70	153.6	4.7
3	3.7	3.7	0.2	0.2	7.0	7.0	0.900	7.0	0.3	1.00	30	212.4	4.6
4	3.7	3.7	0.2	0.2	7.0	7.0	0.100	13.0	0.3	1.00	30	185.8	4.8
5	3.7	3.7	0.2	0.2	7.0	7.0	0.100	7.0	1.2	1.00	30	143.2	4.2
6	3.7	3.7	0.2	0.2	7.0	7.0	0.100	7.0	0.3	9.00	30	10.3	4.5
7	3.7	7.2	0.2	0.2	7.0	7.0	0.100	7.0	0.3	1.00	30	496.5	2.9
8	7.2	3.7	0.2	0.2	7.0	7.0	0.100	7.0	0.3	1.00	30	220.2	4.5
9	3.7	3.7	0.2	0.2	14.0	14.0	0.100	7.0	0.3	1.00	30	334.7	3.9
10	3.7	3.7	0.2	0.7	7.0	7.0	0.100	7.0	0.3	1.00	30	732.8	3.0
11	3.7	3.7	0.7	0.2	7.0	7.0	0.100	7.0	0.3	1.00	30	76.2	6.6
12	4.3	4.3	0.3	0.3	8.0	8.0	0.300	7.0	0.4	3.00	35	269.5	6.1
13	5.2	5.2	0.4	0.4	10.0	10.0	0.500	10.0	0.8	5.00	50	312.1	6.0
14	4.9	4.9	0.4	0.4	9.0	9.0	0.300	9.0	0.6	3.00	45	464.1	4.2

Tabla 7.22: Resultados del primer simplex para la reoptimización de las variables experimentales. V: Vértice. En negrita se destaca la combinación que mejor señal analítica presentó.

Por razones de capacidad del programa informático disponible, en el desarrollo del método multivariante no era posible obtener más de 14 combinaciones (o vértices). Se pensó que podía ser debido al número de variables (10 variables, ya que el número de segmentos de muestra y oxidante se simplificaban en 1), comprobándose que si se reducía el número de variables a 9 se podían obtener más de 14 vértices; por tanto se decidió eliminar en el nuevo simplex el caudal de la disolución de arrastre agua (Qa), ya que era la variable de menor relevancia en la

reacción quimioluminiscente, así que el caudal del agua, muestra y oxidante era el mismo, representado por Qamo.

En el segundo simplex y según los resultados experimentales del primer simplex de la Tabla 7.22, se eliminó el caudal del de la disolución de arrastre y se variaron los intervalos de algunas variables, con objeto de delimitar la zona de posibles combinaciones e incrementar el número de vértices no nulos. La concentración mínima ensayada de sulfato de quinina se aumentó a $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, porque la señal obtenida para una concentración $0.001 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ era muy pequeña (vértice 1) y según los resultados de la (Tabla 7.18, apartado 7.4.3) a partir de $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ la sensibilidad mejoraba; la concentración del tensoactivo y ácido sulfúrico se aumentaron en 1 y 0.5 unidades respectivamente; el oxidante que en el primer simplex se estudió en un intervalo muy grande, se decidió reducirlo teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos previos en flujo continuo (apartado 7.3.2), donde se observa que para concentraciones de oxidante inferiores a $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($0.1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) las señales quimioluminiscentes disminuían; se aumentó el número de segmentos mínimo para la muestra y el oxidante, y por último se estableció como temperatura mínima 40.0°C . En la Tabla 7.23 quedan reflejados los intervalos establecidos para el segundo simplex.

Variable	Intervalo estudiado
Qaom ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	3.0-7.8
Tk (Segundos)	0.1-0.8
Tm (Segundos)	0.1-0.8
Sm	7.0-15.0
Sk	7.0-15.0
Cq ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0.1-1.0
Cbac ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	7.0-14.0
Cs ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0.5-1.5
Ck ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0.5-10
T ^a ($^\circ\text{C}$)	40.0-80.0

Tabla 7.23: Intervalos establecidos en el segundo simplex.

En la Tabla 7.24 se muestran los resultados del segundo simplex, junto con las señales quimioluminiscentes y las desviaciones estándar relativas obtenidas para 10 picos de hidroquinona 10.0 ppm.

V	Qamo	Tk	Tm	Sk	Sm	Cq	Cbac	Cs	Ck	T ^a	Señal (kHz)	dsr (%)
1	3.0	0.1	0.1	7.0	7.0	0.1	7.0	0.5	0.5	40	79.9	5.8
2	3.7	0.2	0.2	8.0	8.0	0.3	8.0	0.6	3.0	75	100.6	5.9
3	3.7	0.2	0.2	8.0	8.0	0.9	8.0	0.6	3.0	45	182.2	4.4
4	3.7	0.2	0.2	8.0	8.0	0.3	13.0	0.6	3.0	45	137.7	4.0
5	3.7	0.2	0.2	8.0	8.0	0.3	8.0	1.4	3.0	45	81.7	4.8
6	3.7	0.2	0.2	8.0	8.0	0.3	8.0	0.6	9.0	45	12.8	5.7
7	7.2	0.2	0.2	8.0	8.0	0.3	8.0	0.6	3.0	45	196.0	3.5
8	3.7	0.2	0.2	14.0	14.0	0.3	8.0	0.6	3.0	45	138.5	3.8
9	3.7	0.2	0.7	8.0	8.0	0.3	8.0	0.6	3.0	45	577.5	2.5
10	3.7	0.7	0.2	8.0	8.0	0.3	8.0	0.6	3.0	45	11.5	6.8
11	4.0	0.2	0.3	9.0	9.0	0.3	9.0	0.7	3.0	50	184.8	3.8
12	4.3	0.8	0.3	9.0	9.0	0.3	9.0	0.8	3.0	50	85.4	1.6
13	4.0	0.1	0.3	9.0	9.0	0.3	9.0	0.7	3.0	50	303.6	7.1
14	4.3	0.2	0.3	9.0	9.0	0.3	9.0	0.7	1.0	50	512.2	4.1
15	4.6	0.2	0.3	9.0	9.0	0.3	9.0	0.8	0.5	55	734.8	2.2
16	4.6	0.2	0.3	10.0	10.0	0.5	9.0	0.8	0.5	55	799.6	2.6
17	5.6	0.3	0.5	11.0	11.0	0.5	10.0	1.0	1.0	60	1659.9	1.9
18	4.9	0.2	0.4	10.0	10.0	0.5	10.0	0.5	0.5	55	1086.6	1.6
19	4.9	0.2	0.4	10.0	10.0	0.5	10.0	0.8	0.5	40	918.4	1.9
20	7.8	0.1	0.8	15.0	15.0	1.0	14.0	1.5	0.5	40	379.7	3.6
21	4.6	0.2	0.3	10.0	10.0	0.3	8.0	0.7	0.7	45	670.6	2.1
22	5.2	0.2	0.4	11.0	11.0	0.5	7.0	0.7	0.5	45	1013.1	1.4
23	6.2	0.1	0.6	12.0	12.0	0.7	7.0	0.8	0.5	45	548.2	3.7
24	4.6	0.2	0.4	9.0	9.0	0.5	8.0	0.7	0.5	45	786.8	1.9
25	5.6	0.2	0.5	7.0	7.0	0.5	8.0	0.8	0.5	45	876.8	2.2
26	5.2	0.2	0.4	7.0	7.0	0.5	8.0	0.8	0.5	45	788.0	2.0
27	4.9	0.2	0.4	9.0	9.0	0.3	8.0	0.7	0.5	45	852.5	2.4
28	5.9	0.2	0.5	9.0	9.0	0.1	8.0	0.8	0.5	45	1043.1	1.7
29	4.9	0.2	0.4	9.0	9.0	0.3	8.0	0.8	0.5	45	797.6	4.1
30	3.0	0.1	0.6	9.0	9.0	0.5	8.0	0.8	0.5	45	460.9	4.9
31	4.6	0.2	0.4	9.0	9.0	0.3	8.0	0.7	0.5	45	767.1	4.0

Tabla 7.24: Resultados del segundo simplex para la reoptimización de las variables experimentales. V: Vértice. En negrita se destaca el vértice que mayor emisión quimioluminiscente presentó.

Tras obtener 31 vértices no nulos y atendiendo a criterios de altura de pico y reproducibilidad se seleccionó como óptimo el *vértice 17*.

A continuación con las condiciones del *vértice 17*, se decidió reoptimizar la temperatura y la velocidad de flujo por estar directamente relacionadas en el aumento de la emisión quimioluminiscente, como se había demostrado en experiencias anteriores (apartado 7.4.4).

Manteniendo constantes las otras variables optimizadas en el segundo simplex (*vértice 17*), se obtuvieron señales analíticas de 10.0 ppm de hidroquinona, para varias velocidades de flujo y dos temperaturas distintas, una correspondiente al valor seleccionado (60.0°C) y otra superior. Los resultados se muestran en la Figura 7.30.

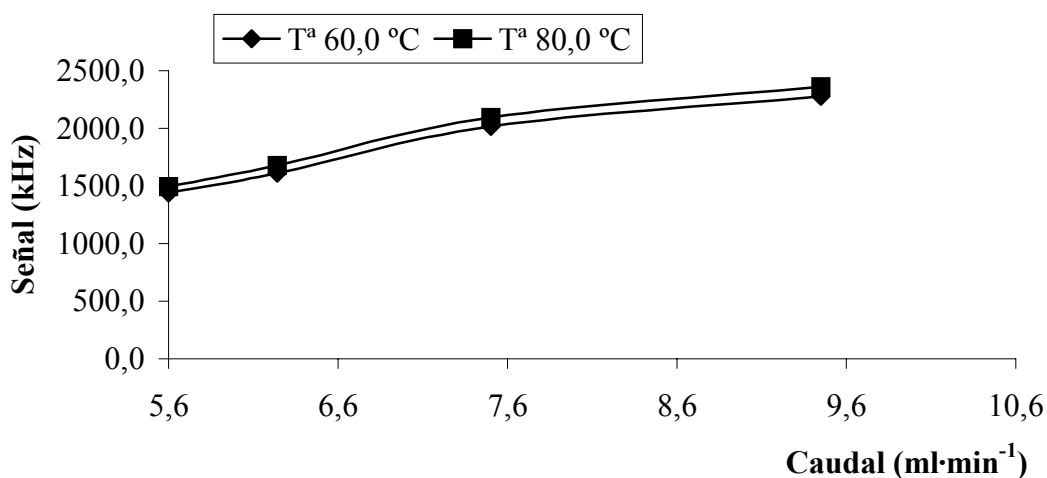


Figura 7.30: Reoptimización de la temperatura y de la velocidad de flujo.

Las señales quimioluminiscente obtenidas para ambas temperaturas fueron del mismo orden, por esta razón se decidió trabajar a 60.0°C. En cuanto a la velocidad de flujo, se observó que conforme aumentaba se incrementaba también la altura de pico.

Finalmente, con el propósito de seleccionar la velocidad de flujo óptima, se realizó a 60.0°C un calibrado de seis puntos de hidroquinona comprendidos entre 0.1 y 15.0 ppm, a las dos velocidades de flujo 7.5 ml·min⁻¹ y 9.4 ml·min⁻¹, que habían presentado una mayor señal quimioluminiscente.

Como se observa en la Tabla 7.25, para velocidades de flujo mayores la pendiente del calibrado se incrementaba, pero para evitar sobrepresión en los tubos de bomba por trabajar a un caudal elevado, se seleccionó como velocidad de flujo óptima 7.5 ml·min⁻¹.

Caudal (ml·min ⁻¹)	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²
7.5	204.150	-13.664	0.9996
9.4	223.160	7.276	0.9987

Tabla 7.25: Selección de la velocidad de flujo.

7.6. SISTEMA EN FLUJO POR MULTICONMUTACIÓN OPTIMIZADO

La configuración definitiva del sistema en flujo por multiconmutación con válvulas solenoide, para la determinación de hidroquinona por quimioluminiscencia directa fue la siguiente:

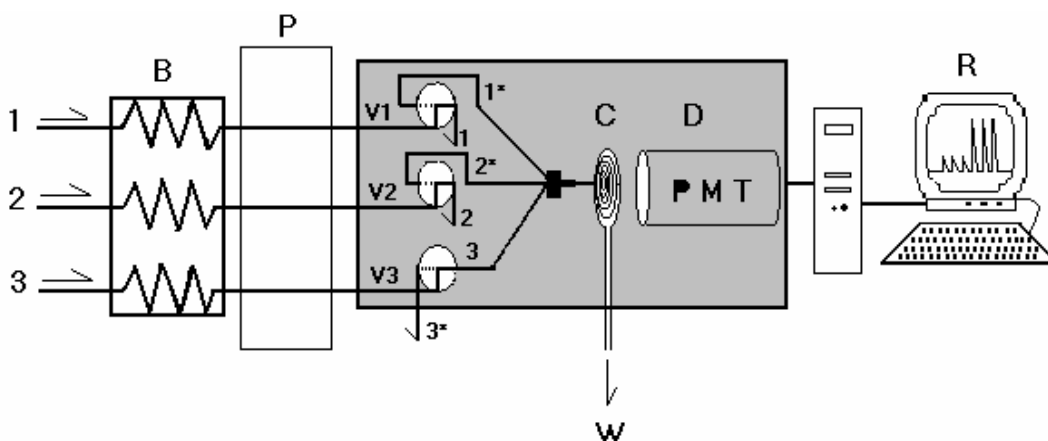


Figura 7.31: Configuración definitiva del sistema en flujo por multiconmutación.

Canal 1: KMnO_4 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ controlado por la válvula 1. En posición OFF 1 desecho o se recircula; en posición ON 1* circula hacia el detector; caudal $7.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; número de segmentos 11 de 0.3 segundos.

Canal 2: Hidroquinona en H_2SO_4 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; sulfato de quinina $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; BAC $10.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ controlado por la válvula 2. En posición OFF 2 desecho, en posición ON 2* circula hacia el detector; caudal $7.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; número de segmentos 11 de 0.5 segundos.

Canal 3: Corriente de agua, controlado por la válvula 3. En posición OFF 3 fluye hacia el detector, en posición ON 3* se dirige al desecho; caudal $7.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

B: Baño termostático a 60.0°C .

V1: Válvula solenoide 1.

V2: Válvula solenoide 2.

V3: Válvula solenoide 3.

C: Celda de flujo en espiral.

D: Detector (PMT: Tubo fotomultiplicador).

W: Desecho.

R: Recolección, tratamiento y presentación de los resultados.

En la Figuras 7.32 y 7.33 se describen la secuencia de inserción y el perfil de inserción.

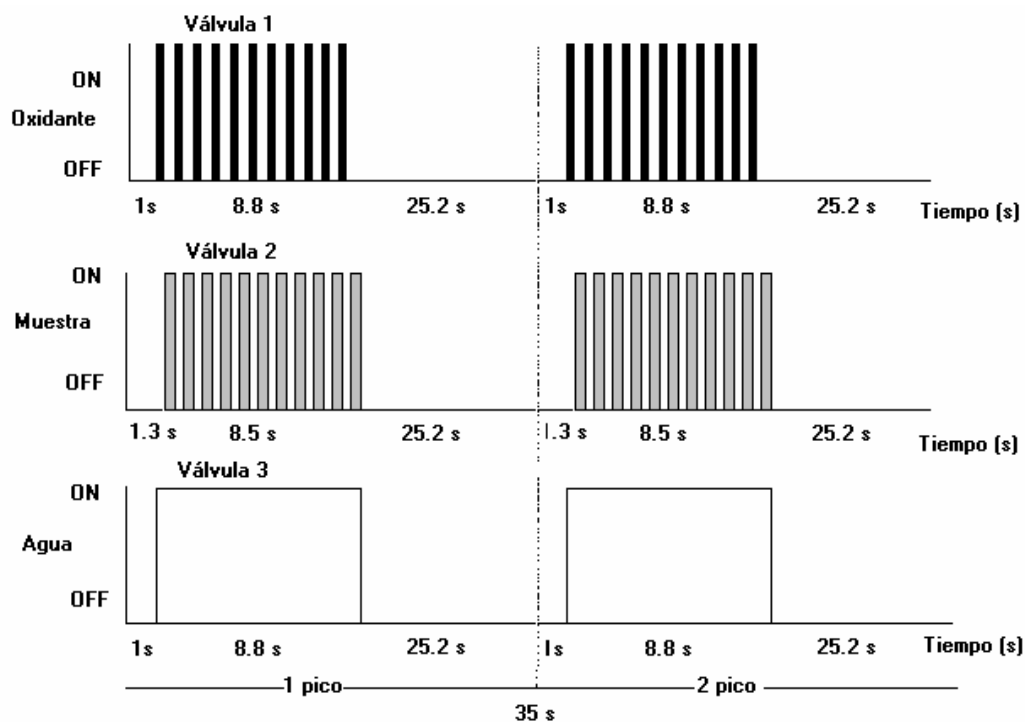


Figura 7.32: Secuencia de inserción del montaje en flujo optimizado.

En la Figura 7.32 se observa como durante el primer segundo del ciclo las válvulas 1, 2 y 3 se encontraban en la posición OFF circulando exclusivamente la corriente de agua hacia el detector, transcurrido este tiempo la válvula 3 conmutaba hacia la posición ON, de forma que sólo eran impulsados el oxidante y la muestra hacia el detector, permaneciendo la válvula 3 en esta posición el tiempo necesario (8.8 segundos) para que fueran insertados alternativamente los 11 segmentos de muestra y 11 de permanganato potásico. Durante este intervalo de 8.8 segundos, los primeros 0.3 segundos la válvula 2 permanecía en posición OFF, ya que antes de insertar un fragmento de muestra era necesario que en la celda de flujo hubiera permanganato potásico para que reaccionaran, mientras que la válvula 1 conmutaba a la posición ON, para introducir el primer segmento de oxidante. A partir de este momento y durante 8.5 segundos las válvulas 1 y 2 funcionaban alternativamente, cuando una se encontraba en la posición ON, la otra estaba en posición OFF y

viceversa, insertando un segmento de muestra o de oxidante. Insertados todos los segmentos se obtenía un pico y durante el tiempo restante para completar el ciclo, las válvulas retornaban a su posición inicial, circulando únicamente durante 25.2 segundos el agua por el sistema en flujo para restablecer la línea base, repitiéndose a los 35 segundos un nuevo ciclo para obtener otro pico.

En la Figura 7.33 se describe el perfil de inserción, donde se puede observar como 11 segmentos de oxidante de un tamaño de 0.3 segundos y 11 segmentos de muestra de 0.5 segundos eran insertados alternativamente en la corriente de arrastre y como transcurrido el tiempo del ciclo (35 segundos), se repetía nuevamente la secuencia de inserción para obtener un nuevo pico.



Figura 7.33: Perfil de inserción del montaje en flujo optimizado.

7.7. APLICACIONES ANALÍTICAS

Finalizada la optimización del sistema en flujo por multiconmutación, se procedió a estudiar las características analíticas del método: intervalo de linealidad, repetitividad, velocidad de inserción, límite de detección, reproducibilidad, robustez química y estudio de interferentes, para finalmente aplicar el método propuesto a la determinación de hidroquinona por quimioluminiscencia directa en muestras reales.

7.7.1. Intervalo de linealidad

El intervalo de linealidad se estableció ensayando disoluciones de hidroquinona entre 0.1 y 60.0 ppm. El calibrado (Figura 7.34) resultó ser lineal entre 0.1 y 15.0 ppm de hidroquinona, como se muestra en la Figura 7.35.

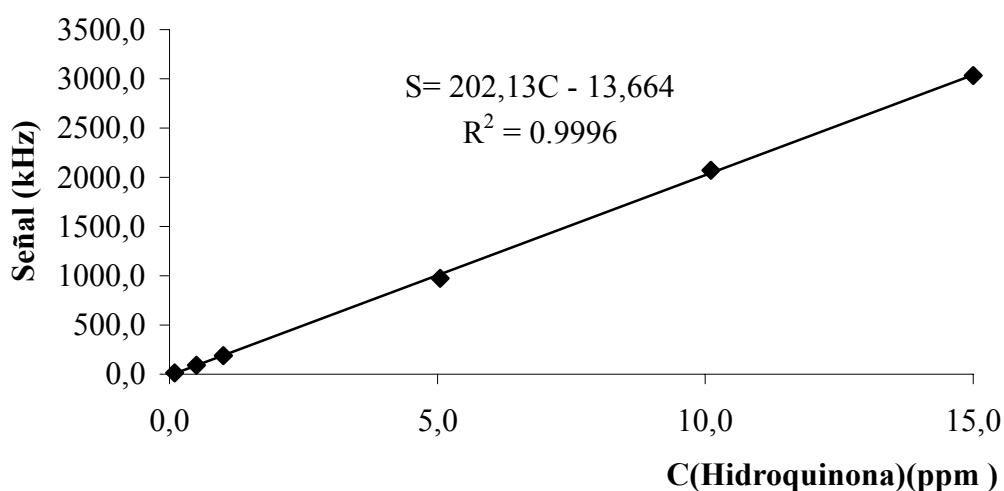


Figura7.34: Calibrado de hidroquinona en el intervalo de linealidad. S: Señal (kHz); C: Concentración (ppm).

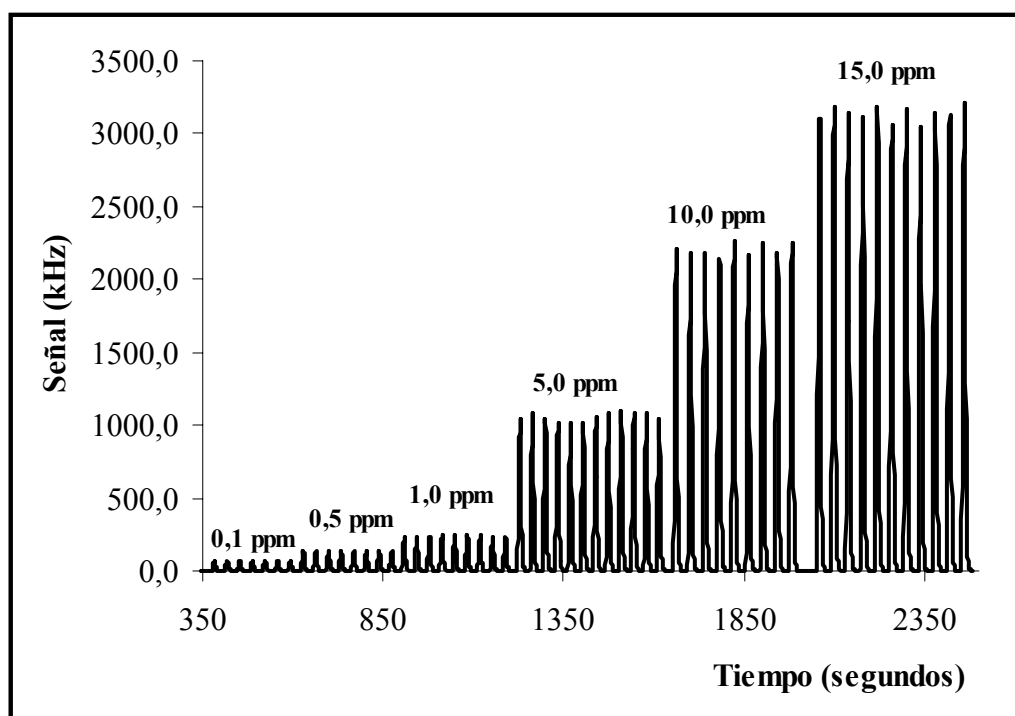


Figura 7.35: Calibrado en el intervalo de linealidad.

7.7.2. Estudio de la repetitividad y frecuencia de inserción

La repetitividad se obtuvo empíricamente, a partir de dos series independientes de 45 inserciones consecutivas de hidroquinona 0.5 y 10.0 ppm. El tiempo necesario para obtener un pico era de 35 segundos controlado automáticamente a través del “software”. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.26.

C (Hidroquinona) (ppm)	Frecuencia de inserción (muestras·h ⁻¹)	Repetitividad (n=45) (dsr %)
0.5	103	2.60
10.0	103	1.98

Tabla 7.26: Repetitividad y frecuencia de inserción del sistema para distintas concentraciones de hidroquinona.

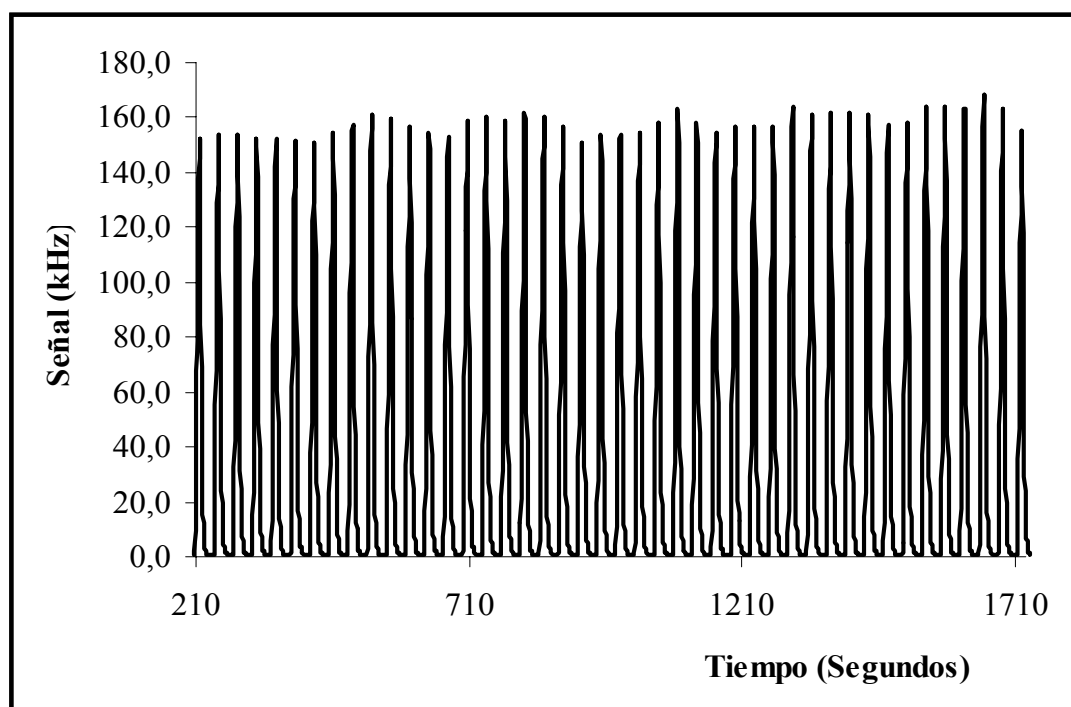


Figura 7.36: Estudio de la repetitividad para hidroxiquinona 0.5 ppm.

7.7.3. Límite de detección

El límite de detección se estableció como la mínima concentración de hidroxiquinona detectable con el método analítico propuesto.

Este parámetro se estudió ensayando experimentalmente concentraciones de hidroxiquinona hasta llegar a la mínima concentración cuya señal analítica era igual al promedio de la señal de 12 inserciones de blanco más dos veces la desviación estándar del blanco. El límite de detección obtenido de este modo fue de 0.03 ppm (30.0 ppb).

7.7.4. Reproducibilidad

Para estudiar la reproducibilidad del método analítico, se realizaron seis calibrados en distintos días y con disoluciones recién preparadas de los reactivos empleados, obteniéndose las respectivas ecuaciones de las rectas de calibrado. El intervalo de concentraciones estudiadas de hidroquinona estuvo comprendido entre 0.1 y 15.0 ppm.

Posteriormente, se calculó el promedio y la desviación estándar relativa de las pendientes. El valor medio de la pendiente obtenido para 6 calibrados fue 192.13 ppm⁻¹ con una desviación estándar relativa de 2.88%. Las rectas de calibrado obtenidas aparecen en la Tabla 7.27.

Pendiente	Ordenada en el origen	r²
202.13	-13.66	0.9996
192.57	-21.21	0.9988
188.25	-30.48	0.9994
185.91	39.32	0.9967
191.82	-22.56	0.9993
192.11	-21.93	0.9997

Tabla 7.27: Reproducibilidad entre días y distintas disoluciones.

7.7.5. Estudio de la robustez química

Con el propósito de estudiar la reproducibilidad química del sistema optimizado, se realizó una experiencia empleando para cuatro de los componentes que intervienen en la reacción quimioluminiscente, reactivos procedentes de dos casas comerciales distintas (Tabla 7.28).

Reactivos	Casa comercial
Hidroquinona	Panreac Merck
H ₂ SO ₄	Panreac Merck
Sulfato de quinina	Guinama Fluka
KMnO ₄	Panreac Probus
Cloruro de benzalconio (BAC)	Guinama

Tabla 7.28: Reactivos y casas comerciales empleadas.

Con estos reactivos se prepararon diversas disoluciones, para finalmente obtener 16 combinaciones posibles entre todos los componentes responsables de la emisión quimioluminiscente.

Posteriormente se midió la señal analítica para 2.0 y 10.0 ppm de hidroquinona y se calculó el error relativo respecto a la señal de la combinación de referencia (obtenida con los reactivos empleados en todo el trabajo), así como la reproducibilidad entre las señales obtenidas para todas las combinaciones durante el ensayo.

Como se observa en la Tabla 7.29, en ningún caso se perdió la señal quimioluminiscente. Las desviaciones estándar relativa para la media de todas las señales para 2.0 y 10.0 ppm de hidroquinona fueron de 4.7% y 4.3% respectivamente. Por tanto se puede afirmar, que se trata de un método analítico químicamente robusto.

Nº	Combinación de reactivos	Er(%)	Er(%)
		2.0 ppm	10.0 ppm
1	H ₂ SO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ <i>Panreac</i> /Hidroquinona <i>Panreac</i> Q* <i>Guinama</i> /BAC* <i>Guinama</i>	Ref	Ref
2	H ₂ SO ₄ Merck /KMnO ₄ <i>Panreac</i> /Hidroquinona <i>Panreac</i> Q* <i>Guinama</i> /BAC* <i>Guinama</i>	-2.6	0.3
3	H ₂ SO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ <i>Panreac</i> /Hidroquinona <i>Panreac</i> Q* Fluka /BAC* <i>Guinama</i>	-2.4	2.0
4	H ₂ SO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ Probus /Hidroquinona <i>Panreac</i> Q* <i>Guinama</i> /BAC* <i>Guinama</i>	-3.3	-2.1
5	H ₂ SO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ <i>Panreac</i> /Hidroquinona Merck Q* <i>Guinama</i> /BAC* <i>Guinama</i>	-1.6	-1.5
6	H ₂ SO ₄ Merck /KMnO ₄ <i>Panreac</i> /Hidroquinona <i>Panreac</i> Q* Fluka /BAC* <i>Guinama</i>	-0.8	2.3
7	H ₂ SO ₄ Merck /KMnO ₄ Probus /Hidroquinona <i>Panreac</i> Q* <i>Guinama</i> /BAC* <i>Guinama</i>	4.0	2.0
8	H ₂ SO ₄ Merck /KMnO ₄ <i>Panreac</i> /Hidroquinona Merck Q* <i>Guinama</i> /BAC* <i>Guinama</i>	1.4	2.9
9	H ₂ SO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ Probus /Hidroquinona <i>Panreac</i> Q* Fluka /BAC* <i>Guinama</i>	11.2	-6.5
10	H ₂ SO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ <i>Panreac</i> /Hidroquinona Merck Q* Fluka /BAC* <i>Guinama</i>	-0.4	-5.1
11	H ₂ SO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ Probus /Hidroquinona Merck Q* <i>Guinama</i> /BAC* <i>Guinama</i>	4.0	-9.8
12	H ₂ SO ₄ Merck /KMnO ₄ Probus /Hidroquinona <i>Panreac</i> Q* Fluka /BAC* <i>Guinama</i>	4.6	3.2
13	H ₂ SO ₄ Merck /KMnO ₄ <i>Panreac</i> /Hidroquinona Merck Q* Fluka /BAC* <i>Guinama</i>	0.5	-0.7
14	H ₂ SO ₄ Merck /KMnO ₄ Probus /Hidroquinona Merck Q* <i>Guinama</i> /BAC* <i>Guinama</i>	7.6	-0.2
15	H ₂ SO ₄ <i>Panreac</i> /KMnO ₄ Probus /Hidroquinona Merck Q* Fluka /BAC* <i>Guinama</i>	4.6	6.8
16	H ₂ SO ₄ Merck /KMnO ₄ Probus /Hidroquinona Merck Q* Fluka /BAC* <i>Guinama</i>	-0.8	-2.9

Tabla 7.29: Estudio de la robustez química para 2.0 y 10.0 ppm de hidroquinona. En negrita se muestran las casas comerciales distintas a las de referencia utilizadas en cada caso. Nº: Combinaciones; Q*: Sulfato de quinina; BAC*: Cloruro de benzalconio; Ref: Referencia (señal obtenida con los reactivos utilizados en todo el trabajo).

7.7.6. Estudio de los interferentes

Antes de proceder a la aplicación del método propuesto a la determinación de hidroquinona en muestras reales, se estudió la influencia que podían tener sobre la señal analítica sustancias que suelen acompañar al analito, bien en preparaciones farmacéuticas, reveladores fotográficos y en aguas residuales o superficiales que fueron los distintos tipos de muestras analizadas.

Para ello se prepararon disoluciones que contenían 1.0 ppm de hidroquinona y concentraciones de interferente muy superiores a las presentes en la muestras reales. Para cada interferente se obtuvo un mínimo de 6 inserciones y se comparó la señal obtenida con la disolución de referencia de 1.0 ppm de analito sin interferente. Se consideró que la especie no interfería cuando originaba errores relativos inferiores al 3 ó 4 % respecto a la disolución patrón de hidroquinona.

Para llevar a cabo el estudio de los interferentes se dividió en tres grupos de compuestos: en primer lugar se consideraron algunas sustancias que pueden acompañar a la hidroquinona en las *formulaciones farmacéuticas* principalmente principios activos, excipientes, y conservantes.

En segundo lugar se ensayaron distintos componentes que pueden aparecer junto con la hidroquinona en *los reveladores fotográficos* y por último se estudiaron la influencia de especies como metales pesados o iones inorgánicos presentes en las *aguas residuales o superficiales*.

En la Tabla 7.30 aparecen las sustancias empleadas para el estudio de interferentes en las preparaciones farmacéuticas junto con los errores obtenidos en cada caso. En la Tabla 7.31 se agrupan los resultados para los distintos componentes de los reveladores fotográficos ensayados y finalmente en las Tablas 7.32, 7.33 se muestran los resultados para las especies ensayadas presentes en las aguas.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
β -ciclodextrina	102.0*	3.6
Acetona 15 %	150000*	2.7
Ácido ascórbico (Vitamina C)	5.0	3.7
Ácido cítrico	1.0	3.2
Ácido glicólico	1.0	3.5
Ácido retinoico (vitamina A)	10.1	0.5
Aloe vera	121.8*	0.2
EDTA (Na) ₂	1.0	3.1
Etanol	50.0	2.0
Glicerina	5.0	-0.2
Lauril sulfato sódico	100.0*	0.7
Metabisulfito sódico	0.1	0.2
Metilparaben	0.1	0.0
NaCl	102.0*	2.0
NH ₄ OH	100.0*	-2.1
Propilenglicol	5.0	1.1
Propilparaben	0.1	0.5
Sulfito sódico	0.5	3.9
Sulisobenzona	0.1	3.4
Trietanolamina 99 %	101.4*	2.5
Urea	100.1*	0.0

* Concentración máxima ensayada.

Tabla 7.30: Estudios de posibles interferentes presentes en formulaciones farmacéuticas.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Bromuro potásico	11.5	-0.9
Metaborato sódico	48.7*	-1.0
Na ₂ CO ₃ anhidro	502.2	3.1
NaOH	500*	2.2
Para-metilaminofenolsulfato (Metol) (1)	0.05	5.7
Sulfito sódico (2)	52.1*	-0.87
Tetraborato sódico (Bórax)	55.7*	-2.3

* Concentraciones máximas ensayadas.

Tabla 7.31: Estudio de sustancias presentes en los reveladores fotográficos.

(1) Era de destacar la indudable interferencia del metol, que al ser un polifenol presentaba quimioluminiscencia por sí mismo al reaccionar con el KMnO₄ en medio ácido sulfúrico, dicha quimioluminiscencia del metol se comprobó con el sistema por multiconmutación optimizado en ausencia de la hidroquinona.

(2) Como se muestra en la Tabla 7.30 el sulfito sódico interfería claramente, siendo necesario disminuir la concentración hasta 0.5 ppm para alcanzar errores relativos inferiores al 4%.

Esta interferencia se consiguió eliminar en medio ácido y con calor, convirtiendo el sulfito sódico en anhídrido sulfuroso más agua. Para ello, se calentó en placa calefactora a 80°C con agitación simultánea durante 16 minutos, alícuotas de las disoluciones madres de sulfito sódico, hidroquinona y ácido sulfúrico. Transcurrido este tiempo se incorporó la cantidad necesaria del tensoactivo y sensibilizador, para finalmente aforar hasta 100 ml con agua desionizada y tener las concentraciones deseadas: 52.1 ppm de sulfito sódico, 1.0 ppm de hidroquinona, H₂SO₄ 1.0 mol·l⁻¹, sulfato de quinina 0.5 mmol·l⁻¹ y BAC 10.0 mmol·l⁻¹, comprobándose experimentalmente como se observa en la Tabla 7.31, que tras este tratamiento se eliminó totalmente el sulfito sódico, alcanzándose errores por debajo del 1.0% para concentraciones superiores a 50.0 ppm.

Interferentes	Concentración (ppm)	Er(%)
Acetato (NaCH ₃ -COO·3H ₂ O)	1000.2*	0.5
Carbonato (Na ₂ CO ₃)	502.2	3.1
Cloruro (NaCl)	999.8*	1.4
Fosfato (KH ₂ PO ₄)	999.9*	-2.0
Nitrato (NaNO ₃)	1199.4*	-2.7
Nitrito (NaNO ₂)	0.5	-1.6
Sulfato (Na ₂ SO ₄)	499.9	3.1
Sulfito (Na ₂ SO ₃)	0.5	3.9

* Concentración máxima ensayada

Tabla 7.32: Estudio de posibles aniones presentes en las aguas. Entre paréntesis aparecen la sal que se adicionó a la disolución de hidroquinona.

Interferente	Concentración (ppm)	Er(%)
Aluminio (Al ₃ (NO ₃) ₃ ·9 H ₂ O)	49.9	-1.9
Amonio (NH ₄ Cl)	60.0	2.9
Bario (Ba(NO ₃) ₂)	100.0*	Precipita
Cadmio (Cd(NO ₃) ₂)	50.0	-2.7
Calcio (Ca(NO ₃) ₂ ·3 H ₂ O)	503.0*	2.9
Cobalto (Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O)	50.1	-1.1
Cobre (Cu(NO ₃) ₂ ·3 H ₂ O)	100*	0.8
Cromo (Cr(NO ₃) ₃ ·9 H ₂ O)	100.9*	2.6
Hierro (Fe(NO ₃) ₃ ·9 H ₂ O)	20.0	-0.7
Magnesio (Mg(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O)	200.3*	-0.3
Manganeso (Mn(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O)	55.1	3.7
Mercurio (Hg(NO ₃) ₂ ·H ₂ O)	99.4*	-1.9
Níquel (Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O)	98.6*	0.4
Plata (AgNO ₃)	100.0*	Precipita
Plomo (Pb(NO ₃) ₂)	100.0*	Precipita
Potasio (KNO ₃)	315.4*	3.0
Sodio (NaNO ₃)	444.7*	-2.7
Zinc (Zn(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O)	99.3*	3.3

* Concentración máxima ensayada.

Tabla 7.33: Estudio de posibles cationes presentes en las aguas. Entre paréntesis aparecen la sal que se adicionó a la disolución de hidroquinona.

7.7.7. Análisis de muestras reales

Para finalizar se procedió a la determinación de hidroquinona en dos formulaciones farmacéuticas comerciales, en dos tipos de aguas (residual y superficial) procedentes de dos municipios de la Comunidad Valenciana y en un revelador fotográfico.

El revelador fotográfico se elaboró en el laboratorio, según la composición descrita en un libro de fotografía²⁹⁵.

La presentación, procedencia y composición de cada muestra empleada, aparece descrita en las Tablas 7.34 y 7.35.

Tipo de preparado	Procedencia	Composición
REVELADOR FOTOGRAFICO D.8		Cada litro de revelador contiene: Hidroquinona, 45 g Sulfito sódico anhidro, 90 g Hidróxido sódico, 37.5 g Tetraborato sódico (Bórax), 30 g Agua desionizada c.s.p
AGUA RESIDUAL (Acequia)	Alboraya (Valencia)	
AGUA SUPERFICIAL (Acequia de riego)	Puig (Valencia)	

Tabla 7.34: Composición y procedencia de muestras reales a las que se aplicó el método.

Nombre comercial y tipo de preparado	Procedencia	Composición*
LICOSTRATA Gel	Laboratorio Cantabria S.A.	Cada 100 g contiene: 2 g de hidroquinona <i>Excipientes:</i> Etanol (22.27% v/v) Ácido glicólico (11.44 %) Propilenglicol Policuaternario-10 Hidróxido amónico Ácido cítrico anhidro Metabisulfito de sodio (E223) Sulfito de sodio heptahidrato (E221) Edetato disódico Butilhidroxitolueno (E321) Agua purificada c.s.p.
NADONA 2 % Crema	Laboratorios Medea S.A.	Cada 100 g de gel contiene: 2 g de hidroquinona <i>Excipientes:</i> Isoestearatos de sorbitánglicerilo Cera de abejas Ciclometicona Dimeticona copoliol Ciclometicona dimeticonol C ₁₂ -C ₁₅ alquilbenzoato 4-Metil-benciliden-bornanona Butil metoxidibenzoilmetano Cloruro sódico Edetato de disódico E-300 E-218 E-216 E-223 E-320 Acido glicólico Hidroxipropil-β-ciclodextrina Agua purificad c.s.p.

Tabla 7.35: Composición y procedencia de las formulaciones farmacéuticas comerciales a las que se aplicó el método propuesto. *Composición según etiquetado.

El tratamiento previo a que se sometieron las muestras reales fue el siguiente:

➤ Para la preparación de las *formulaciones farmacéuticas*, se realizó una extracción sólido-líquido tanto para el gel como para la crema. El pretratamiento seguido se describe a continuación y puede dividirse en las siguientes etapas:

- En primer lugar, se pesó en un vaso de precipitados y con balanza analítica una cantidad de muestra (exactamente alrededor de 0.235 g) equivalente a 4.0 mg de hidroquinona para cada una de las tres réplicas, se disolvieron en 35 ml de agua desionizada medidos con pipeta aforada y se mantuvieron agitando durante dos horas, de esta forma se conseguía que todo lo que fuera soluble en agua se dispersara en la disolución y aquello no soluble precipitara en el fondo del vaso de precipitados.

- En segundo lugar, transcurrido el tiempo de agitación, del sobrenadante se tomó una alícuota de 5 ml (medida con pipeta aforada) para tener una concentración dentro del intervalo de linealidad y se transfirió a un matraz aforado de 100 ml donde se adicionaron las cantidades necesarias de sulfato de quinina, cloruro de benzalconio, ácido sulfúrico para finalmente enrasar con agua desionizada hasta 100 ml.

- Las tres réplicas de cada una de las muestras *Licostrata* y *Nadona* fueron procesadas en el montaje optimizado junto con un calibrado de hidroquinona de 0.1 a 15.0 ppm. La concentración de hidroquinona en las muestras se determinó por interpolación de la señal en la recta de calibrado obtenida a partir de las disoluciones patrón.

A continuación, con el propósito de poder comprobar la bondad de los resultados, se realizó la determinación de hidroquinona en el gel *Licostrata* y en la crema *Nadona* mediante el método oficial de análisis descrito en la Farmacopea de Estados Unidos³⁷³, para la determinación de hidroquinona en crema. Este básicamente consistía en pesar una cantidad de muestra equivalente a 20 mg de

hidroquinona triturlarla, disolverla en metanol y tras las diluciones oportunas obtener una concentración de 10.0 ppm. Finalmente, se comparaban las absorbancias obtenidas a 293 nm para un patrón de hidroquinona 10.0 ppm en metanol y para la muestra también de 10.0 ppm, utilizando como blanco el mismo disolvente, realizándose para cada muestra tres réplicas independientes.

Los resultados obtenidos con este método de referencia para la determinación de hidroquinona en el *gel* se pudieron comparar con los resultantes con el método propuesto. Pero en el caso de la *crema*, las cantidades obtenidas eran muy superiores a las establecidas por el fabricante o con el método propuesto.

Por esta razón, se decidió realizar un espectro de un patrón de 10.0 ppm de hidroquinona y de muestra 10.0 ppm en metanol, entre 200 a 350 nm para observar donde se encontraban los máximos (Figura 7.37). En ambos casos la forma del espectro fue idéntico, pero las absorbancias de la muestra eran muy superiores.

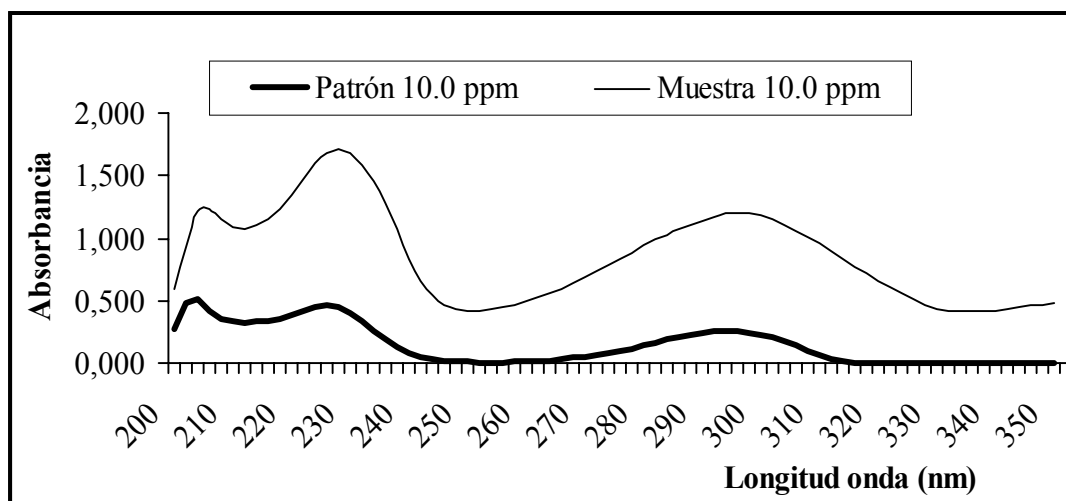


Figura 7.37: Espectros para el patrón y muestra 10.0 ppm en metanol.

Se pensó que podría existir algún efecto matriz que exaltara la señal, así que para eliminar este efecto se realizó una adición estándar, pero no se consiguió erradicarlo y se continuaba obteniéndose valores de absorbancia muy elevados para la muestra.

Finalmente se probó a realizar el mismo tratamiento (extracción sólido-líquido) de la muestra, utilizado para el análisis de la hidroquinona por el método propuesto y determinar la cantidad de analito espectrofotométricamente, disolviendo la muestra en agua y no en metanol como se efectuaba en el método de referencia. El procedimiento a seguir para realizar este ensayo fue el siguiente:

- En primer lugar se realizó un espectro de 10.0 ppm de hidroquinona en agua, entre 200 y 350 nm para observar a que longitud de onda se obtenían las máximas absorbancias, para posteriormente realizar la determinación en medio acuoso. Como se observa en la Figura 7.38 se obtuvieron dos máximos a dos longitudes de onda y aunque la absorbancia máxima se mostraba a 222 nm, se decidió trabajar a 290 nm, porque en la zona de 222 nm podían absorber más compuestos.

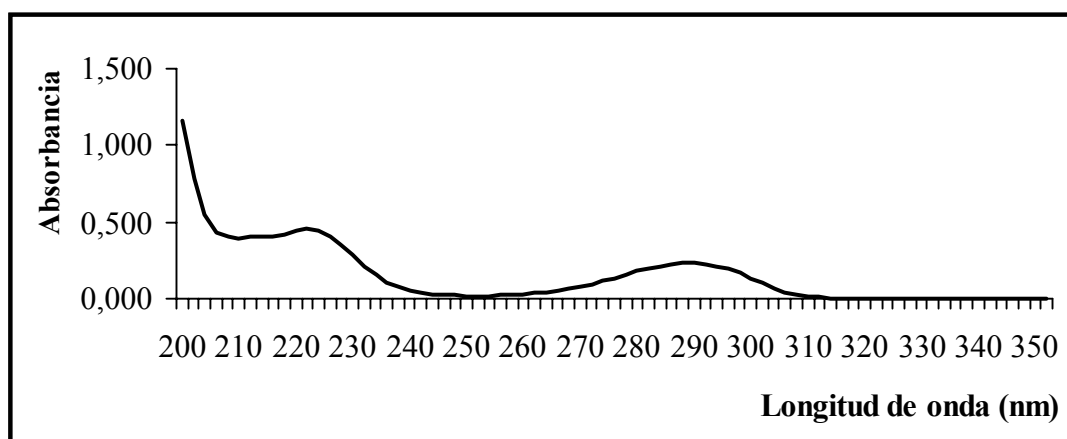


Figura 7.38: Espectro de la hidroquinona en agua, a una concentración de 10.0 ppm.

- Una vez elegida la longitud de onda de trabajo, se prepararon de idéntica forma tres réplicas independientes de la *crema Nadona* mediante el procedimiento descrito para la determinación de hidroquinona por el método propuesto. Para ello, se pesó en vaso de precipitados y con balanza analítica una cantidad de crema (alrededor de 0.310 g) equivalente a 6.0 mg de hidroquinona, se disolvieron en 35 ml de agua medidos con pipeta aforada y se mantuvieron agitando durante 2 horas.

- Transcurrido el tiempo de agitación, del sobrenadante se pipetearon con pipeta aforada 15 ml (cantidad de muestra necesaria para obtener una concentración final de hidroquinona comprendida en intervalo del calibrado) y se depositaron en un matraz aforado de 100 ml llevándose a volumen con agua desionizada.

- Finalmente, se preparó un calibrado de hidroquinona entre 3.0 y 40.0 ppm en agua, se midieron a 290 nm las absorbancias de los patrones y de las muestras y se calculó la concentración de hidroquinona por interpolación de las señales en la recta de calibrado obtenida a partir de las disoluciones patrón.

Este ensayo resultó exitoso, pudiéndose comparar los resultados obtenidos con este método de referencia para la determinación de hidroquinona, con los presentados con el método propuesto. En la Tabla 7.36 se muestran los resultados junto con las desviaciones estándar relativas obtenidas para cada una de las réplicas. En la misma tabla se comparan los valores obtenidos por el método propuesto con los declarados por el fabricante y con los resultantes del método de referencia para ambas formulaciones farmacéuticas.

Muestra	Método propuesto (dsr%)	Método referencia (dsr%)	Cantidad declarada fabricante	Er(%)* respecto referencia	Er(%)* respecto fabricante
Licostrata					
Gel g analito/100g muestra	2.13 (0.9)	2.09 (1.0)	2.00	1.9	6.5
Nadona					
Crema g analito/100g muestra	2.02 (4.3)	2.13 (5.4)	2.00	-5.1	1.0

Tabla 7.36: Resultados de la determinación de hidroquinona en las formulaciones farmacéuticas. *Error relativo del método propuesto.

➤ Las dos *muestras de agua* procedentes de dos municipios distintos de la Comunidad Valenciana, se tomaron con un recipiente adecuado previamente enjuagado con la misma agua y recogiénola desde la parte inferior hasta la superior para evitar la mezcla de capas. Una vez recogidas las muestras se guardaron en la nevera y en la oscuridad hasta que fueran analizadas.

El procedimiento para la preparación de las dos muestras, de agua superficial y residual fue idéntico. En primer lugar se filtraron con placa filtrante (de tamaño de poro 4), seguidamente se pesó en balanza analítica la cantidad necesaria (alrededor de 0.010 g) de hidroquinona, se transfirió a un matraz aforado de 100 ml se agitó y se enrasó con el agua filtrada, obteniéndose tres madres para cada una de las muestras dopadas entre 106.0 y 110.0 ppm. A partir de cada una de estas disoluciones se tomó una alícuota de 5 ml medida con el material volumétrico adecuado y se transvasó a un matraz aforado junto con el sulfato de quinina, el cloruro de benzalconio, el ácido sulfúrico y se aforó con agua desionizada hasta 100 ml, para obtener una disolución de concentración situada en la zona central del intervalo de linealidad del método propuesto.

Finalmente la concentración de hidroquinona presente en las muestras de agua, se determinó del modo habitual por interpolación en la recta de calibrado de 0.1 a 15.0 ppm obtenida con las disoluciones patrón y se comparó con la cantidad adicionada de analito a la matriz de agua.

➤ En cuanto al *revelador fotográfico D8*, la muestra fue preparada en el laboratorio pesando en balanza analítica con la mayor exactitud posible las cantidades de los componentes del revelador. Se prepararon tres disoluciones madre diluyendo 100 veces la muestra para tener una concentración de hidroquinona de 450.0 ppm. De cada una de estas disoluciones se tomó una alícuota 1 ml (medida con pipeta aforada) y se transfirió a un vaso de precipitados.

Uno de los componentes mayoritario del revelador era el sulfito sódico, el cual interfería claramente exaltando la señal quimioluminiscente. Como se comprobó en el apartado 7.7.6, era posible eliminar su acción si calentábamos en medio ácido. Así que antes de poder determinar la concentración de hidroquinona, era necesario realizar un pretratamiento de la muestra.

Para ello, se intentó reproducir el mismo tratamiento que cuando se estudió como interferente. De forma que al vaso de precipitados que contenía el mililitro de la disolución madre de muestra, se le adicionó 5.55 ml de H₂SO₄ concentrado y 10 ml de agua desionizada para mantener la misma proporción de volumen. Posteriormente se calentó en placa calefactora a 80°C con agitación continua durante 16 minutos, al ser más elevada la cantidad de sulfito sódico, fue necesario para eliminar totalmente la presencia del interferente calentar la disolución durante 30 minutos. Una vez enfriada la disolución resultante se trasvasó a un matraz aforado de 100 ml en donde se adicionaron las cantidades necesarias de cloruro de benzalconio y sulfato de quinina, enrasándose con agua desionizada hasta 100 ml. Finalmente la concentración obtenida para las tres réplicas (4.5 ppm) se encontraba dentro del intervalo de linealidad del método propuesto.

Para la determinación de la concentración de hidroquinona en el revelador, se interpolaron los valores de las señales obtenidas en la recta de calibrado comprendida entre 0.1 y 15.0 ppm y se comparó la concentración encontrada respecto a la contenida.

Los resultados de todas estas experiencias se reproducen en la Tabla 7.37, junto con las desviaciones estándar relativa de las tres réplicas realizadas. En la misma tabla se comparan los resultados obtenidos por el método propuesto respecto a la cantidad contenida o adicionada de analito.

Muestra	Cantidad adicionada o contenida	Método propuesto (dsr%)	Er(%) del método propuesto respecto a la cantidad adicionada o contenida
Revelador fotográfico D8	45.000 ppm 4.5 ppm**	4.7 ppm (1.0)	4.4
Agua Superficial (Puig)*	5.5 ppm	5.3 ppm (3.5)	-3.6
Agua Residual (Alboraya)*	5.5 ppm	5.4 ppm (0.9)	-1.8

Tabla 7.37: Resultados obtenidos para el resto de muestras ensayadas. *Muestras dopadas con hidroquinona.** Concentración resultante tras las diluciones oportunas del revelador.

7.8. APLICACIÓN ANALÍTICA DEL SISTEMA EN FLUJO POR MULTICONMUTACIÓN A OTROS FENOLES Y POLIFENOLES

Como se describe en el apartado 4.3.3 del capítulo cuarto, los fenoles y polifenoles presentaban quimioluminiscencia al reaccionar con el KMnO_4 en medio ácido. Por esta razón, se decidió aplicar el método propuesto a la determinación de otros fenoles y polifenoles, con aplicación farmacológica conocida.

Para los seis compuestos estudiados se realizaron cinco calibrados de seis puntos cada uno, obteniéndose las respectivas ecuaciones de las rectas de calibrado y calculándose el promedio y la desviación estándar relativa de las pendientes. El intervalo de concentraciones estudiadas de analito estuvo comprendido entre 0.1 y 15.0 ppm.

Posteriormente, para cada uno de ellos se calculó el límite de detección, establecido como la mínima concentración de analito que presentó una señal analítica igual o superior al valor medio de la señal del blanco más 2 veces su desviación estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 7.38, 7.39, 7.40, 7.41, 7.42 y 7.43.

Compuesto Actividad farmacológica	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²	Pendiente media dsr(%)	Ldd (ppb)
	239.59	-47.895	0.9986		
RESORCINOL	239.48	-34.034	0.9980	237.99	10.0
Antiseborreico				(1.15)	
queratolítico y antifúngico	239.74	-34.690	0.9973		
	233.15	-10.720	0.9963		
	238.30	-0.6196	0.9977		

Tabla 7.38: Estudios para el resorcinol.

Compuesto Actividad farmacológica	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²	Pendiente Media dsr(%)	Ldd (ppb)
	159.68	-63.523	0.9916		
FLOROGLUCINOL	160.48	-66.361	0.9913	160.45	10.0
Antiespasmódico				(2.20)	
	155.20	-37.235	0.9939		
	164.83	-65.250	0.9925		
	162.10	63.695	0.9933		

Tabla 7.39: Estudios para el floroglucinol.

Compuesto Actividad farmacológica	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²	Pendiente media dsr(%)	Ldd (ppb)
	102.790	-34.571	0.9950		
CATECOL	97.747	-40.686	0.9918	101.58	40.0
Antiséptico				(3.41)	
	98.758	-40.044	0.9945		
	102.160	-41.583	0.9950		
	106.460	-37.136	0.9958		

Tabla 7.40: Estudios para el catecol.

Compuesto Actividad farmacológica	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²	Pendiente media dsr(%)	Ldd (ppb)
	92.883	10.641	0.9996		
ÁCIDO 4- HIDROXICINÁMICO	90.447	-10.262	0.9989		
Antibacteriano	91.127	-14.326	0.9986	91.56 (1.00)	20.0
antifúngico	91.982	6.496	0.9992		
	91.371	-2.6665	0.9998		

Tabla 7.41: Estudios para el ácido 4-hidroxicinámico.

Compuesto Actividad farmacológica	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²	Pendiente media dsr(%)	Ldd (ppb)
	107.18	-50.069	0.9920		
QUERCETINA	110.64	-23.136	0.9979		
Antihemorroidal	107.37	-23.997	0.9949	108.98 (1.91)	20.0
	111.76	-26.105	0.9963		
	107.97	-6.6559	0.9943		

Tabla 7.42: Estudios para la quercetina.

Compuesto Actividad farmacológica	Pendiente	Ordenada en el origen	r ²	Pendiente media dsr(%)	Ldd (ppb)
	49.851	-11.56	0.9983		
EUGENOL	47.859	-18.35	0.9961		
Analgésico dental y antiespasmódico	50.914	-17.00	0.997	49.71 (2.46)	80.0
	49.260	-12.05	0.9953		
	50.667	-18.42	0.9949		

Tabla 7.43: Estudios para el eugenol.

7.9. CONCLUSIONES

Se propone un nuevo sistema de análisis en flujo por multiconmutación, que permite la determinación de hidroquinona mediante la oxidación quimioluminiscente del analito, donde el consumo de reactivos y de muestra es mucho menor que en análisis por inyección en flujo convencional. Hay que destacar que la emisión quimioluminiscente se exalta con la presencia del sensibilizador sulfato de quinina y del tensoactivo cloruro de benzalconio.

El montaje consta de tres válvulas solenoide en paralelo ubicadas dentro del luminómetro, lo más cerca posible de la celda de flujo para evitar la dispersión de la muestra. Las válvulas controladas a través del “software” funcionan como microdispensadores de las disoluciones reactivas y según el tiempo en que se encuentran en posición ON/OFF, se insertan más o menos segmentos de igual o distinto tamaño de las disoluciones. El sistema posee tres canales por donde se impulsan a una velocidad de flujo de $7.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, las disoluciones termostatadas a 60.0°C hacia una celda de flujo en espiral y se detecta la señal quimioluminiscente del producto de reacción formado.

El tiempo necesario para realizar un ciclo completo o lo que es lo mismo obtener un pico, es de 35 segundos. Durante el primer segundo del ciclo únicamente se impulsa hacia el detector la corriente de arrastre (agua), a continuación se insertan 11 segmentos de un tamaño 0.3 segundos de KMnO_4 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en H_2SO_4 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ alternados con otros 11 segmentos de un tamaño 0.5 segundos de muestra en ácido sulfúrico $1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ junto con el sensibilizador sulfato de quinina $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ y el tensoactivo cloruro de benzalconio $10.0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, finalmente durante los 25.2 segundos restantes hasta completar el ciclo, el agua circula nuevamente hacia la celda de flujo para restablecer la línea base y terminar el pico. Transcurrido este tiempo se repite otra vez el ciclo para obtener una nueva señal analítica.

El método propuesto aplicado a la determinación de hidroquinona en formulaciones farmacéuticas, en aguas tanto residuales como superficiales y a un revelador fotográfico, presenta una elevada velocidad de muestreo (103 h^{-1}), una excelente repetitividad entre muestras ($\text{dsr} = 1.98\%$, $n=45$, 10.0 ppm), así como una magnífica reproducibilidad entre días y disoluciones ($\text{dsr}_{\text{pendiente recta}} = 2.88\%$, $n=6$).

El sistema posee las ventajas comunes de la detección quimioluminiscente, es decir, una buena sensibilidad, un bajo límite de detección (30 ppb) y un intervalo de linealidad aceptable (desde 0.1 a 15.0 ppm). Además, los estudios de robustez química revelan que la señal quimioluminiscente no se ve alterada aunque varíe la procedencia de los reactivos utilizados ($\text{dsr}=4.7\%$, $n=16$, 2.0 ppm) y ($\text{dsr}=4.3\%$, $n=16$, 10.0 ppm).

Por último, destacar la selectividad del método propuesto que queda patente por la gran cantidad de sustancias ensayadas que no interfieren y que permiten analizar cierto número de muestras con un pretratamiento mínimo.

Capítulo octavo

CONCLUSIONES FINALES

1ª) La aplicación de la conectividad molecular para predecir el comportamiento quimioluminiscente de fenoles y polifenoles cuando reaccionan con oxidantes inorgánicos en fase líquida. Para un total de 88 compuestos teóricamente ensayados con la función discriminante, 78 fueron clasificados como quimioluminiscentes. Estas predicciones teóricas se han confirmado empíricamente en un montaje en flujo continuo con diversos oxidantes fuertes, con un 100% de éxito sobre las predicciones teóricas.

2ª) Se han desarrollado nuevos métodos de quimioluminiscencia directa para la determinación de fenol, ácido tánico e hidroquinona mediante análisis en flujo (F.I.A. o multiconmutación), empleando el permanganato potásico en medio ácido sulfúrico como oxidante para la obtención de dicha quimioluminiscencia directa. Esta señal quimioluminiscente se exalta con diferentes agentes químicos y/o físicos, concretamente ácido fórmico y una temperatura de 80°C en la determinación de fenol; sulfato de quinina y una temperatura de 60°C en la determinación de ácido tánico; sulfato de quinina, el tensoactivo catiónico cloruro de benzalconio y una temperatura de 60°C en la determinación de hidroquinona.

3ª) La incorporación de un reactor en fase sólida en línea a un sistema F.I.A. para la determinación de fenol en aguas, incrementa la *selectividad* del sistema analítico y permite analizar la muestra sin requerir un pretratamiento de la misma, que suele ser costoso, complejo y consume gran cantidad de tiempo, necesario tanto en el método oficial de análisis y en otros métodos cromatográficos desarrollados para la determinación de fenol en aguas. Además, este reactor favorece la *sensibilidad* al preconcentrar el analito, que junto con la detección quimioluminiscente permite alcanzar un límite de detección de una 1 ppb, lo que posibilita aplicar este método de análisis a la determinación de fenol en todo tipo de aguas, ya sean residuales, superficiales o de abastecimiento público de acuerdo con las cantidades establecidas en la legislación. Cabe destacar que el límite de detección se mejora notablemente respecto a otros trabajos donde también se incluye una etapa de preconcentración en línea^{56,79,313}. Por último, decir que presenta una velocidad de

muestreo óptima si se compara con el tiempo necesario para analizar una única muestra por el método normalizado de análisis, en el que se requiere una destilación previa y una extracción con cloroformo para alcanzar sensibilidades en torno a las ppb.

4ª) El análisis en flujo por multiconmutación permite miniaturizar los montajes, aumentar la reproducibilidad del sistema al ser mínima la intervención del operador, debido a que los procesos de inserción de disoluciones se controlan a través del “software”, disminuir el consumo de reactivos y de muestra en comparación con el F.I.A., y además, favorece el mezclado íntimo de los mismos al tratarse de microinserciones de unos pocos μl correspondientes a tiempos de fracciones de segundo.

5º) Las características analíticas de las determinaciones de fenol, ácido tánico e hidroquinona fueron, respectivamente y por este orden: *repetitividad* 7.30 % (n=15, 20.0 ppb), 2.10 % (n=25, 5.0 ppm), 1.98 % (n=45, 10.0 ppm); *frecuencia de inserción* 4, 56, 103 muestras por hora; *intervalo de linealidad* comprendido entre 1.0 y 20.0 ppb, 0.5 y 20.0 ppm, 0.1 y 15.0 ppm; *límite de detección* de 1.0 ppb, 100.0 ppb, 30.0 ppb; *reproducibilidad entre días* 9.50 % (n= 5), 4.40 % (n=5), 2.88 % (n=6); y *robustez química* 4.6 % (n=8, 12.0 ppm) y 4.3 % (n=16, 10.0 ppm) para el ácido tánico y la hidroquinona.

6º) Los tres nuevos métodos analíticos en flujo se aplican satisfactoriamente al análisis de distintas muestras reales, debido a la gran selectividad de los mismos, que queda confirmada con la elevada cantidad de sustancias ensayadas que no interfieren en la determinación de los analitos. El fenol se determina en muestras de interés medioambiental: aguas superficiales y residuales. El ácido tánico se determina en formulaciones farmacéuticas, preparaciones galénicas y orina humana, así como en muestras de interés medioambiental: aguas superficiales. La hidroquinona se cuantifica en formulaciones farmacéuticas, en muestras de interés medioambiental: aguas superficiales y residuales y en un revelador fotográfico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. “Flow injection analysis I. New concept of fast continuous flow analysis”, J. Ruzicka and E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 1975, 78, 145-157
2. “Rapid analysis of discrete samples: the use of nonsegmented continuous flow”, K.K. Stewart, G.R. Beecher and P. Hare, *Anal. Biochem.*, 1976, 70, 167-173
3. “Nonequilibrated sample manipulation-the essence of flow injection analysis”, Z. Fang, *Microchem. J.*, 45, 137-142
4. “Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the laboratory”, J. Martínez Calatayud, Taylor & Francis, London, 1996
5. “Flow Injection Analysis”, J. Ruzicka y EH. Hansen, J. Wiley, Chichester, Sussex, U.K., 1981
6. “Flow Injection Analysis”, J. Ruzicka y EH. Hansen, J. Wiley, Chichester, Sussex, U.K., 1988
7. “Flow Injection Atomic Spectroscopy”, Ed. JL. Burguera, M. Dekker, New York, USA, 1989
8. “Flow Injection Analysis. A practical guide”, Ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1989
9. “Flow-injection analysis: a review of its early history”, K.K. Stewart, *Talanta*, 1981, 28 (11), 789-797

10. "Flow-injection analysis: an important new method in analytical chemistry", M. Valcárcel y MD. Luque de Castro, *Quim. Anal.*, 1982, 1 (4), 201-217
11. "Nuevas tendencias y posibilidades en automatización en el área de los análisis farmacéuticos", J. Martínez Calatayud, *Ciencia Farmacéutica*, 1991, 1 (3), 139-149
12. "Flow Injection analysis in the field of pharmaceuticals and related drugs" J. Martínez Calatayud, S. Sagrado Vives y F. Sanmiguel Roche, *Quim. Anal.*, 1990, 9 (1), 1-31
13. "Study of the performance of an optochemical sensor for ammonia", M. Trinkel, W. Trttnek, F. Reininger, R. Benes, P.O'Leary y S.O. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 1996, 320 (2-3), 235-243
14. "High-pressure flow-injection assembly. Indirect determination of glycine by atomic-absorption spectrometry", J. Martínez Calatayud y JV. García Mateo, *Analyst*, 1991, 116 (3), 327-329
15. "Flow-injection analysis with on-line solid phase extraction for the spectrophotometric determination of sulfonated and unsulfonated Quinoline Yellow in cologne", LF. Capitan Valley, MC. Valencia y E. Arana Nicolas, *Fresenius' J. Anal. Chem*, 2000, 367 (7), 672-676
16. "A novel flow-through disk-based solid-phase extraction diffuse reflectance optrode. Application to preconcentration and determination of trace levels of nitrite", M. Miro, W. Frenzel, JM. Estela y V. Cerda, *Analyst*, 2001, 126 (10), 1740-1746

17. "Simultaneous determination of cadmium (II), copper (II) and lead (II) in surface waters by solid-phase extraction and flow-injection analysis with spectrophotometric detection", E. Castillo, J.L. Cortina, J.L. Beltran, M.D. Prat y M. Granados, *Analyst*, 2001, 126 (7), 1149-1153
18. "Determination of chromium (VI) by flow-injection spectrophotometry coupled with online microcolumn preconcentration", WH. Ma, RX .Cai y DH. Chen, *Lab. Rob .Autom.*, 1999, 11 (3), 141-145
19. "Determination of zinc in sea water using flow-injection analysis with fluorimetric detection", JL. Nowicki, KS. Johnson, KH. Coale, VA. Elrod y SH. Lieberman, *Anal. Chem.*, 1994, 66 (17), 2732-2738
20. "Determination of pesticide naptalam, at the ppb level, by FIA with fluorimetric detection and online preconcentration by solid-phase extraction on C18-modified silica", T Galeano Diaz, MI. Acedo-Valenzuela y F. Salinas, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 384 (2), 185-191
21. "Flow-injection ion-exchange preconcentration for the determination of iron (II) with chemiluminescence detection", AA. Alwarthan, KAJ. Habib y A. Townshend, *Fresenius'J. Anal. Chem.*, 1990, 337 (7), 848-851
22. "Determination of sub-nanomolar levels of iron (II) and total dissolved iron in sea water by flow-injection analysis with chemiluminescence detection", VA. Elrod, KS. Johnson y KH. Coale, *Anal. Chem.*, 1991, 63 (9), 893-898
23. "Simple flow system for the rapid pre-concentration and potentiometric determination of fluoride using a micro-column and a wall-jet electrode", Y. Okabayashi, M. Hikawa, T. Nakagawa y M. Chikuma, *Analyst*, 1989, 114 (10), 1267-1270

24. "Improvement of the selectivity of an FIA amperometric biosensor system for glucosa", KB. Male y JHT. Luong, *Biosens. Bioelectron.*, 1993, 8 (5), 239-247
25. "Separation and preconcentration of fluoride at the ng/ml level with a polymer complex of zirconium (IV) followed by potentiometric determination in a flow system", A. Yuchi, K. Matsunaga, T. Niwa, H. Terao y H. Wada, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 388 (1), 201-208
26. "Determination of traces levels of anionic surfactants in river water and waste by a flow-injection analysis system with online preconcentration and potentiometric detection", S. Martínez-Barrachina, J. Alonso, L. Matia, R. Pratts y M. del Valle, *Anal. Chem.*, 1999, 71 (17), 3684-3691
27. "Flow injection system for cadmium preconcentration of poly (octadecyl diitaconate) (PDI-18) and atomic absorption spectrometry detection", Y. Petit de Pena, W. Lopez, M. Burguera, JL. Burguera, Lopez Carrasquero y M. Carrillo, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 438 (1-2), 259-266
28. "Online preconcentration of total mercury in the Baltic Sea", O. Wurl, O. Elsholz y R. Ebinghaus, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 438 (1-2), 245-249
29. "Determination of trace metals in waters and compost by online precipitation coupled to flame atomic-absorption spectrophotometry or ion chromatography", A. Martin Esteban, RM. Garcinuno, S. Angelino, P. Fernandez, y C. Camara, *Talanta*, 1999, 48 (4), 959-966
30. "FIA-FAAS system including on-line solid phase extraction for the determination of palladium, platinum and rhodium in alloys and ores", IA. Kovalev, LV. Bogacheva, GI. Tsysin, AA. Formanovsky y YA. Zolotov, *Talanta*, 2000, 52 (1), 39-50

31. “Off-line and pre-concentration of trace levels of beryllium using complexing agents with atomic-spectrometric and fluorimetric detection”, DB. Do. Nascimento y G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 283 (2), 909-915
32. “Application of high-surface-area zirconium oxide in preconcentration and determination of 18 elements by online flow injection with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”, E. Vassileva, N. Furuta, *Fresenius'. J. Anal. Chem.*, 2001, 370 (1), 52-59
33. “Use of high surface area titanium dioxide for preconcentration and following determination of thorium species by on-line flow inductively coupled plasma atomic-emission spectrometry”, E. Vassileva, *Analisis*, 2000, 28 (9), 878-884
34. “Determination of micro amounts of gold in lead by FIA online separation and preconcentration ET AAS”, YZ. Zheng, *Fenxi. Shiyanshi*, 2000, 19 (4), 22-26
35. “Selective flow-injection analysis of ultra-trace amounts of chromium (VI), preconcentration of it by solvent extraction, and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET AAS)”, SC. Nielsen, S. Sturup, H. Spliid, y EH. Hansen, *Talanta*, 1999, 49 (5), 1027-1044
36. “Coupling sequential injection online preconcentration by means of a renewable microcolumn with ion-exchange beads detection by electrothermal atomic-absorption spectrometry comparing the performance of eluting the loaded beads with transporting them directly into the graphite tube, as demonstrated determination of nickel in environmental and biological samples”, J.H. Wang y EH. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 435 (2), 331-342
37. “Determination of trace metals in sea by online column preconcentration inductively coupled plasma mass spectrometry “, S. Hirata, Y. Ishida, M. Aihara, K. Honda y O. Shikino, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 438 (1-2), 205-214

38. “Determination of silver, tellurium, uranium and gold in waters and biological samples by FI-ICP-MS following online preconcentration”, VL. Dressler, D. Pozebon y AJ. Curtis, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 438 (1-2), 235-244
39. “Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma spectrometry after cloud point extraction”, MAM. Da Silva, VLA. Frescura y AJ. Curtius, *Spectrochim. Acta, Parte B*, 2000, 55B (7), 803-813
40. “Use of activated alumina as a column packing material for adsorption of oxy-anions in flow-injection analysis with ICP-AES detection”, IG. Cook, CW. McLeod y PJ. Worsfold, *Anal. Proc.*, 1986, 23 (1), 5-6
41. “Rapid sequential determination of chromium (III)-chromium (VI) by flow-injection analysis-inductively coupled plasma atomic-emission spectrometry”, AG. Cox, IG. Cook y CW. McLeod, *Analyst*, 1985, 110 (4), 331-333.
42. “Practical approaches to improve the determination of micro amounts of chromium (VI) by spectrophotometric flow-injection analysis with a single-line manifold”, FA. Inon, FJ. Andrade, MB. Tudino y OE. Troccoli, *J. Flow. injection Anal.*, 2000, 17 (2), 174-179
43. “Flow injection online preconcentration with active carbon fibre multi-element determination in water samples using ICP AES”, YJ. Lin, ZB. Gong, ZX. Zhuang, ZW. Deng y XR. Wang, *Fenxi. Kexue. Xuebao*, 1995, 11 (2), 16-20
44. “Pre-concentration and atomic absorption determination of copper traces in waters by online absorption-elution on an activated carbon minicolumn”, RE. Santelli, M. Gallego y M. Valcarcel, *Talanta*, 1994, 41 (5), 817-823

45. "Copper determination by flow injection online sorbent preconcentration coupled with flame atomic-absorption spectrometry using 1,10-phenanthroline", A. Ali, H. Shen, X.Gu, GM. Xu, YX. Ye y XF. Yin, *Lab. Rob. Autom.*, 2000, 12 (2), 97-103
46. "Online coupling of flow-injection microcolumn separation and preconcentration to electrothermal atomic absorption spectrometry for determination of (ultra) trace selenite and selenate in water", XP. Yan, M. Sperling y B. Welz, *Anal. Chem.*, 1999, 71 (19), 4353-4360
47. "FIA-flame AAS determination of iron, nickel and copper in caustic soda", YL. Zhang, *Lihua. Jianyan. Huaxue.Fence*, 1999, 35 (4), 174-175
48. "Determination of trace elements in water samples by inducively coupled plasma-mass spectrometry connected with air flow-and water flow-injection techniques", KH. Lee, M. Oshima, T. Takayanagi y S. Motomizu, *J. Flow. Injection. Anal.*, 1999, 16 (2), 255-264
49. "Preconcentration and speciation of chromium by the determination of total chromium and chromium (III) in natural waters by flame atomic-absorption spectrometry with a chelating ion-exchange flow-system", RM. Cespon Romero, MC. Yebra Biurrun y MP. Bermejo Barrera, *Anal. Chim. Acta*, 1996, 327 (1), 37-45
50. "Determination of cadmium in foodstuffs and plant materials by flow-injection spectrophotometry including ion exchange ", JA. Gomes Neto, H. Bergamin, RP. Sartini y EAG. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 306 (2-3), 343-349
51. "Implementation of ion-exchanger absorptiometric detection in flow analysis system", K. Yoshimura, *Anal. Chem.*, 1987, 59 (24), 2922-2924

52. “Uses of *Saccharomyces Cerevisiae* in flow atomic absorption spectrometry for trace metal pre-concentration”, A. Maquieira, HAM. Elmahadi y R. Puchades, *Anal. Chem.*, 1994, 66 (9), 1462-1467
53. “Speciation and pre-concentration of trace elements with immobilized algae for atomic-absorption spectrophotometric detection”, HAM. Elmahadi y GH. Greenway, *J. Anal. At. Spectro.*, 1994, 9 (4), 547-551
54. “On-line preconcentration system for nickel determination in food samples by flame atomic-absorption spectrometry”, SLC. Ferreira, WNL. dos Santos y VA. Lemos, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 445 (2), 145-151
55. “Continuous-flow method for the determinación of phenols at low levels in water and soil leachates using a solid-phase extraction for simultaneous preconcentration and separation”, ZL. Zhi, A. Ríos y M. Válcárcel, *Analyst*, 1996, 121 (1-6)
56. “Amberlite XAD resin solid- phase extraction coupled on-line to a flow injection approach for the rapid enrichment and determination of phenols in water and waste waters”, Wen-lu. Song, Zheng-liang. Zhi y Lian-sheng. Wang, *Talanta*, 1997, 44, 1423-1433
57. “Online preconcentration system using a packed-bed filter for the determination of lead in tap water by inductively coupled plasma atomic-emission spectrometry with ultrasonic nebulization”, RG. Wuilloud, JA. Salonia, JA. Gasquez, RA. Olsina y LD. Martínez, *Anal. Sci.*, 2001, 17 (3), 457-459
58. “Reducción of mercury (II) by tropical river humic substances (Rio negro)-A possible process of the mercury cycle in Brazil”, JC. Rocha, ES. Junior, LF. Zara, AH. Rosa, A. dos Santos y P. Burba, *Talanta*, 2000, 53 (3), 551-559

59. "On-line complexation/preconcentration system for the determination of lead in wine by inductively coupled plasma atomic-emission spectrometry with ultrasonic nebulization", RG. Wuilloud, AH. Gonzalez, EJ. Marchevsky, RA. Olsina, LD . Martinez, *J. AOAC. International*, 2001, 84 (5), 1555-1560
60. "Speciation and preconcentración of vanadium (V) and vanadium (IV) in water samples by flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry and ultrasonic nebulization", RG. Wuilloud, JC. Wuilloud, RA. Olsina y LD. Martínez, *Analyst*, 2001, 126 (5), 715-719
61. Multiconmutation in flow analysis. <http://www.uv.es/FlowAnalysis/J.Vicente-multiconmutation.htm>
62. "Multiconmutación as a new and powerful analytical tool", M. Catalá Icardo, J. V. García Mateo y J. Martínez Calatayud, *TrACs*, 2002, 21 (3)
63. "Continuous-flow injector for flow-injection analysis", AF. Kapauan, MC. Magno, *Anal. Chem.*, 1986, 58 (2), 509 -510
64. "Development of hardware and software for online sample preparation using sequential-injection analysis", JY. Neira, N. Reyes, JA Nobrega, *Lab. Rob. Autom.*, 2000, 12 (5), 246-252
65. "Determination of volatile elements in biological materials by isotopic dilution by electrothermal (ET) ICP MS after dissolution with tetramethylammonium hydroxide or acid digestion", D. Pozebon, V.L. Dressler y A.J. Curtius, *Talanta*, 2000, 51 (5), 903-911
66. "A field-deployable instrument for the measurement and speciation of arsenic in potable water", H. Huang y PK. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 380 (1), 27-37

67. “Automated flow-injection system for the preconcentration of bismuth and lead from acid solutions of alloys and determination by electrothermal atomic-absorption spectrometry”, MBO. Giacomelli y EM. Ganzarolli, AJ. Curtius, *Spectrochim. Acta*, Part B, 2000, 55 (5), 525-533
68. “Automatic multicommutation flow system for wide range spectrophotometric calcium determination”, FRP. Rocha, PB. Martelli, RM. Frizzarin y BF. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 366 (1-3), 45-53
69. “Multipurpose flow-injection system.I. Programmable dilutions and standard additions for plant digest analysis by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry”, B. Freire dos Reis, M. Fernanda Gine, F. Jose Krug y H. Bergamin-Filho, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, 7 (6), 865-868
70. “On-line preconcentration employing a tannic resin for copper determination in plant material and food stuff by atomic absorption sepectrometry”, C.E.S. Miranda, S. Olivares, B.F. Reis y F.M. Luzardo, *J. Brazilian Chem. Soc.*, 2000, 11, 44
71. “On-line separation and preconcentration of cadmium, lead and nickel in a fullerene (C60) minicolumn coupled to flow-injection tungsten coil atomic absorption spectrometry”, MM. Silva, MAZ. Aruda, FJ. Keug, PV. Oliveira, ZF. Queiroz, M. Gallego y M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 368 (3), 255-263
72. “Monosegmented flow system exploiting multicommutation applied to spectrophotometric determination of manganese in soybean digests”, M. Smiderle, BF. Reis y FRP. Rocha, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 386 (1-2), 129-135

73. "Selective chlorine determination by gas diffusion in a tandem flow assembly and spectrophotometric detection with o-dianisidine", M. Catalá Icardo, JV. García Mateo y J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 443 (1), 153-163
74. "Automation of flow injection gas diffusion-ion chromatography for the nanomolar determination of methyamines and ammonia in sea water and atmospheric samples", SW. Gibb, JW. Wood, R. Fauzi y C. Mantoura, *J. Autom. Chem.*, 1995, 17 (6), 205-212
75. "Multicommutation in flow analysis. Part 6. Binary sampling for wide concentration range turbidimetric determination of sulfate in plants digests", J.A. Vieira, BF. Reis, EAM. Kronka, APS. Paim y MF. Gine, *Anal Chim. Acta*, 1998, 366 (1-3), 251-255
76. "A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters", FRP. Rocha y BF. Reis, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 409 (1-2), 227-235
77. "Automated flow-injection system for extending the linear range", LF. Gouveia, JLF. Costa-Lima y JAG. Morais, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 366 (1-3), 271-279
78. "Multicommutation in flow analysis. Part 3 Spectrophotometric determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach", AN Araujo, JLF. Costa-Lima, BF Reis y EAG. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 310 (3), 447-452
79. "Determination of phenols in natural waters with a flow-analysis method and chemiluminescence detection", J. Michalowski, P. Halaburda y A. Kojlo, *Anal. Lett.*, 2000, 33 (7), 1373-1386

80. "Automatic multicommutated flow system for ethanol determination in alcoholic beverages by spectrophotometry", ALD. Comitre y BF. Reis, *Lab. Rob. Autom.*, 2000, 12 (1), 31-36
81. "Multicommutated flow system with online compensation of the schlieren effect applied to the spectrophotometric determination of pindolol", RAS. Lapa, JLFC. Lima, BF. Reis, JLM. Santos y EAG. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 366 (1-3), 209-215
82. "Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence", K. Robards y PJ. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, 1992, 266 (2), 147-173
83. "Métodos quimioluminiscentes de análisis", JL. Bernal y V. Cerdá, *Química Analítica*, 1985, Vol 4, núm. 3, 205-235
84. "Bioluminescence", EN. Harvey, Academic Press, New York, 1952
85. "Methods in Enzymology", Vol.57, Ed. MA. DeLuca, Academic Press, New York, 1978
86. "Bioluminescence and Chemiluminescence" Eds. MA. DeLuca y WD. McElroy, Academic Press, New York, 1981
87. "Methods in Enzymology" Vol. 133, Eds. MA. DeLuca y WD. McElroy, Academic Press, Orlando, FL, 1986
88. "Descubrimientos y conquistas de la química", Mary Elvire Weeks, Ed. Manuel Marín y Cía., Barcelona, 1954
89. "Molecular Luminescence Spectroscopy", Part 3, Chap. 1, Vol.77, Ed. SG. Schulman, John Wiley & Sons, 1993

90. "Noise and background in peroxyoxalate chemiluminescence detection for liquid chromatography", R. Weinberg, CA. Mannan, M. Cerchio y MI. Grayeski, *J. Chromtogr.*, 1984, 288 (2), 445-450
91. "Quenched peroxyoxalate chemiluminescence as a new detection principle in flow-injection analysis and liquid Chromatography", P. Van Zoonen, DA. Kamminga, C. Gooijer, NH. Velhorst, RW. Frei y G. Gubitz, *Anal. Chem.*, 1986, 58 (6), 1245-1248
92. "Peroxyoxalate chemiluminescence detection of polycyclic aromatic amines in liquid chromatography", KW. Sigvardsoin, JM. Kennish y JW. Birks, *Anal. Chem.*, 1984, 56(7), 1096-1102
93. "Heterocyclic-compounds as catalysts in the peroxyoxalate chemiluminescence reaction of bis (2,4,6-trichlorophenyl) oxalate", T. Jonsson, M. Emteborg y K. Irgum, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 361 (3), 205-215
94. "Determination of morphine by flow injection analysis with chemiluminescence detection", RW. Abbott, A. Townshend y R. Gill, *Analyst*, 1986, 111 (6), 635-640
95. "Chemiluminescent and bioluminescent methods in analytical chemistry. A review", LJ. Kticka y GHG. Thorpe, *Analyst*, 1983, 108 (1292), 1274-1296
96. "Chemiluminescence: Principles and Applications in biology and Medicine", AK. Campbell, Horwood, Chichester, 1988
97. "Recent analytical developments using chemiluminescence in solution", D.B. Paul, *Talanta*, 1978, 25, 377-382

98. "Immobilized bioluminescent reagents in continuous-flow system", P.J. Worsfold y A. Nabi, *Trends. Anal. Chem.*, 1986, 5 (7), 183-185
99. "Electrogenerated chemiluminescent determination of oxalate", I. Rubinstein, CR. Martin y AJ. Bard, *Anal. Chem.*, 1983, 55 (9), 1580-1582
100. "Flow-injection analysis of cobalt (II) utilizing enhanced lophine chemiluminescence with hydroxylammonium chloride", K. Nakashima, H. Yamasaki, R. Shimoda, N. Kuroda, S. Akiyama y WRG. Baeyens, *Biomed. Chrom.*, 1997, 11 (2), 63-64
101. "Evaluation of lophine derivatives as chemiluminogens by a flow-injection method", K. Nakashima, H. Yamasaki, N. Kuroda y S. Akiyama, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 303 (1), 103-107
102. "Effect of oxovanadium (IV) acetylacetonate on the chemiluminescence reaction of luminol in reversed micelles", T. Fujiwara, T. Kyaw, Y. Okamoto y T. Kumamaru, *Anal. Sci.*, 1997, 13 (s), 59-62
103. "Carbon dioxide-enhanced luminol chemiluminescence in absence of added oxidant", ZH. Lan y HA. Mottola, *Analyst*, 1996, 121 (2), 211-218
104. "Chemiluminescence flow injection analysis of reducing agents based on the luminol reaction", H. Kubo y A. Torriba, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 353 (2-3), 345-349
105. "Chemiluminescence detection of sodium nitroprusside using flow injection analysis", AA. Alwarthan, *Talanta*, 1994, 41 (10), 1683-1688

106. "Chemiluminescence determination of sodium nitroprusside by flow-injection analysis", ZL. Wang, JZ. Li, BX. Li, LF. Wang y JG. Zhang, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 1997, 17 (2), 75-77
107. "Determination of ascorbic acid by flow injection with chemiluminescence detection", AA. Alwarthan, *Analyst*, 1993, 118 (6), 639-642
108. "Flow-injection chemiluminometric determination of citrate based on a photochemical reaction", T. Pérez, C. Martínez Lozano, V. Tomás y O. Val, *Analyst*, 1995, 120 (2), 471-475
109. "Chemiluminescence flow sensor for the determination of vitamin B-12", W. Qin, ZJ. Zhang y HJ. Liu, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 357 (1-2), 127-132
110. "Chemiluminescence determination of vitamin B-12 (cyanocobalamin) by flow-injection method", YK. Zhou, H. Li, Y. Liu y GY. Liang, *Anal. Chim. Acta*, 1991, 243 (1), 127-130
111. "Chemiluminescent determination of pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical samples using flow injection", AA. Alwarthan y FA. Aly, *Talanta*, 1998, 45 (6), 1131-1138
112. "FIA titrations of sulfide, cysteine and thiol-containing drugs with chemiluminescence detection", I. López García, P. Viñas y JA. Martínez Gil, *Fresenius'J. Anal. Chem*, 1993, 345 (1), 723-726
113. "Determination of trace ascorbic acid by the flow-injection chemiluminescence method", AB. Shen, BR. Xu, MJ. Ji y JM. Wu, *Fenxi Kexue Xuebao*, 1997, 13 (4), 347, (CA: 128: 53325)

114. "Flow-injection chemiluminescence analysis for determination of traces ascorbic acid", ML. Feng, JR. Lu, XY. Zhang, ZL. XU y ZJ. Zhang, *Fenxi Huaxue*, 1996, 24 (11), 1364
115. "Determination of trace ascorbic acid by flow-injection chemiluminescence suppression method", WP. Yang, BL. Li, ZJ. Zhang y GH. Tian, *Fenxi Huaxue*, 1996, 24 (5), 579-582
116. "Chemiluminescence flow sensor for the determination of ascorbic acid with immobilized reagents", ZJ. Zhang y W. Qin, *Talanta*, 1996, 43 (1), 119-124
117. "Highly sensitive chemiluminescence flow sensor for ascorbic acid", W. Qin, ZJ. Zhang y HH. Chen, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1997, 358 (7-8), 861-863
118. "Flow-injection/chemiluminescence sensor for the determination of ascorbic acid", FC. Wang, W. Qin y ZJ. Zhang, *Fenxi Huaxue*, 1997, 25 (11), 1255-1258, (CA:128:60818)
119. "Inhibition of the system luminol-hydrogen peroxide-hexacyanoferrate (III) chemiluminescence by the manganese (II). Indirect determination of isoniazid in a pharmaceutical formulation", A. Gregorio Alapont, E. Aurechia Giménez, L. Lahuerta Zamora y J. Martínez Calatayud, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1998, 13 (3), 131-137
120. "Coupling of membrane-immobilized enzyme reaction and heteropoly acid luminol chemiluminescence reaction for the determination of adenosine-5'-triphosphate", T. Fujiwara, K. Kurahashi y T. Kumamaru, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 349 (1-3), 159-164
121. "Flow injection chemiluminescence analysis of alkaloids", J. Li y J. Lu, *Ziran Kexueban*, 1998, 26 (1), 60-62, (CA:129:89650)

122. "Chemiluminescence yields and detection limits of some isoluminol derivatives in various oxidation system", HR. Schroeder y FM. Yeager, *Anal. Chem.*, 1978, 50 (8), 1114-1120
123. "Chemiluminescent determination of clinically important organic reductants", RL. Veazey y TA. Nieman, *Anal. Chem.*, 1979, 51 (13), 2092-2095
124. "Use of surfactants to improve analytical performance of lucigenin chemiluminescence", LL. Klopff y TA. Nieman, *Anal. Chem.*, 1984, 56 (8), 1539-1542
125. "Flow-injection determination of ascorbic acid by iron (III)-catalysed lucigenin chemiluminescence in a mycellar system", T. Hasebe y T. Kawashima., *Anal. Sci.*, 1996, 12 (5), 773-777
126. "Micellar effect upon the lucigenin chemiluminescent reaction system with isoprenaline", AA. Alwarthan, HA. Al-Lohedan y ZA. Issa, *Anal. Lett.*, 1996, 29 (9), 1589-1602
127. "Flow-injection determination of kanamycin by inhibition of the lucigenin-hydrogen peroxide-cobalt (II) system", AA. Alwarthan, SA. Al-Tamrah y AA. Akel, *Anal. Chim. Acta*, 1994, 292 (1), 201-208
128. "Chemiluminescence of acridines", O. Rubio Pons, JV. García Mateo y J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 145, 1-8
129. "Determination of nitrite by inhibition of the chemiluminescence of acriflavine in a FIA assembly", M. Catalá Icardo, JV. García Mateo y J. Martínez Calatayud, *Analyst*, 2001, 126, 1423-1427

130. "Chemiluminescence and photochemical reaction detection in chromatography", TA. Nieman, Chap.4, in JW. Birks (Ed), VCH, New York, 1989
131. "Aryl oxalate chemiluminescence detection for high-performance liquid chromatography", K. Imai y R. Weinberger, *Trends in Anal. Chem.*, 1985, 4 (7), 170-175
132. "Effects of reversed micelles on peroxyoxalate chemiluminescence and analytical implications for determination of fluorophors", NY. Dan y ML. Grayeski, *Langmuir*, 1994, 10 (2), 447-453
133. "Flow-injection determination of hydrogen peroxide by means of a solid-state peroxyoxalate chemiluminescence reactor", P. Van Zoonen, DA. Kamminga, C. Gooijer, NH. Velthorst y R.W. Frei, *Anal. Chim. Acta*, 1985, 167, 249-256
134. "Synthesis and evaluation of aryl oxalates as peroxyoxalate chemiluminescence reagents", K. Nakashima, K. Maki, S. Akiyama, W. Wang, Y. Tsukamoto y K Imai, *Analyst*, 1989, 114 (11), 1413-1416
135. "Evaluation of aryl oxalates for chemiluminescence detection in high-performance liquid chromatography", K. Honda, K. Miyaguchi y K. Imai, *Anal. Chim. Acta*, 1985, 177, 111-120
136. "Analytical implications of luminescence parameters in liquid chromatography. Applications to aminocoumarins in the peroxyoxalate chemiluminescent reaction", M. Tod, R. Farinotti, G. Mahuzier e I. Gaury, *Anal. Chim. Acta*, 1989, 217 (1), 11-21

137. "Influence of metal ions on peroxyoxalate chemiluminescence", OM. Steijger, PHM. Rodenburg, H. Lingeman, UATh. Brinkman y JJM. Holthuis, *Anal. Chim. Acta*, 1992, 266 (2), 233-241
138. "Chemiluminescence detection of porphyrins with the peroxyoxalate reaction by flow-injection analysis", M. Lin y CW. Huie, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 339 (1-2), 131-138
139. "Bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate chemiluminescence reaction and its applications in analytical chemistry", JQ. Zou y XH. Wang, *Daxue Xuebao*, 1997, 19 (4), 107-116, (C.A.: 129:197321)
140. "Effect of organic solvent on tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (III) chemiluminescent reactions in flowing streams", WY. Lee y TA. Nieman, *Anal. Chim. Acta*, 1996, 334 (1-2), 183-19
141. "Chemiluminescence reaction of thiazide with tris-(2,2'-bipyridyl) ruthenium (III)", JA. Holeman y ND. Danielson, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 277 (1), 55-60
142. "Encyclopedia of Analytical Science" Vol 1, Pp. 616-617, Academic Press Inc., 1995
143. "Tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) electrogenerated chemiluminescence in analytical science (review)", WY. Lee, *Mikrochimica Acta*, 1997, 127 (1-2), 19-39
144. "Clinical and biochemical applications of luciferases and luciferins", LJ. Kricka, *Anal. Biochem.*, 1988, 175 (1), 14-21

145. "Luminescent techniques applied to bioanalysis", S. Girotti, EN. Ferri, S. Ghini, F. Fini, M. Musiani, G. Carrea, A. Roda y P. Rauch, *Chemicke Listy*, 1997, 91 (7), 477-482
146. "Highly sensitive flow injection analysis of NAD(P)H and their applications to determination of substrates for dehydrogenases"; N. Kiba, *J. Flow Injection Anal.*, 1997, 14 (2), 123-129
147. "Instrumentally simple flow detector for the determination of traces of electroluminescent compounds in aqueous solution", K. Haapakka, J. Kankare y K. Lipiäinen, *Anal. Chim. Acta*, 1990, 233 (2), 199-206
148. "Photoinitiation of peroxyoxalate chemiluminescence: application to flow injection analysis of chemilumophores", RE. Milofsky y JW. Birks, *Anal. Chem.*, 1990, 62 (10), 1050-1055
149. "Development of a chemiluminescent system using photocatalysis of ZnO thin film", Y. Makita, K. Uchiyama y T. Hoba, *Bunseki Kagaku*, 1996, 45 (8), 745-751
150. "Study on chemiluminometric method for determination of tetracycline in pharmaceuticals", Z. Li y ZB. Wang, *Xiamen Daxue Xuebao*, 1997, 36 (5), 804-807, (CA: 128:145419)
151. "Permanganate-based chemiluminescence analysis of cefadroxil monohydrate in pharmaceutical samples and biological fluids using flow-injection", FA. Aly, NA. Alarfaffj y AA. Alwarthan, *Talanta*, 1998, 47 (2), 471-478

152. "Chemiluminescence determination of tiopronin by flow-injection analysis based on cerium (IV) oxidation sensitized by quinine", YN. Zhao, WRG. Baeyens, XR. Zhang, AC. Calokerinos, K. Nakashima y G. Van der Waken, *Analyst*, 1997, 122 (2), 103-106
153. "Chemiluminescence determination of penicillamine via flow injection applying a quinine-cerium (IV) system", ZD. Zhang, WRG. Baeyens, XR. Zhang y G. Van der Weken, *Analyst*, 1996, 121 (11), 1569-1572
154. "Chemiluminescence flow-injection analysis of captopril applying a sensitized rhodamine 6G method", ZD. Zhang, WRG. Baeyens, XR. Zhang y G. Van der Weken, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, 14 (8-10), 939-945
155. "Cerium (IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide", J. Ouyang, WRG. Baeyens, J. Delanghe, G. Van der Waken y AC. Calokerinos, *Talanta*, 1998, 46 (5), 961-968
156. "Flow-injection-chemiluminometric determination of folic acid in pharmaceutical formulations", AA. Alwarthan, *Anal. Sci.*, 1994, 10 (6), 919-922
157. "Flow-injection-chemiluminometric determination of some phenothiazides in dosage forms and biological fluids", FA. Aly, NA. Alarfaj y AA. Alwarthan, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 358 (3), 255-262
158. "Determination of tiopronin in pharmaceuticals using a chemiluminescent flow-injection method", T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, WRG. Baeyens, A. Sanz, MT. San Miguel, *J. Pharm. Biom. Anal.*, 1998, 17 (4-5), 823-828

159. "Chemiluminescence determination of tetracyclines based of their reaction with hydrogen peroxide catalysed by the copper ion", XR. Zhang, WRG. Baeyens, A. Van den Borre, G. Van der Waken, AC. Calokerinos y SG. Schulman, *Analyst*, 1995, 120 (2), 463-466
160. "Manganese (III)-4,4',4'',4'''-porphinetetrayltetrabenzenesulfonic acid immobilized on an anion-exchange resin as an indicator phase for chemiluminescence sensing of adrenaline", F. Yoshimura, T. Suzuki, M. Yamada y T. Hobo, *Bunseki Kagaku*, 1992, 41 (4), 191-196
161. "Dimethyldioctadecylammonium chloride bilayer membrane vesicle-enhanced and manganese (II)-catalysed chemiluminescence for determination of adrenaline by a flow-injection method", K. Matsue, M. Yamada, T. Suzuki y T. Hobo, *Anal. Lett.*, 1989, 22 (11-12), 2445-2461
162. "Continuous-flow chemiluminometric determination of dihydralazine, rifampicin and rifamycin SV by oxidation with N-bromosuccinimide", SA. Halvatzis, MM. Timotheou Potamia y TP. Hadjiioannou, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 272 (2), 251-263
163. "Continuous-flow chemiluminometric determination of tetracyclines in pharmaceutical preparations and honey by oxidation with N-bromosuccinimide", SA. Halvatzis, MM. Timotheou Potamia y AC. Calokerinos, *Analyst*, 1993, 118 (6), 633-637
164. "Continuous-flow chemiluminometric determination of isoniazid by oxidation with N-bromosuccinimide", SA. Halvatzis, MM. Timotheou Potamia y AC. Calokerinos, *Analyst*, 1990, 115 (9), 1229-1234

165. "Flow-injection-chemiluminometric determination of epinephrine (adrenaline), norepinephrine (noradrenaline), dopamine and L-dopa (levodopa)", NT. Deftereos, AC. Calokerinos y CE. Efstathiou, *Analyst*, 1993, 118 (6), 627-632
166. "Direct chemiluminescence determination of ascorbic acid using flow-injection analysis", IB. Agater y RA. Jewsbury, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 356 (2-3), 289-294
167. "Flow-injection chemiluminescence determination of medazepam", SM. Sultan, AM. Almuaid y A. Townshend, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1998, 362 (1), 167-169
168. "Study on chemiluminescence system of potassium permanganate/ levodopa in assay of levodopa", ML. Yang, LQ. Li, ML. Feng y JR. Lu, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 1998, 18 (1), 41-45, (CA: 129:133275)
169. "Determination of tetrahydropalmatine in rotundine by flow-injection analysis with chemiluminescence detection", LQ. Li, ML. Yang, ML. Feng y JR. Lu, *Fenxi Huaxue*, 1997, 25 (11), 1321-1323
170. "Flow-injection determination of prednisone acetate", YD. Liang, JZ. Li, ZJ. Zhang y XQ. Zhang, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 1998, 18 (3), 168-170 (CA: 129:180212)
171. "Flow-injection chemiluminescence determination of ciprofloxacin hydrochloride", YD. Liang, JZ. Li y ZJ. Zhang, *Fenxi Huaxue*, 1997, 25 (11), 1307-1310
172. "A sensitive chemiluminescence method for cinchona alkaloids", ML. Feng, GF. Zhang y ZJ. Zhang, *Anal. Lett.*, 1998, 31 (14), 2537-2548

173. "Continuous-flow chemiluminescence determination of sulphite and sulphur dioxide", II. Koukli, EG. Srantonis y AC. Calokerinos, *Analyst*, 1988, 113 (4), 603-608
174. "Determination of reserpine by flow-injection chemiluminescence analysis", LQ. Li, ML. Yang, ML. Feng y JR. Lu, *Fenxi Huaxue*, 1998, 26 (3), 307-309, (CA: 128:286458)
175. "Stopped-flow chemiluminescence spectrometry to improve the determination of penicillins based on the luminol-iodine reaction", S. Ventura, M. Silva y D. Pérez Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 1992, 266 (2), 301-307
176. "Chemiluminescence and bioluminescence analysis: fundamentals and biomedical applications", WR. Seitz, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1981, 13, 1-58
177. "Principles, applications and trends of flow injection analysis for monitoring chemiluminescent reactions", JL. Burguera, M. Burguera y A. Townshend, *R. Roum. Chim.*, 1982, 27 (7), 879-883
178. "Towards some ultimates in luminogenic analytical methods", DH. Leaback, *Anal. Chim. Acta*, 1989, 227 (1), 1-9
179. "Flow-injection determination of sugars with immobilized enzyme reactors and chemiluminescence detection", CA. Swindlehurst y TA. Nieman, *Anal. Chim. Acta*, 205 (1-2), 195-205
180. "Continuous-flow chemiluminescence detection comprising a rotating reactor", ZH. Lan y HA. Mottola, *Anal. Chim. Acta*, 1994, 293 (1-2), 139-146

181. "Recent developments in luminescence detectors for continuous-flow systems, including HPLC", RW. Frei y JW. Birks, *Eur. Spectrosc. News*, 1984, (57), 15-20
182. "Native peroxyoxalate chemiluminescence from the reaction of bis-(2,4-dinitrophenyl) oxalate and hydrogen peroxide perturbed by non-fluorophores", A.C. Capomacchia, RN. Jennings, SM. Hemingway, P. D'Souza, W. Prapaitrakul and A. Gingle, *Anal. Chim. Acta*, 1987, 196, 305-310
183. "Solution chemiluminescence-some recent analytical developments", A. Townshend, *Analyst*, 1990, 115 (5), 495-500
184. "Flow-injection chemiluminescence determination of imipramine and chlorpromazine", JL. López Paz y A. Townshend, *Anal. Commun.*, 1996, 33 (1), 31-33
185. "Chemiluminescence determination of codeine by permanganate oxidation", TJ. Christie, RH. Hanway, DA. Paulls y A. Townshend, *Anal. Proc.*, 1995, 32 (3), 91-93
186. "Determination of morphine in process streams using flow-injection analysis with chemiluminescence detection", NW. Barnet, DG. Rolfe, TA. Browser y TW. Paton, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 282 (3), 551-557
187. "Chemiluminescence detection of the benzodiazepine loprazolam", ARJ. Andrews y A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 1989, 227 (1), 65-71
188. "Chemiluminescence determination of buprenorphine hydrochloride by flow-injection analysis", AA. Alwarthan y A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 1986, 185, 329-333

189. "Flow-injection chemiluminescence determination of tetracyclines", Z. Li, M. Feng, J. Lu, Z. Gong y H. Jiang, *Anal. Lett.*, 1997, 30 (4), 797-807
190. "Study of the chemiluminescence system of potassium permanganate/sodium dithionite/ riboflavine", LQ. Li, ML. Yang, ML. Feng y JR. Lu, *Fenxi Shiyanshi*, 1998, 17 (3), 5-8, (CA: 129:127235)
191. "Determination of vitamin B6 by a flow-injection chemiluminescence method", LQ. Li, ML. Yang, ML. Feng y JR. Lu, *Fenxi Shiyanshi*, 1997, 16 (5), 33-35, (CA: 128:196724)
192. "Flow-injection chemiluminometric analysis of some steroids by their sensitizing effect on the bromate-sulphite reaction", AB. Syropoulos, EG. Sarantonis y AC. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, 1990, 239 (2), 195-202
193. "Continuous-flow chemiluminometric determination of amiloride and streptomycin by oxidation with N-bromosuccinimide", SA. Halvatzis, AM. Mihalatos, LP. Palilis y AC. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, 1994, 290 (1), 172-178
194. "Flow-injection chemiluminescence determination of pyrogallol", A. Safavi y MR. Baezzat, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 368 (1-2), 113-116
195. "Determination of tetracycline by flow injection with chemiluminescence detection", AA. Alwarthan y A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 1988, 205 (1-2), 261-265
196. "Determination of thiamine by continuous-flow chemiluminescence measurement", N. Grekas y AC. Calokerinos, *Talanta*, 1990, 37 (11), 1043-1048

197. "Continuous-flow chemiluminometric determination of some tetracyclines", AB. Syropoulos y AC. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, 1991, 255 (2), 403-411
198. "Chemiluminescence determination of captopril based on a rhodamine B sensitized cerium (IV) method", XR. Zhang, WRG. Baeyens, G. Van der Waken, AC. Calokerinos y K. Nakashima, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 303 (1), 121-125
199. "Flow-injection chemiluminescence method for the determination of hydrocortisone and progesterone", HN. Li y YX. Ci, *Applied Spectroscopy*, 1997, 51 (10), 1484-1487
200. "Continuous-flow chemiluminescence determination of acetaminophen (paracetamol) by reduction of cerium (IV)", II. Koukli, AC. Calokerinos y TP. Hadjiioannou, *Analyst*, 1989, 114 (6), 711-714
201. "Flow-injection chemiluminometric determination of sodium cyclamate", IM. Psarellis, EG. Sarantonis y AC. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 272 (2), 265-270
202. "Continuous-flow chemiluminescence determination of some corticosteroids", II. Koukli y AC. Calokerinos, *Analyst*, 1990, 115 (12), 1553-1557
203. "Flow-injection analysis study of the chemiluminescent behaviour of proflavine and acriflavine", OR. Pons, D. Martínez Gregorio, J.V. García Mateo y J. Martínez Calatayud. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 438 (1-2), 149-156
204. "Flow-injection chemiluminometric determination of steroids", NT. Deftereos y AC. Calokerinos, *Anal. Chim. Acta*, 1994, 290 (1), 190-200

205. "Chemiluminescence method for the determination of chlortetracycline", Z. Li y ZB. Wang, *Fenxi Huaxue*, 1998, 26 (5), 556-560
206. "Chemiluminescence sensor with manganese (III)-tetrakis (4-sulfonatophenyl)-porphyrin immobilized on dioctadecyldimethylammonium chloride bilayer membranes incorporated into PVC film", A. Kuniyoshi, K. Hatta, T. Suzuki, A. Masuda y M. Yamada, *Anal. Lett.*, 1996, 29 (5), 673-685
207. "Flow-injection chemiluminescence determination of Persatin", F. Nie, LD. Zhang, ML. Feng y JR. Lu, *Fenxi Huaxue*, 1997, 25 (8), 879-882
208. "Determination of tyrosine through a FIA-chemiluminescence procedure", MC. Sanfeliu, L. Lahuerta Zamora y J. Martínez Calatayud, *Talanta*, en prensa
209. "Direct Flow injection chemiluminescence determination of salicylamine", Y. Fuster Mestre, L. Lahuerta Zamora y J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 394, 159-163
210. "FIA-direct chemiluminescence (CL) determination of phenylephrine hydrochloride", Y. Fuster Mestre, L. Lahuerta Zamora y J. Martínez Calatayud, *J. AOAC Int.*, 2001, 84 (1), 13-18
211. "Oxidative chemiluminescence emission from trimipramine optimized by flow-injection", L. Wang, WRG. Baeyens, G. Van der Weken, AM. García Campana, XR. Zhang y E. Smet, *Luminiscence*, 2000, 15 (2), 128-129
212. "Determination of ranitidine and salbutamol by flow-injection analysis with chemiluminescence detection", NW. Barnett, BJ. Hindson y SW. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 384 (2), 151-158

213. "Flow injection analysis-direct chemiluminescence determination of ergonovine maleate enhanced by hexadecilpiridinium chloride", Y. Fuster Mestre, B. Fernández Band, L. Lahuerta Zamora y J. Martínez Calatayud, *Analyst*, 1999 , 124, 413-416
214. "Cerium (IV)-based chemiluminescence analysis of analgin", YM. Huang, C. Zhang, XR. Zhang y ZJ. Zhang, *Anal. Lett.*, 1999, 32 (5), 933-943
215. "Flow-injection chemiluminiscence determination of amidopyrine in antogding injection solutions", YH. He, F. Nie y JR. Lu, *Fenxi. Huaxue*, 2001, 29 (3), 296-298
216. "Flow-injection chemiluminiscence method for the determination of aminopyrine in tablets", LQ. Li, YM. Zhou, ML. Feng y JR. Lu, *Fenxi Shiyanshi*, 2001 20 (3), 28-30
217. "Determination of lincomycin hydrochloride by flow-injection chemiluminescence analysis", ZY. Wang, YH. He y F.Nie, *Fenxi Shiyanshi*, 2000 19 (5), 21-23
218. "Determination of dipyridamole by flow-injection analysis with chemiluminescence detection", ML. Yang, LQ. Li, ML. Feng, JR. Lu y ZJ. Zhang, *Fenxi Huaxue*, 2000, 28 (2), 161-163
219. "Chemiluminescence method for the assay of perphenazine in drug formulation using permanganate in sulfuric acid withflow injection technique and a chemometrical optimization approach", SM. Sultan, AMS. Abdennabi y AM. Almuaided, *Talanta*, 1999, 49 (5), 1051-1057

220. "Flow injection with chemiluminescence detection for the determination of iproniazid", MC. Sanfeliu Alonso, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 437 (2), 225-231
221. "A new flow-injection chemiluminescence system for the determination of reserpine", QH. Wei, HS. Zhuang, QE. Wang y GN. Chen, *Fenxi. Kexue. Xuebao*, 2001, 17 (6), 501-504
222. "Determination of the flavor enhancer maltol through a FIA-direct chemiluminescence procedure", MC. Sanfeliu Alonso, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 157-163
223. "Chemiluminescence determination of ascorbic acid with the copper (II)-luminol system", ML. Feng, JR. Lu, ZJ. Zhang, S. Li y YL. Deng, *Fenxi Huaxue*, 1995, 23 (1), 70-72
224. "Flow-injection analysis of tannic acid with inhibited chemiluminescent detection", H. Cui, Q. Li, R. Meng, HZ. Zhao y CX. He, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 362 (2-3), 151-155
225. "Determination of promethazine by its inhibition of the chemiluminescence of the luminol-hydrogen peroxide-chromium (III) system", AA. Alwarthan, SA. Al-Tamrah y AA. Akel, *Anal. Chim. Acta*, 1993, 282 (1), 169-174
226. "Determination of isoniazid by a flow-injection analysis chemiluminescence method", F. Zhao, YY. Wu, Z. Geng y HX. Wang, *Fenxi Huaxue*, 1997, 25 (8), 927-929
227. "Studies on flow-injection chemiluminescent assays of morphan alkaloids", JG. Li y JR. Lu, *Fenxi Shiyanshi*, 1997, 16 (3), 41-44, (CA: 128:196722)

228. "Flow-injection chemiluminescence determination of etamsylate with electrogenerated hypochlorite", CX. Zhang, JC. Huang, ML. Feng y ZJ. Zhang, *Anal. Lett.*, 1998, 31 (11), 1917-1928
229. "Flow-injection chemiluminescence determination of catecholamines with electrogenerated hypochlorite", CX. Zhang, JC. Huang, ZJ. Zhang y MS. Aizawa, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 374 (1), 105-110
230. "Flow-injection chemiluminescence assays of catecholamines", JG. Li y JR. Lu, *Fenxi Huaxue*, 1997, 25 (3), 314-317
231. "Photokinetic determination of rivoflavin and rivoflavin 5'-phosphate using flow-injection analysis and chemiluminescence detection", T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, A. Sanz y V. Tomas, *Analyst*, 1994, 119 (8), 1825-1828
232. "Chemiluminescence determination on a luminol reaction of beta-lactam antibiotics by FIA", H. Kubo y M. Saitoh, *Anal. Sci.*, 1999, 15 (9), 919-921
233. "Solvent extraction coupled on-line to a reversed micellar mediated chemiluminescence detection system for trace-level determination of atropine", T. Fujiwara, IU. Mohammadzai, K. Murayama y T.Kumamaru, *Anal. Chem.*, 2000, 72 (7), 1715-1719
234. "Chemiluminescence flow biosensor for determination of total D-amino-acid in serum with immobilized reagents", BX. Li y ZJ. Zhang, *Sens. Actuators B.*, 2000, B69 (1-2), 70-74
235. "Flow-injection system with chemiluminometric detection for enzymatic determination of ascorbic acid", AF. Danet, M. Badea y HY. Aboul-Enein, *Luminescence*, 2000, 15(5), 305-309

236. "Determination of thiol-containing drugs by chemiluminescence-flow-injection analysis", P. Viñas, I. López García y JA. Martínez Gil, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, 11 (1), 15-20
237. "Flow-injection chemiluminescent determination of phenotiazides in pharmaceutical preparations", T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, A. Sanz y MTS. Miguel, *Lab. Autom. Inf. Manage.*, 1999, 34 (2), 149-158
238. "New electrogenerated chemiluminescence method for the determination of persatin with flow-injection analysis", XW. Zheng y ZJ. Zhang, *Fenxi Huaxue*, 1999, 27 (2), 145-148
239. "Flow-injection electrogenerated chemiluminescence determination of isoniazid using luminol", XW. Zheng, ZH. Guo y ZJ. Zhang, *Anal. Sci.*, 2001 17 (9), 1095-1099
240. "Chemiluminescence of beta-lactam antibiotics based on the luminol reaction", H. Kubo, M. Saitoh, S. Murase, T. Inomato, Y. Yoshimura y H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 389 (1-3), 89-94
241. "Chemiluminescence flow sensor for folic acid immobilized reagents", ZH. Song, y X Zhou, *Spectrochim. Acta*, Part A, 2001 57 (A) (13), 2567-2574
242. "Flow -injection inhibitory chemiluminescence determination of isoniazid" ZH. Song y JH. Lu, *Guangpuxue. Yu. Guangpu. Fenxi*, 2001, 21 (4), 447-449
243. "Resorcinol chemosensor based on detection of chemiluminescence with immobilized reagents", ZH. Song, L. Wang, *Microchemical. Journal*, 2001, 68 (1), 47-52

244. "Chemiluminescence detection of paracetamol by a luminol-permanganate based reaction", D. Easwaramoorthy, YC. Yu y HJ. Huang. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 439 (1), 95-100
245. "A sensitive photoinduced chemiluminescence method for the determination of riboflavine with flow injection analysis ", GF. Zhang y HY. Chen, *Anal. Lett.*, 2000, 33 (15), 3285-3302
246. "Indirect determination of paracetamol in pharmaceutical formulations of the luminol/hydrogen peroxide/hexacyanoferrate (III) chemiluminescence system", A. Gregorio Alapont, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Ana.,l* 1999, 21 (2), 311-317
247. "Determination of gallium by flow-injection coupled with chemiluminescence reaction", WH. Li y ZJ. Zhang, *Fenxi. Huaxue*, 2001, 29 (12), 1447-1449
248. "Flow-injection chemiluminescence sensor for the determination of isoniazid", SC. Zhang y H. Li, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 444 (2), 287-294
249. "Chemiluminescence sensor for isoniazid with controlled-reagent-release technology", ZH. Song, JH. Lu y TZ. Zhao, *Talanta*, 2001, 53 (6), 1171-1177
250. "Flow-injection chemiluminescence determination of epinefrine in pharmaceutical preparations using raw apple juice as enzyme source", J. Michalowski y P. Halaburda, *Talanta*, 2001, 55 (6), 1165-11741
251. "Enhanced chemiluminescent determination of chloramphenicol and related compounds by "on line" photochemical reaction", V. David, RM. Marin Saez, JV. García Mateo y J. Martínez Calatayud, *Analyst*, 2000, 125 (7), 1313-1319

252. "Electrogenerated chemiluminescent determination of codeine and related alkaloids and pharmaceuticals with tris(2, 2'-bipyridine)rutenium (II)", GM. Greenway, AW. Knight y PJ. Knight, *Analyst*, 1995, 120 (10), 2549-2552
253. "Determination of oxprenolol by electrogenerated chemiluminescence", GM. Greenway y PJ. Knight, *Anal. Proc.*, 1995, 32 (7), 251-253
254. "Electrogenerated chemiluminescence determination of some local anaesthetics", AW. Knight y GM. Greenway, *Anal. Commun.*, 1996, 33 (5), 171-174
255. "Determination of amitriptyline using electrogenerated chemiluminescence", SJL. Dolman y GM. Greenway, *Anal. Commun.*, 1996, 33 (4), 139-141
256. "Determination of codeine in process streams using flow-injection analysis with chemiluminescence detection", NW. Barnett, TA. Bowser, RD. Gerardi y B. Smith, *Anal. Chim. Acta*, 1996, 318 (3), 309-317
257. "Determination of erythromycin in tablets and capsules using flow-injection analysis with chemiluminescence detection", ND. Danielson, L. He, JB. Noffsinger y L. Trelli, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1989, 7 (11), 1281-1285
258. "High-sensitivity determination of emetine dithiocarbamate copper (II) complex using the electrogenerated chemiluminescence detection on tris(2,2'-bipyridine)rutenium (II)", K. Tsukagoshi, K. Miyamoto, E. Saiko, R. Nakajima, T. Hara y K. Fujinaga, *Anal. Sci.*, 1997, 13 (4), 639-642
259. "Chemiluminescence determination of some fluoroquinolone derivatives formulations and biological fluids using tris (2, 2'-bipiridyl) ruthenium (II)-Ce (IV) system", FA. Aly, Tamimi Al y AA. Alwarthan, *Talanta* 2001, 53 (4), 885-893

260. "Determination of flufenamic acid and mefenamic acid in pharmaceutical preparations and biological fluids using flow injection analysis with tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chemiluminescence detection", FA. Aly, Tamini. Al y AA. Alwarthan, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 416 (1), 87-96
261. "Electrogenerated chemiluminescence determination of the antibiotic cefadroxil", IN. Tomita y LOS. Bulhoes, *Anal. Chim. Acta*, 2001, 442 (2), 201-206
262. "Flow-injection-chemiluminometric determination of ascorbic acid based on its sensitized photo-oxidation", T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano y A. Sanz, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 308 (1-3), 299-307
263. "Determination of isoprenaline with lucigenin chemiluminescence using flow-injection analysis", AA. Alwarthan, SA. Al-Tamrah y AA. Al-Akel, *Anal. Sci.*, 1994, 10 (3), 449-452
264. "Study of flow-injection analysis chemiluminescence system of 3,5-dibromosalicylfluorone-hexadecyltrimethylammonium bromide - hydrogen peroxide- cobalt (II) and determination of trace cobalt (II) in vitamin B12", G. Li, M. Li y W. Zhang, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 1990, 10 (1), 26-28
265. "Flow injection determination of vitamin K3 by a chemiluminescence sensor" YM. Huang, ZQ. Chen y ZJ. Zhang, *Anal. Sci.*, 1999, 15 (12), 1227-1230
266. "Flow-injection chemiluminescence determination of captropil using online electrogenerated silver (II) as the oxidant", BX, Li, ZJ. Zhang y ML. Wu, *Microchem. J.*, 2001, 70 (2), 85-91

267. "Flow-injection chemiluminescence determination of captopril with in situ electrogenerated manganese (II) as the oxidant", ZW. Zheng, ZJ. Zhang y BX. Li, *Electroanalysis*, 2001, 13 (12), 1046-1050
268. "Flow-injection chemiluminescence determination of tetracyclines with in situ electrogenerated bromine as the oxidant", XW. Zheng, Y. Mei y ZJ. Zhang *Anal. Chim. Acta*, 2001, 440 (2), 143-149
269. Flow-injection chemiluminometric analysis of some benzamides by their sensitising effect on the cerium-sulfite reaction" FA. Aly, NA. Alarfaj y AA. Alwarthan, *Talanta*, 2001, 54 (4), 715-725
270. "Flow-injection chemiluminescence determination of sodium phosphate dexamethasone using online electrogenerated cobalt (III) as oxidant", ML. Wu, BX. Li y ZJ. Zhang, *Fenxi. Huaxue*, 2001, 29 (3), 267-270
271. "Diseño de fármacos por conectividad molecular" en Diseño de Medicamentos, J. Gálvez y R. García-Domenech, *Ed. Farmaindustria*, 1994, 357-386
272. "Del azar al diseño: nuevas estrategias contra la enfermedad" en Ciencias Farmacéuticas, del amuleto al ordenador, J. Gálvez, *Ed. Fundación Universitaria San Pablo C.E.U.*, 1998, 107-135
273. "Application of graph theory in chemistry", AT. Balaban, *J. Chem. Inf. Comput. Sc.*, 1985, 25, 334-343
274. "Application of the new atomic theory to the graphical representation of the invariants and covariants to the binary quantics", JJ. Sylvester, *Am. J. Math.*, 1874, 1, 64-83

275. "Structural determination of paraffin boiling points", H. Wiener, *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, 69, 17-20
276. "Correlation of heats of isomerization and differences in heats of vaporization of isomers among the paraffin hydrocarbons", H. Wiener, *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, 69, 2636-2638
277. "Gordon Scantelebury", *Tras Faraday Soc.*, 1964, 60, 605
278. "Topological index. A newly proposed quantity characterizing the topological nature of structural isomers of saturated hydrocarbons", H. Hosoya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1971, 44, 2332-2339
279. "On characterization of molecular branching", M. Randic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, 97, 6609-6615
280. "Theoretic Information indices for characterization of chemical structures", D. Bonchev, Chichester, Research Studies, 1983
281. "Comparison of several molecular topological indices with molecular surface area in aqueous solubility estimation", GL. Amidon y ST. Anik., *J. Pharm. Sci.*, 1975, 64, 801-806
282. "Molecular Connectivity I: Relationship to non-specific anesthesia", LB. Kier, LH. Hall, WJ. Murray y M. Randic, *J. Pharm. Sci.*, 1974, 64, 1971-1974
283. "Molecular Connectivity in Chemistry and Drugs Research", LB. Kier y LH. Hall, Academic Press, London, 1976

284. R. García-Domenech, Unidad de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular, Dept. Química Física, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia
285. LH. Hall, Molcoon-Z (molconn software version 3.0), Eastern Nazaree College, Quincy, Massachusetts, USA
286. “BMDP Statistical Software Manual, Vol I”, WJ. Dixon, MB. Brown, L. Engelman y RI. Jennrich, University of California Press, 1990, 339-358
287. “Pharmacological distribution diagrams. A tool for the novo drug desing” J. Galvez, R. García-Domenech, C. Gregori-Alapont, JV. Julián-Ortiz y L. Popa, *J. Mol. Graphics*, 1996, 14, 272-276
288. “Sequential application of simplex designs in optimization and evolutionary operation”, W. Spendley, GR. Hext y FR. Himsworth, *Technometrics*, 1962, 4, 441
289. “A simplex method for the function minimization“, JA. Nedler y R. Mead, *Computer J.*, 1965, 7, 308
290. “Programación no lineal sin condiciones”, JL. Gasco, Mayo 1981
291. “Selection and preprocessing of factors for simplex optimization”, LA. Yabro y SN. Deming, *Anal. Chim. Acta*, 1974, 46, 1170
292. “Computer-assisted optimization for flow injection analysis of isoprenaline”, D. Betteeridge, TL. Sly, AP. Wade y JEW. Tilman, *Anal. Chem.*, 1983, 55 (8), 1292-1299

293. "Simplex optimization of analytical chemical methods", SL. Morgan y SN. Deming, *Anal Chem.*, 1974, 46, 1170
294. "Formulario Magistral del Ilustre Colegio de Farmacéuticos de Murcia", M^a Lourdes Oruezabal Moreno (Coordinadora), pág 405-406, Murcia 1997
295. "La fotografía paso a paso", Michael Langford, Ediciones Hermann Blume, pág 213, 1992
296. "Prediction of chemiluminescent behavior of pharmaceuticals and pesticides", L. Lahuerta Zamora, Y. Fuster Mestre, M.J. Duart, G.M. Antón Fos, R. García-Doménech, J. Gálvez Álvarez y J. Martínez Calatayud, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 4301-4306
297. "Screening of chemiluminescent systems for the determination of some biologically important organic compounds", T. Nakagama, M. Yamada y S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 1989, 217 (2), 371-376
298. "Charge Indexes. New topological descriptors", J. Gálvez, R. García Domenech, M.T. Salabert y R. Soler-Roca, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1994, 34, 520-525
299. "The E-State as an Eztended Free Valence", LB. Kier y LH. Hall, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1997, 37, 548-552
300. "Resolution of complex mixtures of non-flavonoid polyphenols by column-switching high-performance liquid chromatography using octadecysilica and graphitized carbon columns", E. Leira, A. Botana, y R. Cela, *Journal of Chromatography A.*, 1996, 724, 67-78

301. "Selection of column and gradient for the separation of polyphenols in sherry wine by high-performance liquid chromatography incorporating internal standards", D.A. Guillén, C.G. Barroso y J.A. Pérez-Bustamante, *Journal of Chromatography A.*, 1996, 724, 117-124
302. "Applicability of a postcolumn photochemical reactor in the high-performance liquid chromatography of 34 polyphenolic compounds with UV detection", R. Cela, M. Lores y C.M. García, *Journal of Chromatography A.*, 1992, 626, 117-126
303. "Automation of sample preparation as a preliminary stage in the high-performance liquid chromatographic determination of polyphenolic compounds in sherry wines", D.A. Guillén, C.G. Barroso y J.A. Pérez-Bustamante, *Journal of Chromatography A.*, 1996, 730, 39-46
304. "Methods in Plant Biochemistry", Vol 1 Plant Phenolics, J.B. Harborne, Plant Science Laboratories University of Reading, UK, Academic Press
305. "The Merk Index", 12th Ed., pág 7390, nº 7390, Merk and Co., Inc., New Jersey, U.S.A., 1996.
306. "Real Decreto 849/1986, 11 de abril por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los títulos preliminares I, IV, V, VI, VII de la ley 29/1985, de 2 de agosto, de aguas"
307. "Real Decreto 927/1988, de 29 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Administración pública de Agua y de la Planificación Hidrológica, en el desarrollo de los Títulos II y III de la ley de aguas"

308. “Real Decreto 1138/1990, de 14 de septiembre por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público”, (BOE núm. 226, 20 de septiembre)
309. “Análisis de las aguas (aguas naturales, residuales, de mar)”, J. Rodier, pág 393-395, Ediciones Omega S.A., Barcelona, 1990
310. “Standard Methods for examination of water (APHA-AWWA-WPCF)”, pág 5-56-5-63, Ediciones Díaz de Santos S.A, 1992
311. “Flow–injection luminiscence determination of phenols with extraction–chromatographic and chromatomembrane separation of the extract from the aqueous phase”, AL. Moskvín, LN. Moskvín, AV. Mozzhukhin y VV. Fomin, *J. Anal. Chem.*,2000, 55 (4), 354-357
312. “Determination of phenol in water by flow-injection analysis”, J. Möller y M. Martin, *Fresenius’Z. Anal .Chem.*,1988, 329 (6), 728-731
313. “Photometric determination of phenol with a flow-injection analyser that includes a chromatomembrane-cel for sample preconcentration by liquid–liquid solvent extraction”, H. Erxleben, J. Simon, LN. Moskvín y TG. Nikitina, *J. Flow. Injection. Analysis*, 2001, 18 (1), 39-42
314. “Flow-injection preconcentration for determination of phenol”, JF. Li, FJ. Zhang, ZM. Dang y ZX.Tang, *Fenx. Huaxue*, 1996, 24 (3), 312-314
315. Química orgánica “Estructura y reactividad”, tomo 2, Seyhean Ege, páginas 915-917, Editorial Reverté S.A., 1998

316. "Determination of procaine, benzocaine and tetracaine by sequential-injection analysis with permanganate-induced chemiluminescence detection", H. Pasekova y M. Polasek, *Talanta*, 2000, 52(1), 67-75
317. "Flow-injection chemiluminescence determination of methotrexate", YH. He, YY. Xue, ML. Feng y JR. Lu, *Fenxi.Huaxue*, 1998, 26 (9), 1136-1138
318. "Determination of iron in cereals by flow-injection micelle sensitization chemiluminescence method", ZJ. Zhu, QQ. Yang y ZF. Hao, *Lihua. Jianyan, Huaxue Fence*, 2000, 36 (2), 60-61
319. "Tris (2,2- bipyridyl ruthenium (II) chemiluminescence in a microflow injection system for codeine determination", GM. Greenway, LJ Nelstrop y SN. Port, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 405 (1-2), 43-50
320. "Luminiscence of micellar solutions", Ray Von Wandrusska, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1992, 23 (3), 187-215
321. "Surfactants in membrane research, receptor research, enzymology, biotechnology, separation techniques , experimental pharmacy, analytics, etc", Serva Threefold unique, Serva Feinbiochemica GMBH & CO. KG, Heidelberg.
322. "New chemically modified polymeric resin for solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from water", N. Masqué, M. Galià y F. Borrull, *Journal of Chromatography A*, 1998, 803, 147-155
323. "Comparasion of different sorbents for on-line solid-phase extraction if pesticides and phenols compounds from natural water followed by liquid chromatography", N. Masqué, R.M. Marcé y F. Borrull, *Journal of Chromatography A*, 1998, 793, 257-263

324. "Formulario Español de Farmacia militar", Volumen I, 7ª Edición, pág 102-103, Editado por el laboratorio y parque central de farmacia militar, 1975
325. "The Merk Index", 12th Ed., pág 9221, nº 9221, Merk and Co., Inc., New Jersey, U.S.A., 1996
326. "Biosynthesis of natural products", P. Manitto, Ellis Horwood Publishers, New York, 1981
327. "An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods", A. Escarpa y M.C. Gonzalez, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2001, 31 (2), 57-139
328. "Economic and medical plant research", Vol 5, pág 143-144, Ed H. Wagner, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, München, West Germany, Academic Press
329. "Martindale The ExtraPharmacopoeia", 28th Ed, pág 287, Ed J.E.F. Reynolds, The Pharmaceutical Press, 1982
330. "Química de los Alimentos", OR. Fennema, Department of food science University of Wisconsin-Madison, pág 746-747, Ed Acribia, S.A.
331. "Colorimetric method for the determination of vanadium with tannic acid in water and oil", F. Bosch Serrat y G. Bosh Morell, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, 349, 717-721
332. "Preconcentration by coprecipitation of chromium in natural waters with palladium/8-quinolinol/tannic acid complex and its direct determination by solid-sampling atomic-absorption spectrometry", QB. Zhang, H. Minami, S. Inoue y I. Atsuya, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 401 (1-2), 277-282

333. "Estimation of some aminoquinoline antimalarials using tannic acid", BS. Sastry, JV. Rao, TNV. Prasad y CPS. Sastry, *Indian. J. Pharm. Sci.*, 1989, 51 (3), 109-110
334. "Thermometric titration of polyhydric phenols. Application to the determination of tannin content of wines", M. Celeste, C. Tomás, A. Cladera, J.M. Estela y V. Cerdà, *Analyst*, 1993, 118, 895-898
335. "Tannin analysis of food products", SS. Deshpande, M. Cheryan y DK. Salunkhe, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 1986, 24 (4), 401-449
336. "Cerimetric determination of tannins and tannic acid in comercial tea samples and gallic acid in gallic acid solutions", BM. Rao y UR. Chaudhari, *Ann. Chim.*, 1986, 76 (11-12), 515-522
337. "Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo", H.L. Valdés, E.R. Leyes y H.P. de Leon, *Rev. Cubana Plant. Med.*, 2000, 5 (1), 17-22
338. "Determination of iron-binding phenolic groups in foods", M. Brune, L. Hallberg y AB. Skanberg, *J. Foods. Sci.*, 1991, 56 (1) 128-131, 167
339. "Specrophotometric methods for determination of morin, quercetin, tannin and chlorogenic acid", CSP. Sastry, KE. Rao, D. Vijaya, AR. Rao y MV. Rao, *J. Food. Sci. Technol.*, 1988, 25 (3), 156-157
340. "Utilization of tetrazolium blue for the colorimetric assay of tannins in tea", AS. Amin, *Mikrochim. Acta*, 1997, 126 (1-2), 105-108

341. "Protein precipitation for quantitation of tannins; determination of protein in tannin-protein complex", HPS. Makkar, RK. Dawara y B. Singh, *Anal. Biochem.*, 1987, 166 (2), 435-439
342. "Studies on the determination of tannic acid in rhubarb. Casein method", W. Luo y Y. Zhang, *Yaowu. Fenxi. Zazhi*, 1986, 6 (1), 15-18
343. "Investigation of Folin-Ciocalteu phenol reagent for determination of polyphenolic substances in natural waters", J.D. Box, *Water. Res.*, 1983, 17 (5), 511-525
344. "Official Methods of Analysis of AOAC International", 16th Edition, Volumen 2, Capítulo 26, pág 16-17, 1995
345. "Determination of tea tannic acid by indirect atomic-absorption spectrometry", XY. Du, CM. Guan, ZC. Shi y XZ. Li, *Fenxi. Shiyanshi*, 1998, 17 (2), 84-86
346. "Analysis of tannic acids by high-performance liquid chromatography", M. Verzele y P. Delahaye, *Journal of Chromatography*, 268, 1983, 469-476
347. "Analysis of gallic, digallic and trigallic acids in tannic acids by high-performance liquid chromatography", P. Delahaye y M. Verzele, *Journal of Chromatography*, 1983, 265, 363-367
348. "Identificación and determination of phenolic constituents in natural beverages and plant extracts by means of a coulometric electrode array system", G. Achilli, GP. Cellerino y PH. Gamache, *Journal of Chromatography*, 1993, 632, 111-117

349. "Determination of tannic acid and its phenolic metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography", J. Zhu, J. Ng y LH. Flippich, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1992, 115, 77-85
350. "Tartaric acid in wines may be useful for preventing renal calculi: rapid determination by HPLC", L. Radin, C. Pronzato, L. Casareto y L. Calegari, *J. Liq. Chromatogr.*, 1994, 17 (10), 2231-2246
351. "Thin layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid", OP. Sharma, TK. Bhat y B. Singh, *Journal of Chromatography A*, 1998, 822 (1), 167-171
352. "Analysis of the components of *Paeonia radix* by capillary zone electrophoresis", S. Honda, K. Suzuki, M. Kataoka, A. Makino y K. Kakehi, *Journal of Chromatography*, 1990, 515, 653-658
353. "Applications of capillary electrophoresis in element speciation analysis of plant and food extracts", J. Harm y G. Schwedt, *Fresenius'. J. Anal. Chem.*, 1994, 350 (1-2), 93-100
354. "Heavy metal binding by tannic acid: a voltametric study", BH. Cruz, JM. Diaz. Cruz, C. Arino y M. Esteban, *Electroanalysis*, 2000, 12 (14), 1130-1137
355. "A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics", PA. Kilmartin, HL. Zou y Al. Waterhouse, *J. Agrc. Food.Chem.*, 2001, 49 (4), 1957-1965
356. "Multivariate curve resolution of polarographic data applied to the study of the copper-binding ability of tannic acid", BH. Cruz, JM. Díaz-Cruz, C. Arino, R. Tauler y M. Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 424 (2), 203-209

357. "Microbial sensor for the determination of tannic acid", YB. Zhao, ML. Wen, SQ. Liu, ZH. Liu, WD. Zhang, Y. Yao y CY. Wang, *Microchem. Journal*, 1998, 60 (3), 201-209
358. "Indirect flow-injection determination of tannins in wines and tea by atomic absorption spectrometry", MC. Yebra, M. Gallego y M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 1995, 308, 357-363
359. "Flow injection analysis of tannic acid with inhibited electrochemiluminescent detection", Y.G. Sun, H. Cui, Y. Hui Li, H.Z. Zhao y X.Q. Lin, *Anal. Lett.*, 2000, 33 (11), 2281-2291
360. "Flow injection analysis of tannic acid with enhanced chemiluminescence detection", SF. Li, H. Cui, YG. Sun y XQ. Lin, *Fenxi. Huanxe*, 2001, 29 (3), 333-335
361. "Flow-injection kinetic spectrophotometry for the determination of tannic acid in lupulus", XJ. Qu, J. Zhou, HZ. Yin y YH. Sun, *Fenxi. Huaxue*, 2000, 28 (7), 820-824
362. "Enhanced automatic flow-injection determination of total polyphenol index of wines using Folin-ciocalteu reagent", M. Celeste, C. Tomás, A. Cladera, JM. Estela y V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta*, 1992, 269, 21-28
363. "Chemiluminescence analysis of menadione sodium bisulfite and analgin in pharmaceutical preparations and biological fluids", YM. Huang, C. Zhang, XR. Zhang y ZJ. Zhang, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, 21 (4), 817-825

364. "A sensitive chemiluminescence flow system for determination of sulfite", YM. Huang, C. Zhang, XR. Zhang y ZJ. Zhang, *Anal. Lett.*, 1999, 32 (6) 1211-1224
365. "Determination of pyrogallol using continuous flow with chemiluminescence detection", NJ. Kearney, ES Bridgeland, RA, Jewsbury, ND, Martin, SJ, Kelly, SR, Korm, *Analytical Communications*, 1996, 33 (7), 241-243
366. "Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I₂₈₀) and density in wines by flow injection", E. Mataix and M.D. Luque de Castro, *Analyst*, 2001, 126 (6), 251-255
367. "The Merk Index", 12th Ed., pág 4855, nº 4853, Merk and Co., Inc., New Jersey, U.S.A., 1996.
368. "La formulación magistral en la oficina de farmacia", M^a José Llopis Clavijo y Vicent Baixauli Comes, pág 92-93, Valencia 1981
369. "Remington's Pharmaceutical Sciences", J.E. Hoover, 15th Ed 1975, pág 726, capítulo 39, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042
370. "Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales", J. Bruneton, 2^a Ed, pág 243-245, Ed. Acribia, S.A. Zaragoza
371. "Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España", Base de datos de medicamento, Marzo 2002
372. "Fifth Amendment Commission Directive 84/415/EEC", *Off. J. Eur. Commun.*, 1984, L228

373. "The United States Pharmacopoeia 22. The National Formulary 17", pág 665-666, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville-MD, 1990
374. "1,3-Dihidro-5 ethyl-5-methylhydantoin as a quantitative oxidant in titrimetric determination of hydrazine, thiourea, hydroquinone, ascorbic acid, antimony (III) and titanium (II)", M. Satake, KN. Upadhyaya y M. Katyal, *Orient. J. Chem.* 1986, 2 (1), 62-63
375. "Determination of hydroquinone (quinol) and phenylhydrazine hydrochloride with N-Bromosuccinimide", Rangaswamy, HS. Yathirajan y BM. Mohan, *Indian. J. Chem, Sect A*, 1984, 23 (12), 1055-1056
376. "Determination of quinol content of creams by ultraviolet spectrophotometry", H. Zhong y D. Chen, *Yaouxue. Tongbao*, 1988, 23 (4), 223-224
377. "Determination of phenol, hydroquinone and catecol by multiwavelength linear regression derivative spectrophotometry", CX. He, ZX. Wang y LS. Chen, *Fenxi. Shiyanshi*, 1996, 15 (2), 25-28
378. "Indirect kinetic spectrophotometric determination of resorcinol, catechol y hydroquinone", A. Afkhami y HA. Khatami, *J. Anal. Chem.*, 2001, 56 (5), 429-432
379. "Spectrophotometric determination of quinol using cerium (IV) and arsenazo (III) as reagents", F. Bulh, E. Dul. Zarychta y M. Chwistek, *Chem Anal.*, 1988, 33 (5), 819-821
380. "New reagent for photometric determination of hydroquinone", U. Muralikrishna y JA. Murty, *J. Inst. Chem.*, 1990, 62 (5), 191

381. "Photographic processing waste-determination of hydroquinone (quinol) content by spectrophotometric method", American National Standards Institute. *Am. Natl. Stand. Ins. Stand.*, 1987
382. "Determination of trace hydroquinone by inhibition kinetic spectrophotometry", LW. Liu, *Fenxi. Huaxue*, 2000, 28 (9), 1088-1090
383. "Identification and quantification of hydroquinone and some of its ethers in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography," L. Gagliardi, A. Amato, G. Cavazzutti, F. Chimenti, A. Bolasco y D. Tonelli, *J. Chromatogr.*, 1987, 404 (1), 267-272
384. "Determination of hydroquinone (quinol) in skin-toning creams using high-performance liquid chromatography", J. Firth y I. Rix, *Analyst*, 1986, 111 (2), 129-132
385. "Experimental and statistical validation of HPLC analysis of hydroquinone and its 4-methoxyphenol and 4-benzyloxyphenol ethers in cosmetic products", M. Borremans, J. De Beer y L. Goeyens, *Chromatographia*, 1999, 50 (5-6), 346-352
386. "Determination of catecol and quinol in the urine of workers exposed to benzene", O. Inoue, K. Seiji, M. Kasahara, H. Nakatsuka, T. Watanabe, S. Yin, G. Li, S. Cail, C. Jin y M. Ikeda, *Br. J. Ind. Med.*, 1988, 45 (7), 487-492
387. "Simultaneous determination of hydroquinone, catecol and fenol in urine using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection", BL. Lee, HY. Ong, CY. Shi y CN. Ong, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1993, 130, 259-266

388. "Determination of hidroquinone (quinol) and metol in photographic developer by reversed-phase ion-pair chromatography with amperometric detection", G. Zou, R. Shi, X. Xie, H. Chen y R. Neeb, *Anal. Chim. Acta*, 1988, 208 (1-2), 337-342
389. "Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection", Hua Cui, Caixia He y Guiwen Zhao, *J. Chromatography A*, 1999, 855, 171-179
390. "Aplication note-separation of hidroquinone, pyrocatechol and 2-naphthol by TLC", *Macherey. Nagel. Application. Note*, 2000, A-420, 2
391. "Aplication note-TLC separation of guaiacol, hidroquinone and kojic acid", *Macherey. Nagel. Application. Note*, 2000, A-418, 1
392. "Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries", S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya y T. Ando, *Anal. Chem*, 1984, 56 (1), 111-113
393. "Micellar electrokinetic chromatographic study of hidroquinone (quinol) and some of its ethers. Determination of hidroquinone in skin-toning cream", IK. Sakodinskaya, C. Desiderio, A. Nardi y S. Fanali., *J. Chromatogr.*, 1992, 596 (1), 95-100
394. "Analysis of hidroquinone and some of its ethers by using capillary electrochromatography", C. Desiderio, L. Ossicini, S. Fanali, *J. Chromatogr A.*, 2000, 887 (1-2), 489-496
395. "Simultaneous determination of hidroquinone ethers in cosmetics after preconcentration at a carbon paste electrode", L.H. Wang, *Analyst*, 1995, 120 (8), 2241-2244

396. "Electrochemical behaviour of hidroquinone on poly (5-sulfosalicylic acid)-modified electrodes", H. Zhao, YZ. Zhang, ZB.Yuan, *Fenxi. Shiyanshi*, 2001, 20 (6), 70-72
397. "Simultaneous determination of trace metal in developing waste water by anodic stripping voltammetry at the carbon paste electrode", C. Zhang, J. Chen y J. Zhao, *Fenxi. Huaxue*, 1992, 20 (4), 490
398. "Flow injection chemiluminescence determination of polyhydroxy phenols using luminol-ferricyanide/ferrocyanide system", J. Du, Y. Li y J. Lu., *Talanta*, 2001, 55, 1055-1058
399. "Liquid chromatography-amperometric detection of catecol, resorcinol, and hidroquinone (quinol) with a copper-based chemically modified electrode", JX. Zhou y EK. Wang, *Electroanalysis*, 1992, 4 (2), 183-189
400. "Flow-injection analysis of quinol, catecol, resorcinol, and pyrogallol with an amperometric detector", H. Satake, Y. Kohri y S. Ikeda, *Nippon. Kagaku. Kaishi*, 1986, (1), 43-48