

**UTILIZACION DE LOS HORNOS DE
MICROONDAS EN LA QUIMICA ANALITICA**



**Memoria presentada por
Angel Enrique Morales Rubio
para alcanzar el grado de Doctor.**

UMI Number: U603160

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603160

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

FACULTAD QUIMICA
BIBLIOTECA

Cat.

Encuad.

Ent. 6436 Q

Mat.

Sell.

Test. T.D

Top. 431

Ri 18675505

R. 6436



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE QUIMICAS

Departamento de Química Analítica

Doctor Moliner, 50

Teléfono (96) 363 00 11

BURJASOT (VALENCIA)

FRANCISCO BOSCH REIG, Catedrático Numerario de
Universidad y Director del Departamento de Química
Analítica de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

que la Tesis Doctoral "UTILIZACION DE LOS
HORNOS DE MICROONDAS EN LA QUIMICA
ANALITICA", cuya memoria se adjunta, ha sido
realizada por D. Angel Enrique Morales Rubio
en el departamento que dirijo, bajo la
dirección de los Profesores Titulares Dr.
Miguel de la Guardia Cirugeda y Dra. Amparo
Salvador Carreño.

Lo que certifico para los efectos oportunos a veintiuno
de marzo de mil novecientos noventa y uno.





UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

C/. Doctor Moliner, 50

Teléfono 386 43 00

46100 - BURJASOT (Valencia) España

MIGUEL DE LA GUARDIA CIRUGEDA Y AMPARO SALVADOR CARREÑO,
Dres. en Química y Prof. Titulares del Dpto. de Química
Analítica de la Universitat de València

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral de ANGEL ENRIQUE MORALES
RUBIO, titulada "UTILIZACION DE LOS HORNOS DE
MICROONDAS EN LA QUIMICA ANALITICA" se ha
desarrollado bajo su dirección en el Dpto. de
Química Analítica de la Universitat de
València.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman la
presente, en Valencia a veintiuno de marzo de mil
novecientos noventa y uno.



Fdo. M. de la Guardia



Fdo. A. Salvador

Ante todo quiero agradecer a Miguel y Amparo, no solo su dirección y apoyo constantes, sino también su ayuda en los momentos que en verdad se necesita.

A mi padre por la fabricación de algunos accesorios de teflón empleados en la realización de este trabajo y a mi hermana por la ayuda desinteresada e ideas para la realización de la exposición, y a mi madre por su apoyo.

A mis compañeros del L.10 Angela, Eupar, Rosa II, Caruina, كرم, Sammy, Santiago y Terol; del L.5 Zoro, Máximo, Miguel, Rosa I y Fina; del L.4 Rosa III y Carmen y del L.9 Sabmé; por haberme aguantado sobre todo en los momentos difíciles.

A Luisa Ballesteros quien me introdujo en el mundo de la investigación.

A Eri y Adebá por dejarme los reactores de teflón para poder desarrollar una parte del trabajo, y a Vicente por esas sesiones de modo intermitente.

A Cere por esos días de "Jacks y palmitos" y por esas tardes con nuestra amiga la albúmina bovina con su máscara azul.

A Alberto Muñoz por la fabricación de las ampollas de vidrio y su sellado al vacío y a los compañeros del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Medicina de Valencia por la realización de la nomaografía.

A Francisco Tarazona por su ayuda al iniciarme en el manejo del espectrómetro de absorción atómica, y a Fernando Pomares, así como a todo el servicio del Dpto. de Ecología del I.V.I.A. que me admitió como un miembro más en mi corta estancia allí.

A Tere y Paqui (AICE) por darme la lámpara de G; y a Amparo (servicio Rx) por la realización de los espectros de rayos-x.

A Jose por el diseño de los dibujos de la mufa.

A todos aquellos que estaban cuando yo empezé, y ahora ya no están: Huelamin, Angels, Marisa, Paqui y Jose Antonio.

A todos los miembros del Dpto. de Química Analítica por sus consejos y gratos momentos que hemos pasado juntos.

A mis compañeros de promoción Ana, Silvia, Jani, Paco, J. Antonio, J. Luis y Marqués.

A los 12 años de práctica del $\text{EH } \mathcal{K}_2 \text{ L}$ que, aunque muchos no lo vean, ayuda a la concentración; y a todos los compañeros del rugby, tanto en el 1º y 2º como en el 3º tiempo.

A duisa.

A mis padres

INDICE

1.- INTRODUCCION.	1
1.1.- Fundamento del empleo de hornos de microondas en Química.	3
1.1.1.- Aplicaciones prácticas de las microondas.	4
1.1.2.- Los hornos de microondas como fuentes de calentamiento.	8
1.1.3.- Clasificación de los materiales en su interacción con las microondas.	15
1.1.4.- Componentes de un horno de microondas.	17
1.2.- Interés en Química Analítica.	23
2.- OBJETO DEL TRABAJO.	29
3.- PARTE I: EMPLEO DEL HORNO DE MICROONDAS EN LA ACELERACION DE REACCIONES ANALITICAS. DETERMINACION DEL GRADO DE AVANCE DE LA REACCION POR ESPECTROFOTOMETRIA UV.	33
I.0.- Reacciones en hornos de microondas.	35
I.0.1.- Comportamiento de los disolventes orgánicos en los hornos de microondas.	37
I.0.2.- Variables experimentales en el control de las reacciones.	40
I.0.3.- Reacciones llevadas a cabo en hornos de microondas.	43
I.0.3.1.- Reacciones de oxidación.	43
I.0.3.2.- Reacciones de esterificación.	43
I.0.3.3.- Reacciones S_N^2 .	44
I.0.3.4.- Reacción de Diels-Alder.	45
I.0.3.5.- Transposición de Claisen.	47
I.0.3.6.- Reacciones eno.	48
I.0.3.7.- Reacciones de síntesis de derivados.	49



I.0.3.8.- Otras reacciones de síntesis.	51
I.0.3.9.- Reacciones de hidrólisis.	52
I.1.- HIDROLISIS DE BENZODIACEPINAS EN HORNO DE MICROONDAS	55
I.1.1.- Objetivo.	57
I.1.2.- Introducción.	57
I.1.3.- Parte experimental.	63
I.1.3.1.- Aparatos y reactivos.	63
I.1.3.2.- Procedimiento general.	67
I.1.3.2.1.- Estudio de la hidrólisis en horno de microondas.	67
I.1.3.2.2.- Determinación espectrofotométrica de benzofenonas en presencia de benzodiacetinas.	68
I.1.4.- Resultados y discusión.	68
I.1.4.1.- Uso de las derivadas en la determinación de benzofenonas en presencia de benzodiacetinas.	68
I.1.4.2.- Parámetros analíticos de la determinación de benzofenonas.	72
I.1.4.3.- Efecto de los parámetros de digestión.	74
I.1.4.3.1.- Tiempo de digestión.	74
I.1.4.3.2.- Potencia.	76
I.1.4.4.- Hidrólisis de benzodiacetinas.	78
I.1.5.- Conclusiones.	79
I.2.- HIDROLISIS DE ALBUMINA EN HORNO DE MICROONDAS	81
I.2.1.- Objetivo.	83
I.2.2.- Introducción.	83
I.2.3.- Parte experimental.	90
I.2.3.1.- Aparatos y reactivos.	90
I.2.3.2.- Procedimiento general.	92
I.2.3.2.1.- Hidrólisis en horno de microondas.	92

I.2.3.2.2.- Método de hidrólisis convencional.	93
I.2.3.2.3.- Determinación espectrofotométrica.	94
I.2.3.2.4.- Estudio de la recuperación de los diferentes aminoácidos tras la hidró- lisis en horno de microondas.	95
I.2.4.- Resultados y discusión.	96
I.2.4.1.- Efecto de los parámetros de digestión.	96
I.2.4.1.1.- Volumen de reacción.	96
I.2.4.1.2.- Concentración de ácido.	98
I.2.4.1.3.- Potencia del horno.	100
I.2.4.1.4.- Tiempo de hidrólisis.	102
I.2.4.2.- Análisis cromatográfico de los aminoáci- dos.	105
I.2.4.3.- Comparación de la hidrólisis de albúmina con la de otras proteínas en horno de microondas.	109
I.2.5.- Conclusiones.	110
4.- PARTE II: EMPLEO DEL HORNO DE MICROONDAS EN LA DIGESTION DE MUESTRAS. DETERMINACION DE ELEMENTOS METALICOS POR ESPECTROMETRIA ATOMICA CON LLAMA MEDIANTE INTRODUCCION DE SUSPENSIONES DE MUESTRAS DIGERIDAS.	111
II.0.1.- Digestión de muestras en horno de microondas.	113
II.0.1.1.- Bases para el ataque de muestras sólidas en hornos de microondas.	113
II.0.1.2.- Modificación de los hornos de microondas para su empleo en el laboratorio.	115
II.0.1.3.- Digestión húmeda en horno de microondas.	123
II.0.1.4.- Comportamiento de los ácidos frente a las microondas.	137
II.0.1.5.- Digestiones a presión en hornos de microondas.	143

II.0.2.- Empleo de suspensiones para la introducción directa de muestras en espectrometría atómica.	159
II.0.2.1.- Aspectos generales del análisis directo de sólidos.	159
II.0.2.2.- Empleo de suspensiones.	161
II.1.- DIGESTION DE LODOS.	167
II.1.1.- Objetivos.	169
II.1.2.- Introducción.	169
II.1.2.1.- Origen y composición de los lodos.	169
II.1.2.2.- Métodos de extracción de elementos metálicos en lodos para su determinación por espectrometría de absorción atómica con llama.	172
II.1.3.- Parte experimental.	181
II.1.3.1.- Aparatos y reactivos.	181
II.1.3.2.- Procedimiento general.	183
II.1.3.2.1.- Preparación de los patrones.	183
II.1.3.2.2.- Estudio de las condiciones de digestión de las muestras.	184
II.1.4.- Resultados y discusión.	186
II.1.4.1.- Comportamiento de los patrones.	186
II.1.4.1.1.- Comparación de las características reológicas de muestras en suspensión y patrones acuosos.	186
II.1.4.1.2.- Estudio del efecto de la concentración de ácido.	188
II.1.4.1.3.- Estudio de los efectos interelementales.	189
II.1.4.2.- Estudio de las variables de digestión.	192
II.1.4.2.1.- Efecto del tiempo de digestión.	192
II.1.4.2.2.- Efecto de la potencia de digestión.	199
II.1.4.2.3.- Efecto de la cantidad de muestra y del volumen de ácido.	207

II.1.4.3.- Características analíticas de método propuesto.	218
II.1.4.4.- Análisis de muestras certificadas de lodo.	220
II.1.4.5.- Mecanismo de atomización de las suspensiones.	224
II.1.5.- Conclusiones.	227
II.2.- DIGESTION DE CATALIZADORES.	229
II.2.1.- Objetivos.	231
II.2.2.- Introducción.	231
II.2.2.1.- Los catalizadores en la industria petrolífera.	234
II.2.2.2.- Métodos de análisis de catalizadores sólidos multimetálicos.	236
II.2.3.- Parte experimental.	238
II.2.3.1.- Aparatos y reactivos.	238
II.2.3.2.- Procedimiento general.	240
II.2.3.2.1.- Digestión en horno de microondas.	240
II.2.3.2.2.- Método de digestión convencional.	241
II.2.4.- Resultados y discusión.	242
II.2.4.1.- Caracterización de las muestras.	242
II.2.4.2.- Estudio de los parámetros de digestión.	246
II.2.4.2.1.- Efecto del tipo de ácido empleado en la digestión sobre la recuperación de Ni, Fe, Co y Mo.	246
II.2.4.2.2.- Efecto de la variación del volumen de ácido sobre la recuperación de Ni, Fe, Co y Mo.	247
II.2.4.2.3.- Efecto de la variación del tiempo de digestión sobre la recuperación de Ni, Fe, Co y Mo.	250
II.2.4.2.4.- Efecto de la variación de cantidad de muestra sobre la recuperación de Ni, Fe, Co y Mo.	255

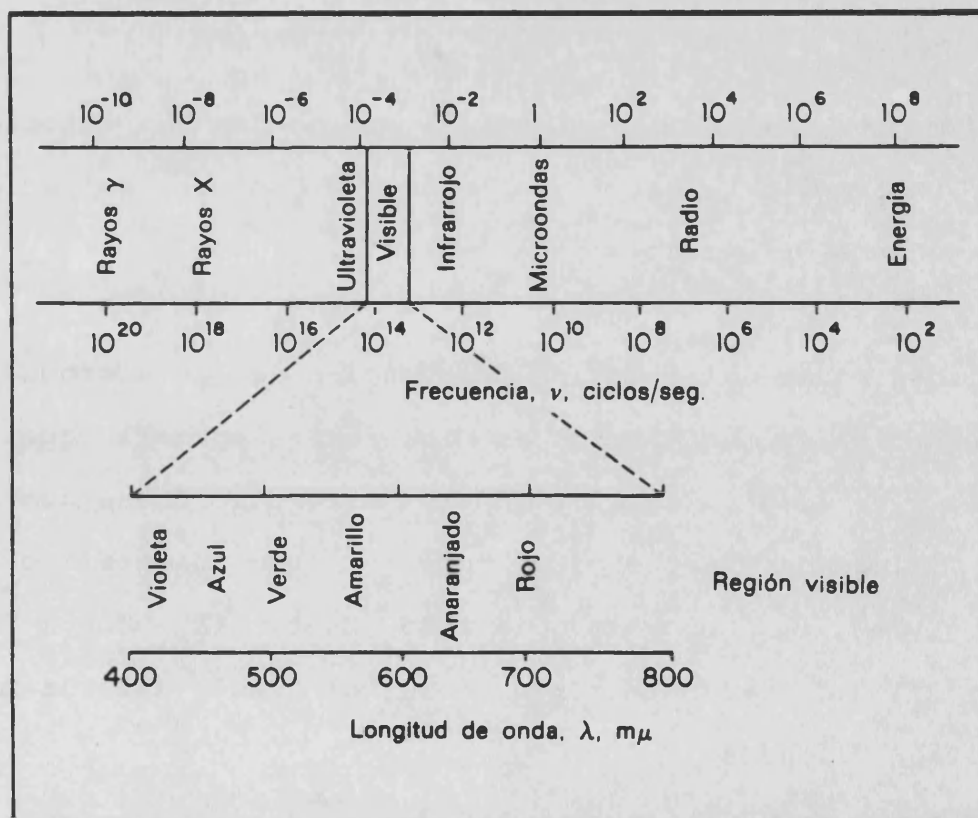
II.2.4.3.- Atomización de las muestras.	261
II.2.4.4.- Características analíticas.	263
II.2.5.- Conclusiones.	267
5.- PARTE III: DISEÑO DE UNA MUFLA DE MICROONDAS Y SU EMPLEO EN LA CALCINACION DE MUESTRAS. DETERMINACION DE ELEMENTOS METALICOS POR ESPECTROMETRIA ATOMICA CON LLAMA MEDIANTE INTRODUCCION DE SUSPENSIONES DE LAS MUESTRAS CALCINADAS.	269
III.1.- Introducción.	271
III.2.- Objetivo.	273
III.3.- Parte experimental.	274
III.3.1.- Aparatos y reactivos.	274
III.3.2.- Procedimiento general.	283
III.4.- Resultados y discusión.	284
III.4.1.- Efecto de las condiciones de carbonización.	284
III.4.2.- Análisis de muestras vegetales.	288
III.4.3.- Parámetros analíticos del procedimiento desarrollado.	293
III.4.4.- Mecanismo de atomización de la muestra.	295
III.5.- Conclusiones.	297
6.- CONCLUSIONES.	299
7.- BIBLIOGRAFIA.	307

1.- INTRODUCCION.

1.1.- Fundamento del empleo de hornos de microondas en Química.

La radiación de microondas constituye una parte del espectro electromagnético de longitudes de onda comprendidas entre 1mm y 1m, lo que la sitúa entre la radiación infrarroja y la de las ondas de radio con una frecuencia de 30000 a 300 megahertzios (figura 1).

Figura 1: Zonas del espectro electromagnético.



1.1.1.- Aplicaciones prácticas de las microondas.

Aunque la radiación de microondas ha sido aplicada con éxito en el análisis cualitativo y cuantitativo de moléculas gaseosas (Ewing 1966), más que las aplicaciones espectroscópicas, han sido las aplicaciones prácticas las que han contribuido a popularizar el empleo de las microondas, y así, debe considerarse como punto de arranque del gran desarrollo que en la actualidad tienen los generadores de microondas el empleo del radar durante la segunda guerra mundial.

En la tabla 1 se indica una pequeña cronología del desarrollo de los sistemas de microondas.

Ahora bien, el campo en que las microondas han conocido un mayor desarrollo ha sido, sin lugar a dudas, su empleo en las operaciones de secado y calentamiento.

La proximidad del campo de frecuencias de las microondas al de las ondas de radio es la razón por la que la Conferencia de Ginebra de 1959 adoptó la regulación de cuatro valores fijos de frecuencias para el uso científico e industrial de las microondas: 915 ± 25 , 2450 ± 13 , 5800 ± 75 , 22125 ± 125 MHz, siendo la frecuencia de 2450 MHz la más ampliamente utilizada.

Tabla 1: Cronología del desarrollo técnico de los generadores de microondas.

- | | |
|---------|---|
| 1919 | Tubo de Barkhausen. |
| 1935 | Los hermanos Varian inventan el Klystron. |
| 1940 | Randall y Boot desarrollan el magnetrón de cavidad de alta potencia, que hizo posible los sistemas efectivos de Radar. |
| 1944 | Kompfner inventa el tubo de onda progresiva, que indujo a una enorme intensificación de las comunicaciones por microondas. |
| Años 60 | Primeros elementos activos semiconductores que como generadores de señal débil y media comienzan a reemplazar a los tubos. |
| 1962 | Descubrimiento del diodo Gum.
Posteriormente diferentes diodos que hacen uso combinado del efecto de cascada y del tiempo de vuelo.
Diodo IMPATT (IMPact Avalanche y Transit Time).
Diodo TRAPATT (TRApped Plasma Avalanche Triggerool Transit). |
| Años 70 | Sustitución progresiva de los diodos por transistores bipolares o tipo MESFET (MEtal Semiconductor Field Effect Transistor). |

En 1952 ya aparece una patente en que se establece el uso de las microondas para el calentamiento de los alimentos (Spencer 1952) y posteriormente se desarrollaron aplicaciones industriales que incluían el tratamiento del carbón para la eliminación de los sulfuros orgánicos (Jacobs y col. 1982; Rush y Onischak 1983; Bluhm y col. 1986; Yang y Wu 1987; Kusakabe y col. 1988); el secado de polímeros (Kumar 1982; Vasilakos y Magalhaes 1984; Amano y Nakagawa 1987), cerámicas (Baliut y col. 1987; Oda y col. 1987), y material fotográfico (Ertsgaard 1977; Minoda y Ogawa 1977); el procesamiento de cerámicas (Chabinsky y Eves 1985; Tinga 1988; Senise 1989;

Fukushima y col. 1990), cerámicas superconductoras (Clark y col. 1989), y materiales de la industria metalúrgica (Barnstey 1989); el "clinkering" de cemento (Quemeneur y col. 1983); la manufacturación de vidrio (Komatsu 1985), y geles aluminosilíceos (Roy y col. 1985); el tinte (Sugimoto y col. 1975) y secado (Bhagwat 1988) de tejidos.

Las microondas se han empleado también en la industria del petróleo, en procesos tales como el hidrocraqueo catalítico (Kirkbride 1981; Wan y col. 1984) y la hidrodeshidrosulfurización de alquitranes (Wan y Kriz 1985); y en la industria maderera, en procesos tales como la eliminación de resinas (Matsushita 1984a), y de ceras (Matsushita 1984b), deshidratación (Bozek y col. 1988), tratamiento de la corteza para eliminar los insectos (Dawson y col. 1990) y en la utilización de materiales adhesivos para la madera (Sakata 1986; Sakukai y col. 1987).

También se han empleado en el tratamiento de residuos agrícolas para la producción de etanol (Magara y col. 1989), la vulcanización del caucho (Le Rossignol 1987; Tedesko 1988) y en el secado de pastas (Smith 1984).

Se han desarrollado, además, aplicaciones en diversos campos; entre los que caben destacar, la restauración de documentos de papel (Brandt y Berteand 1987); la restauración del pavimento de carreteras (Terrel y Al-Ohaly 1987; Nemeth y

Smith 1990); la destrucción de residuos plásticos (Holland 1988); pasteurización de aceites lubricantes (Elsmore y Hill 1985); la preparación de pastillas para el control microbiano en piscinas (Shimamura 1985); la esterilización de líquidos (Rosenberg 1977); la esterilización del aire (Suzuki y col. 1985); la separación de aceites de las emulsiones de aceite en agua (Wolf 1983; Fang y col. 1989; Hudgins y Wolf 1989); el tratamiento de lodos de depuradora y aguas residuales (Kreuter 1977; Austin y Abson 1980), la recuperación de Hg a partir de desechos (Fujii 1986).

También se ha utilizado la acción de las microondas en la industria de los detergentes. La irradiación de los detergentes se emplea para evitar la aglomeración durante su almacenamiento (Konczak 1974), para eliminar constituyentes volátiles (Dugan y Welgemoed 1977), para determinar el contenido en agua de detergentes sólidos (Yamaguchi y col. 1977) o para determinar el contenido en sólidos de detergentes líquidos (Benz 1978).

En la actualidad el uso doméstico de los hornos de microondas se ha popularizado, y se emplean habitualmente para descongelar (Dall'Aglio y col. 1976), calentar y cocinar alimentos (Korschgen y col. 1976; Dehne y col. 1983; Datta 1990; Kobayashi y col. 1990).

La industria de la alimentación también emplea las microondas; así, se han descrito procesos de pasteurización y esterilización del azúcar (Dostal y col. 1986), cazabe (Cereda 1984), y salsas (Hiraide y col. 1987); en el procesamiento de alimentos; separación de grasas en la mantequilla (Belg 1981), fabricación del chocolate (Hachiya 1989) y descristalización de la miel (Nikic y col. 1989); y en la determinación de humedad y de grasa en carne y en aves de corral (Bostiam y col 1985; Collins y col. 1975, 1984).

1.1.2.- Los hornos de microondas como fuentes de calentamiento.

Cuando la radiación de microondas atraviesa una muestra, su energía es absorbida por la muestra con una velocidad que depende de su factor de disipación.

El factor de disipación ($\text{tag } \delta$) es el cociente entre el factor de pérdida dieléctrica de la muestra (ϵ''), y su constante dieléctrica (ϵ'); por lo que

$$\text{tag } \delta = \epsilon'' / \epsilon'$$

siendo la constante dieléctrica una medida de la capacidad de la muestra para obstruir el paso de las microondas y el factor de pérdida una medida de su capacidad para disipar dicha energía.

La disipación de la energía de las microondas en una muestra condiciona su penetración; dependiendo también este aspecto de la frecuencia de la radiación; de manera que la penetración es proporcional a la inversa de la raíz cuadrada de la frecuencia de las ondas.

La disipación de energía en una muestra es la causa de su calentamiento y básicamente se produce por dos mecanismos, conducción iónica y rotación dipolar; que en la mayoría de los casos tienen lugar conjuntamente.

La conducción iónica es la migración de los iones disueltos en el campo electromagnético aplicado, y supone una disipación de energía, en forma de calor, correspondiente a un valor de $i \cdot R^2$, debido a la resistencia al flujo de los iones.

La conducción iónica depende de la naturaleza y movilidad de los iones y de su concentración en la disolución. Además, la disipación de la radiación de microondas, por este mecanismo, aumenta al aumentar la temperatura, por lo que en la etapa final de calentamiento de muestras en disolución, éste es el mecanismo que controla los procesos de digestión.

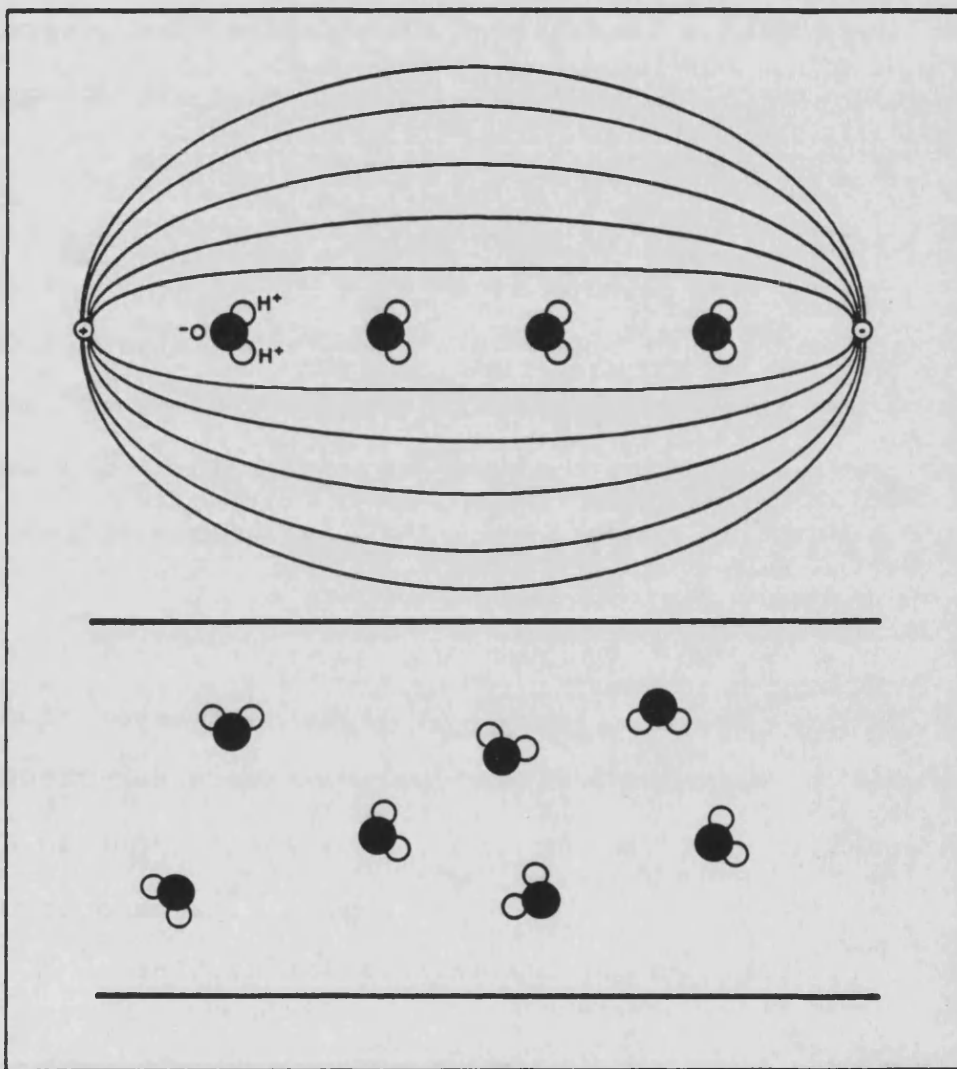
El otro mecanismo que provoca el calentamiento de las muestras en un horno de microondas es la rotación dipolar. Este proceso se debe al alineamiento, debido al campo eléctrico creado, de las moléculas que poseen un momento dipolar permanente o inducido.

Al aplicar la radiación de microondas a una muestra que contiene moléculas dipolares, éstas tienden a orientarse en el campo electromagnético creado, provocándose una organización del sistema que, al aumentar la temperatura, se desordena regresando a la situación inicial y se libera energía térmica. En la figura 2 se esquematiza este proceso de orientación-desorden.

Cuando se emplea una radiación de 2450 MHz la orientación de las moléculas se produce $4,9 \cdot 10^7$ veces por segundo y el resultado de este proceso de alineamiento-desorden es un rápido calentamiento de la muestra, que no se transmite desde una fuente externa hasta la muestra, sino que se genera en ella misma.

La eficacia del mecanismo de rotación dipolar, en cuanto al calentamiento de las muestras, depende de las características de las moléculas que la integran; en especial de su tiempo de relajación dieléctrica que a su vez depende de la temperatura y la viscosidad.

Figura 2: Comportamiento de las moléculas de agua frente a la radiación de microondas.



La contribución de la rotación dipolar al calentamiento de las muestras puede cuantificarse mediante el tiempo de relajación dieléctrica (τ) que es el tiempo que se necesita

para que las moléculas de la muestra regresen a su estado de desorden en un 63%, de manera que la máxima conversión de energía por ciclo de muchos materiales ocurre cuando la frecuencia angular de la energía de las microondas, expresada en radianes (ω), coincide con la inversa del tiempo de relajación; siendo la $\omega = 2\pi$ de la radiación.

En consecuencia, cuando la muestra presenta un valor de $1/\tau$ próximo a 2π se produce una elevada disipación de la energía, y en consecuencia un elevado rendimiento de los procesos de calentamiento. Por el contrario si $1/\tau$ es muy distinto de la frecuencia angular de las microondas se producirá una baja disipación de la energía.

El valor de $1/\tau$ para el agua es mayor que el correspondiente valor de ω para una radiación de 2450MHz y además aumenta al aumentar la temperatura, por lo que a temperaturas del orden de 100°C predominan los mecanismos de conducción iónica frente a los de rotación dipolar.

Hasta ahora solo hemos hablado del efecto de la frecuencia de las microondas sobre el calentamiento de las muestras y será preciso añadir que para una frecuencia dada (en general se emplea 2450MHz) el calentamiento de las muestras es proporcional a la potencia aplicada, de manera que el procedimiento habitual para establecer la potencia de un horno de microondas consiste en determinar el incremento

de temperatura, en grados fahrenheit, de una pinta de agua (470 g) calentados durante 1 minuto (Van Zante 1973), ya que

$$\Delta E = cm\Delta T$$

siendo ΔE la energía absorbida, c la capacidad calorífica del agua, m la masa de agua y ΔT el incremento de temperatura; de manera que,

$$P = \Delta T \cdot 18,2$$

y midiendo ΔT podemos controlar la potencia de la radiación de microondas aplicada.

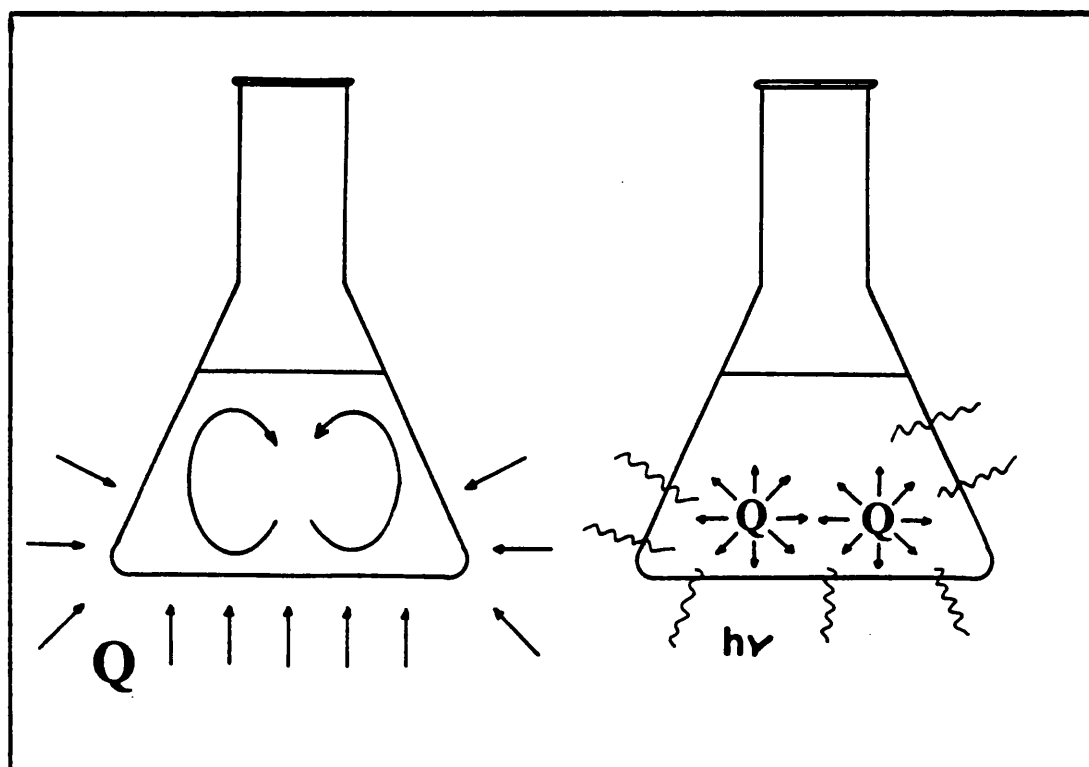
Este comportamiento, claramente proporcional entre calentamiento y potencia aplicada, es característico de moléculas muy polares, y así por ejemplo el n-propanol se comporta de manera análoga al agua, mientras que el sulfuro de carbono y el tetracloruro de carbono prácticamente no se calientan, y el palmitato de metilo presenta una curva de calentamiento en función del tiempo de exposición a la radiación que tiende a saturarse.

Como consecuencia de las consideraciones anteriores se deduce que, a diferencia de lo que ocurre con una estufa térmica, en que el calentamiento de las muestras se produce por convección, transmitiéndose la energía térmica desde el horno hasta las paredes del recipiente, y desde allí a las

moléculas de la muestra, en un horno de microondas el calor se genera en las moléculas polares que integran la muestra. La radiación traspasa el recipiente y se disipa térmicamente en la propia muestra, generando calor en todas las direcciones, sin que haya disipación en el recipiente ni en los lentos procesos de convección que rigen el calentamiento desde una fuente externa.

La figura 3 esquematiza este proceso de calentamiento en una estufa térmica y en un horno de microondas.

Figura 3: Comparación del calentamiento en una estufa térmica y en un horno de microondas.



Las conclusiones prácticas de los procesos inducidos en la dispersión de la energía de las microondas en un horno son: un calentamiento muy rápido y un consumo de energía mucho menor; por lo que es evidente que, por su rapidez y economía, los sistemas de microondas están destinados a reemplazar totalmente a los métodos tradicionales: estufas, placas calefactoras, digestores kjeldahl y muflas.

1.1.3.- Clasificación de los materiales en su interacción con las microondas.

En su interacción con las microondas los materiales se pueden clasificar en tres tipos según que absorban la radiación, calentándose, sean transparentes a la misma o reflejen las microondas.

Los metales pertenecen al último tipo de materiales, por lo que, en general, se desaconseja la utilización de recipientes metálicos en los hornos de microondas. Sin embargo, esta característica de los metales es muy importante y permite el diseño de los sistemas de guía de ondas y la protección de los usuarios frente a la radiación.

Los materiales transparentes son aquellos que dejan pasar las microondas a su través sin que se aprecie absorción alguna. Esta propiedad permite utilizarlos como aislantes,

que evitan la pérdida de calor de las muestras, y los hace particularmente adecuados para la construcción de los digestores.

Los recipientes de vidrio, cerámica y algunos plásticos son transparentes. Sin embargo, los recipientes de vidrio llegan a calentarse cuando se exponen durante tiempos largos a una elevada potencia. El teflón es el material más adecuado para construir digestores ya que es totalmente transparente a la radiación de microondas y tiene una gran estabilidad térmica soportando temperaturas en su interior de hasta 200°C, a diferencia del poliestireno que solo es estable por debajo de 70°C. Un material muy utilizado también es el policarbonato, que resiste muy bien los ácidos y tiene un punto de fusión de 135°C (Walkins 1983; Matthes y col. 1983).

Neas y Collins (1988) han recopilado una serie de datos de factores de disipación de distintos materiales frente a una radiación de 3000MHz y a una temperatura de aproximadamente 25°C. De dichos datos se deduce que frente a un valor de $\tan \delta$ para el agua de 157, el cuarzo es el material más transparente ($\tan \delta=0,06$), y el teflón ($\tan \delta=0,15$), polietileno ($\tan \delta=0,31$), poliestireno ($\tan \delta=0,33$) y algún tipo de cerámica ($\tan \delta=0,55$) pueden considerarse muy transparentes, mientras que el vidrio borosilicatado ($\tan \delta=1,06$), vidrio fosfatado ($\tan \delta=4,6$), el plexiglas ($\tan \delta=5,7$), el cloruro de polivinilo ($\tan \delta=5,5$) y el nylon

($\text{tag}\delta=12,8$) se pueden considerar también como transparentes, aunque disipen la energía de las microondas en una mayor extensión que los anteriores.

Los materiales compuestos por moléculas polares, y en especial los líquidos, son absorbentes de la radiación de microondas y pueden calentarse fácilmente en los hornos, siendo ésta la base para su empleo en la aceleración de reacciones en disolución y para la digestión de muestras.

En resumen, el diferente comportamiento de los materiales frente a las microondas debe tenerse en cuenta para la fabricación de los distintos componentes del horno de microondas y para la selección de los digestores y los ácidos en la disolución de las muestras.

1.1.4.- Componentes de un horno de microondas.

Los principales componentes de un horno de microondas son el magnetrón, la guía de ondas y la cavidad de microondas.

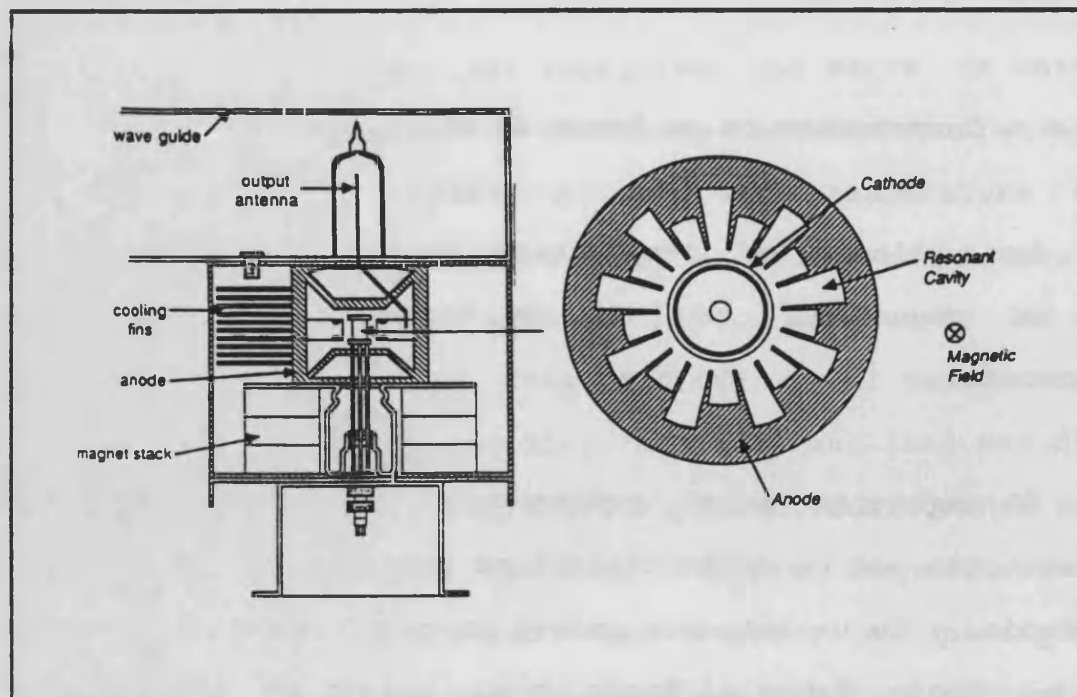
El magnetrón es el generador de las microondas y está constituido por un diodo cilíndrico provisto de un cátodo y un ánodo, y de un imán que genera un campo magnético alineado con el cátodo. Entre el ánodo y el cátodo se encuentra una



serie de cavidades resonantes acopladas; que provocan que, cuando se alcanza un potencial de unos miles de voltios en el diodo, los electrones liberados, resuenen bajo la influencia del campo magnético y hagan oscilar el magnetrón, provocando la emisión en una antena colocada bajo un tubo en el que se ha hecho el vacío.

La figura 4 muestra los componentes básicos del magnetrón Hitachi 2M170, en el que se pueden apreciar la disposición del cátodo, el ánodo, la antena y el imán.

Figura 4: Componentes del magnetrón (Neam y Collins 1966).



Los magnetrones utilizados en los hornos de microondas suelen tener una frecuencia de salida de 2450 MHz y proporcionan una energía electromagnética de 600w para una potencia eléctrica de entrada de 1200w.

Una vez generada la radiación, esta se focaliza hasta la cavidad de microondas mediante una guía de ondas.

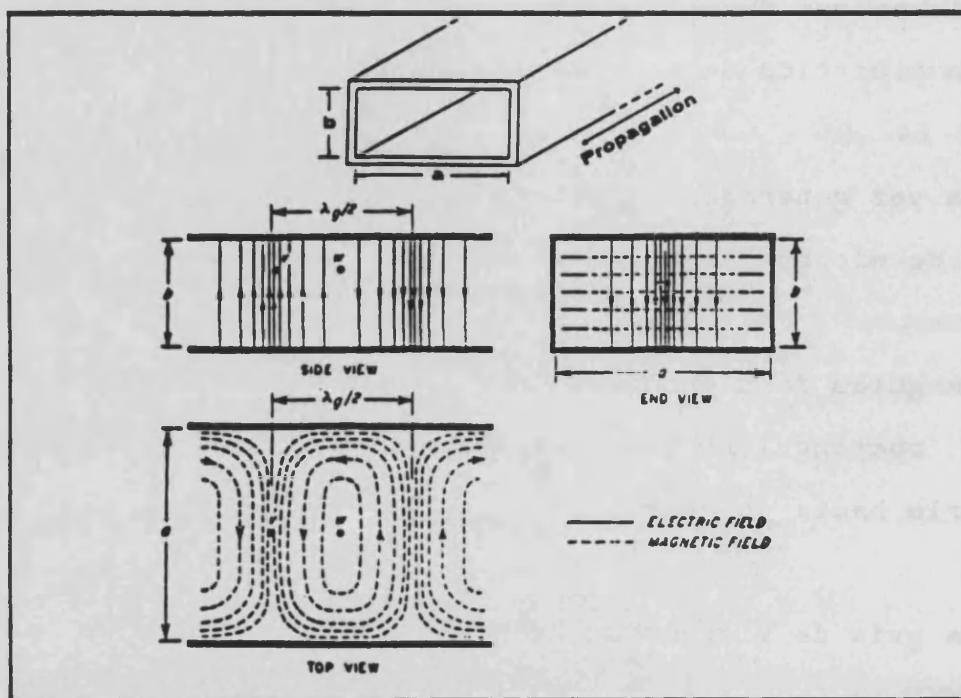
Las guías de microondas son conducciones metálicas de sección rectangular que permiten reflejar la radiación y orientarla hacia un objetivo.

Una guía de microondas de dimensiones a y b, como la que se indica en la figura 5, en la que la relación a/b es entre 2 y 2,5, es capaz de propagar una onda electromagnética de longitud de onda inferior a 2a. En la figura 5 se indica también la orientación relativa de los campos eléctricos y magnéticos, que constituyen la radiación en la guía de ondas.

Este modo de propagación tan solo es posible para ondas con $2a > \lambda > a$; existiendo otros modos de propagación más complejos para las demás radiaciones.

En la práctica, la radiación óptima para una guía es la que corresponde a un valor de 1,3a y en general tan solo se obtiene un buen rendimiento en el transporte de la radiación de λ comprendida entre 1,1a y 1,7a.

Figura 5: Esquema de una guía de ondas y orientación de los campos eléctricos y magnéticos relativos a la radiación en la misma (Ewing 1966).



En un microondas doméstico, la radiación del magnetrón es enfocada hacia la cavidad y en ella se distribuye creando caminos preferenciales que provocan puntos más calientes.

En los hornos de microondas desarrollados para el trabajo analítico se han utilizado dos estrategias; una semejante a la de los hornos domésticos desarrollada por la CEM Corporation y otra desarrollada por Prolabo que focaliza la radiación en la muestra y que es la base de los sistemas de microdigestión. En las figuras 6 y 7 se pueden ver los esquemas de ambos sistemas.

Figura 6: Esquema del horno de microondas de la CEM Corporation. (Neas y Collins 1988).

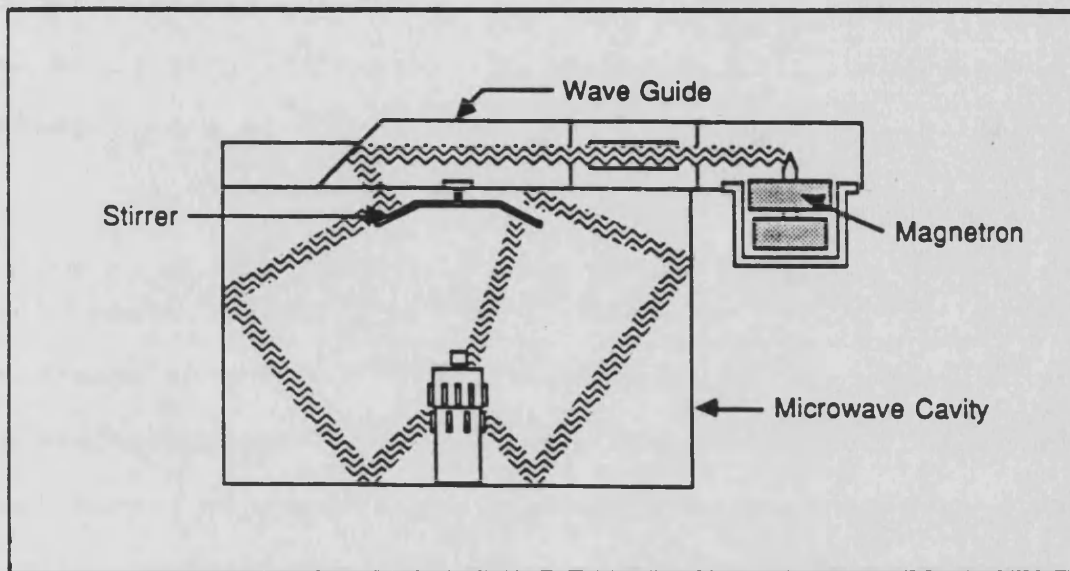
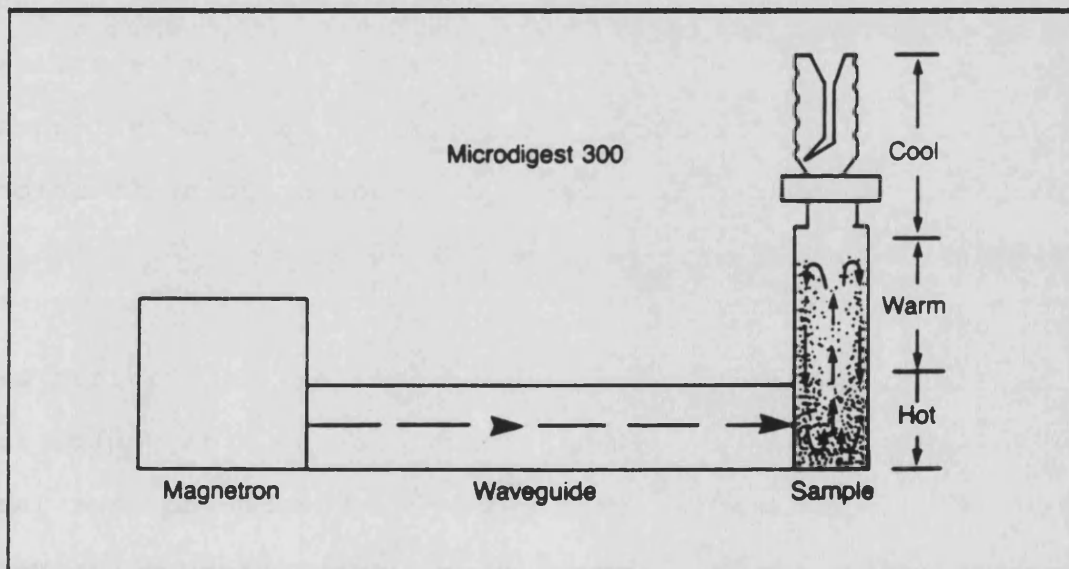


Figura 7: Esquema del horno de microondas de Prolabo (Grillo 1989).



La función de la guía de ondas es conducir la radiación desde el magnetrón hasta la cavidad. Sin embargo, cuando se trabaja durante períodos largos de tiempo a elevada potencia y con una pequeña carga de material absorbente, gran parte de la radiación que llega a la cavidad es reflejada y puede llegar hasta el magnetrón provocando su destrucción.

Para evitar la concentración de radiación reflejada, los hornos de microondas diseñados para la digestión de muestras suelen llevar un circulador terminal que emplea ferritas y campos magnéticos estáticos para orientar la radiación reflejada hacia una cámara en la que ésta se disipa.

La cavidad de microondas es el compartimento en que se introducen los recipientes y las muestras, y en el que se desarrollan los procesos de calentamiento y ataque. Suele ser una cavidad en forma de prisma de base rectangular con un volumen de 10 a 23 litros; excepto en los sistemas microdigestores de Prolabo en los que se emplean cavidades más pequeñas diseñadas al efecto de acoplar en su interior los digestores.

La distribución de las microondas en la cavidad se realiza siempre de la misma forma, lo que crea puntos de mayor densidad de irradiación y así hemos comprobado que las posiciones próximas al fondo de un horno Balay están más irradiadas que las zonas cercanas al centro y a la puerta.

Por ello, tanto en los hornos de cocina como en los diseñados para la digestión de muestras se emplean platos giratorios o agitadores colocados a la salida de la guía de ondas que permiten promediar la exposición de las muestras a la irradiación y, bien sea modificando la situación de las muestras, o alternando la orientación de las microondas, permitan un tratamiento uniforme de toda la carga.

Las paredes del horno de microondas son metálicas y facilitan la reflexión de la radiación. Cuando ésta interacciona con un material absorbente se produce su disipación, provocando el calentamiento del mismo.

En el trabajo de laboratorio, y en especial cuando se digieren muestras con ácidos, es preciso tomar precauciones para evitar el ataque de las paredes; para lo cual se han empleado sistemas de extracción de humos, recipientes cerrados, y una protección especial de las paredes consistente en un recubrimiento polimérico.

1.2.- Interés en Química Analítica.

La mayor efectividad de los hornos de microondas para producir el calentamiento de las muestras permite: realizar el secado, favorece la digestión con ácidos y acelera reacciones químicas que están controladas por una etapa térmica lenta.

De lo expuesto anteriormente sobre el fundamento de la interacción de la radiación de microondas con la materia se desprende que los sistemas químicos en los que el horno de microondas puede aportar ventajas sustanciales vienen determinadas por los siguientes aspectos:

- * Naturaleza polar de las muestras o del medio de reacción.
- * Procesos que requieran un calentamiento.
- * Procesos en los que los productos de reacción no se descompongan con el aumento de temperatura, lo que podría provocar su degradación por falta de un control estricto de las condiciones de reacción o digestión. Esto, sin embargo, no afecta a aquellos componentes que pueden desprenderse en forma gaseosa a temperaturas comprendidas entre 100 y 200°C pues podrían retenerse en el sistema de reacción utilizando un sistema hermético a presión.

El secado de los materiales resulta de gran interés para la preparación de muestras, y en este aspecto Hesek y Wilson (1974) y Beary (1988) ha realizado un estudio sistemático del secado de muestras inorgánicas y orgánicas.

Para compuestos inorgánicos, tales como las sales hidratadas, se obtienen muy buenos resultados para su secado en horno de microondas y así, un CuSO_4 con 5 moléculas de

agua de hidratación pierde un 28,75% de peso (el valor teórico sería 28,9%) en 25 minutos al 100% de potencia de un horno CEM AVC-80.

Por otra parte el $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ secado al 100% de potencia durante 6 minutos pierde el 47,2% de peso (el contenido teórico en agua es del 47%).

Estos resultados muestran dos aspectos del secado en horno de microondas: por un lado su adecuación a este tipo de muestras; ya que no se producen fenómenos de descomposición o de degradación y al final se obtienen valores coherentes, y por otra parte, evidencian que es preciso aplicar a cada tipo de muestra un tipo diferente de tratamiento para asegurar el secado completo; lo cual hace que el tiempo que se gana en su empleo en rutina deba invertirse previamente en el estudio de las condiciones.

En el secado de muestras de referencia de arcillas y rocas dolomíticas los resultados publicados en la bibliografía, con hornos de microondas y con estufa térmica, parecen presentar algunas diferencias, lo que desaconsejaría el empleo de los hornos de microondas para determinar el grado de humedad de muestras certificadas (Beary 1988).

No obstante, en la aplicación de las microondas para el secado de materiales inorgánicos cabe destacar su utilización

para el tratamiento de materiales radiactivos: secado de muestras hidratadas de UO_3 (Haas 1979), conversión de los nitratos de U y Pu en sus correspondientes óxidos (Matsumaru y col. 1982), incineración de materiales combustibles radiactivos (Gombert y col. 1982; Takusagawa y Masaki 1983), concentración (Matsumoto 1985) y solidificación (Genthner y col. 1988) de líquidos radiactivos.

También se han empleado en la deshidratación de zeolitas (Roussy y Chenot 1981; Roussy y col. 1983, 1984); en la conversión de hidróxidos de tierras raras en los correspondientes óxidos (Matsumoto y col. 1987); y en el secado de: arcillas, para su análisis por difracción de Rayos-X (McCallister 1986), sólidos (Collins y Gilman 1988), carbón (Jacobs 1984), fertilizantes, para la determinación de P_2O_5 (Melton y Hoover 1981), lodos, para la determinación de As (Wangy y col. 1983), muestras biológicas (Koh 1980) y muestras vegetales (Stephenson y Gaines 1975) para la determinación del contenido de elementos metálicos y N; secado de $BaSO_4$ (Tadros y Frazier 1990), de compuestos $CaCO_3$ - Fe_2O_3 (Worner y Standish 1989), y de materiales refractarios (Routschka y Bauling 1990); y también en la determinación del contenido de agua en arenas de fundición (Komatsu 1983), lodos (Bidlemaier 1976), y lignito (Weber y Praxmarer 1983); y del contenido de sólidos en suspensión en agua (Wang y col. 1982) y en lodos (Werink y col. 1981; Campbell y Crescuolo 1982).

La comparación de los hornos de microondas con las estufas de vacío para el secado de muestras orgánicas también proporciona diferencias significativas en muestras de leche en polvo y en muestras de carbón. Los resultados parecen indicar que en el secado de muestra orgánicas en horno de microondas puede provocar errores por exceso debido a la posible descomposición de las mismas (Beary 1988).

A pesar de ello, los hornos de microondas se han empleado en el secado, liofilización y pasteurización de productos farmacéuticos (Garbagnati 1985; Cliff 1986) y en la determinación del contenido de humedad en productos cárnicos (Hult 1981) y en productos lácteos (De Menzzi y Rogate 1981).

En consecuencia, los hornos de microondas pueden emplearse para realizar un rápido secado previo de las muestras, pero deben utilizarse con prudencia para fines cuantitativos de determinación del grado de humedad de las muestras.

Mayores posibilidades analíticas tienen otros campos que se tratarán en esta Tesis, tales como: la aceleración de reacciones en hornos de microondas, la digestión de muestras por vía húmeda y la calcinación de muestras en un horno-mufla de microondas.

2.- OBJETO DEL TRABAJO.

El propósito de esta Tesis es la puesta a punto de métodos analíticos, basados en el tratamiento de las muestras en horno de microondas, con el objeto de realizar aportaciones originales en tres campos:

- * La aceleración de reacciones de interés analítico, en horno de microondas, objeto de la Parte I, en la que se ha estudiado la hidrólisis de benzodiazepinas para obtener benzofenonas y la hidrólisis ácida de albúmina en sus correspondientes aminoácidos, determinando el grado de avance de las reacciones por espectrofotometría UV.

- * La digestión de muestras (lodos y catalizadores) por vía húmeda, en horno de microondas, y determinación de elementos minerales por espectrometría atómica, que se trata en la Parte II.

- * El diseño y puesta a punto de una mufla de microondas para la calcinación de muestras, empleada en la determinación de una serie de elementos minerales por espectrometría atómica en muestras vegetales, constituye el objeto de la Parte III.

3.- PARTE I:

**EMPLEO DEL HORNO DE MICROONDAS EN LA
ACELERACION DE REACCIONES ANALITICAS.
DETERMINACION DEL GRADO DE AVANCE DE LA
REACCION POR ESPECTROFOTOMETRIA UV.**

I.O. - Reacciones en hornos de microondas.

La principal ventaja del empleo en el laboratorio de los hornos de microondas es su gran eficiencia térmica, que permite un rápido calentamiento de las muestras y de las mezclas de digestión y por lo tanto, al igual que se favorecen procesos como el secado y la disolución de muestras, podrían acelerarse otros procesos que vinieran gobernados por una etapa térmica, siempre y cuando tuvieran lugar en un medio lo suficientemente polar como para que se produjera la absorción de la radiación de microondas por alguno de los dos mecanismos básicos: la rotación dipolar y la conducción iónica. En consecuencia, cualquier reacción entre dos compuestos que de lugar a un determinado producto; como por ejemplo:

Q



podría acelerarse y mejorar su rendimiento siempre y cuando el producto C fuera estable frente a la radiación de microondas y los compuestos A y B absorbieran la misma con cierta eficiencia.

En el fondo, la disolución y digestión de muestras, que es el aspecto más desarrollado en la literatura analítica, es una reacción heterogénea entre un ácido A y una muestra sólida B que produce la formación de especies solubles de la muestra C. Sin embargo, en este tipo de procesos lo que predomina es la descomposición de la matriz, su oxidación por los ácidos y el desplazamiento de las sales metálicas por los aniones de los ácidos empleados en el ataque, y hasta 1986 no se ha propuesto el empleo de los hornos de microondas para acelerar reacciones en el laboratorio; esto es, en procesos de síntesis en los que a partir de una mezcla reaccionante no solo se destruyan las estructuras, de una forma más o menos controlada, sino que se generen otras formas químicas estables.

Hasta el momento se han publicado pocos trabajos en los que se describe el empleo de los hornos de microondas para acelerar reacciones orgánicas.

Las reacciones que han sido estudiadas, entre otras son: la hidrólisis de benzamida a ácido benzoico, la oxidación del tolueno a ácido benzoico, la esterificación del ácido benzoico con diferentes alcoholes, la reacción de sustitución nucleofílica bimolecular entre el ion 4-ciano fenóxido y el cloruro de bencilo (Geyde y col. 1986), la reacción de Diels-Alder, la reacción de Claisen y las de tipo -eno (Giguere y col. 1986).

A continuación se discutirán algunas de las ventajas que ofrecen los hornos de microondas en estos procesos y se detallarán algunos aspectos particulares de los mismos, presentando especial atención a las condiciones de reacción, elección de los disolventes y los reactores, potencia de la radiación y tiempo de reacción.

1.0.1.- Comportamiento de los disolventes orgánicos en los hornos de microondas.

Ya hemos visto que son las moléculas polares las que mejor absorben la radiación de microondas y, probablemente, el hecho de que el agua sea una de las moléculas con mayor coeficiente de disipación de la energía de las microondas ha desanimado a muchos investigadores para tratar de llevar a cabo reacciones orgánicas en otros medios.

Sin embargo, algunos disolventes orgánicos pueden llegar a alcanzar rápidamente temperaturas muy altas en un horno de microondas. Gedye y col. (1988) han tratado muestras de 50mL de distintos disolventes durante 1 minuto en un horno de microondas convencional, utilizando una potencia de 560w y recipientes abiertos, comparando las temperaturas alcanzadas. Los compuestos menos polares prácticamente no se calientan, los éteres y las aminas terciarias apenas se calientan. Los

alcoholes con elevado peso molecular son malos absorbentes. En general sorprende que los alcoholes ligeros, los ésteres y algunos derivados halogenados alcancen temperaturas incluso superiores a las del agua. En particular la DMF, el butanol y el pentanol serían excelentes medios de reacción en vista a acelerar las reacciones en un horno de microondas.

Un estudio de la regresión entre el incremento de temperatura que experimentan en un horno de microondas pequeños volúmenes de diferentes disolventes y su constante dieléctrica ha revelado la existencia de un coeficiente de correlación lineal de 0,92; por lo que la constante dieléctrica de un disolvente puede considerarse un buen estimador de su capacidad para absorber la radiación de microondas.

Giguere y col. (1986) han realizado un estudio análogo de la velocidad de calentamiento de 1 g de diferentes disolventes (dimetilformamida, n-hexano, dietilenglicol, n-metilformamina, acetonitrilo, etanol, acetona y p-xileno) en tubos de vidrio cerrados, llegando a la conclusión de que todos estos disolventes alcanzan temperaturas superiores a los 150°C en menos de 4 minutos. Sin embargo, los recipientes están rodeados de un aislante de vermiculita (silicato anhidro de hierro, aluminio y magnesio) que tiene por finalidad absorber los gases en caso de explosión y los datos anteriores pueden tomarse solo a título indicativo; ya que el

calentamiento se debe principalmente a la convección desde la vermiculita hasta el tubo del disolvente. Si se prescinde de la capa de vermiculita el hexano alcanza, al cabo de 2 minutos, una temperatura estable de tan solo 56°C y el etilenglicol de 180°C al cabo de 4 minutos; por lo que los datos de Giguere deben considerarse tan solo, en la perspectiva de las ventajas que puede aportar el empleo de medios fuertemente absorbentes para favorecer por convección la aceleración de reacciones en medios escasamente absorbentes.

Además de la polaridad de las moléculas que reaccionan entre sí hay que tener en cuenta el medio en que se encuentran, y así, disoluciones diluidas de propanol en octano se calientan muy lentamente ya que el calor generado por las moléculas de propanol se disipa por convección en el disolvente apolar. No obstante, este efecto selectivo del calentamiento es una faceta muy interesante que aún no ha sido explicada convenientemente y de la que cabe esperar muchas sorpresas; ya que podría dar lugar a reacciones específicas entre grupos polares o entre moléculas de polaridad análoga en un medio de reacción apolar.

Por otra parte, un aspecto interesante del calentamiento es que la aceleración de reacciones homogéneas y heterogéneas es prácticamente idéntico.

Respecto a la elección del disolvente, es de destacar que el grupo de Gedye (1986, 1988) ha encontrado los mayores aumentos de velocidad en metanol, mientras que las reacciones en agua y en alcoholes de elevado punto de ebullición presentan una menor aceleración. En concreto, en la esterificación del ácido benzoico con una serie homóloga de alcoholes se obtuvo una relación inversa del aumento de velocidad con la temperatura de ebullición del alcohol.

1.0.2.- Variables experimentales en el control de las reacciones.

Además de la elección del disolvente, los parámetros que controlan la velocidad de calentamiento de los sistemas en un horno de microondas son la potencia aplicada, la cantidad de muestra y el volumen del reactor y son éstas las principales variables que habrá que controlar para obtener los máximos rendimientos de reacción en el menor tiempo posible.

La potencia aplicada modifica drásticamente la temperatura y la presión que alcanzan los disolventes orgánicos en los reactores a presión.

Como ejemplo se pueden citar los datos de Gedye y col. (1988) sobre la presión alcanzada por el 1-propanol en función del nivel de potencia aplicada, a partir de los

cuales se deduce que cuanto mayor es la potencia empleada, mayor es la presión que se alcanza y más rápidamente se obtiene.

Debido a la mayor eficacia en el calentamiento de la mezcla de reacción, al aumentar la potencia se obtiene, en la mayoría de los casos, una aceleración de las reacciones; así, la síntesis del n-propilbenzoato transcurre hasta un 41% con una velocidad 60 veces mayor en un horno de microondas que a reflujo, a una potencia de 560w, y con una velocidad 180 veces mayor cuando se aplica una potencia de 630w.

El volumen del reactor donde se lleva a cabo la reacción es otro parámetro a controlar ya que, para un mismo volumen de mezcla de reactivos, la presión que se alcance en el reactor va a depender de su volumen.

Empleando reactores de 50, 120 y 300mL de capacidad Geyde y col. (1988) estudiaron la reacción entre el ión 4-cianofenóxido y el cloruro de bencilo en metanol; tomando las mismas concentraciones y volúmenes de reactivos en todos los casos comprobaron que mientras en el reactor de 50mL se obtenía un 65% de rendimiento de la reacción en tan solo 35 segundos, se requería 1 minuto y 33 segundos empleando un volumen de 120mL y un tiempo de 3 minutos cuando se empleaba un volumen de 300mL; por lo que en comparación con la reacción clásica el factor de aceleración en un horno de

microondas se reducía de 1240 a 240 veces al aumentar el volumen. Este efecto cabe relacionarlo con el hecho de que la temperatura de ebullición del líquido es mayor cuanto más elevada es la presión.

Todo ello apuntaría a que el efecto de las microondas es fundamentalmente térmico y así, la síntesis de n-propilbenzoato en horno de microondas y en baño de aceite a 160°C tiene lugar con un rendimiento del 94% en solo 4 minutos en ambos casos.

El volumen de la mezcla de reacción es otro parámetro a tener en cuenta; ya que del mismo depende, para un volumen fijo del reactor, la presión que se alcanza en este.

Cuando el volumen de un disolvente, medido en un reactor de teflón y sometido a la radiación de microondas, es pequeño, la presión aumenta a medida que el volumen aumenta, alcanzándose un valor óptimo a partir del cual un aumento de volumen de disolvente no supone un calentamiento más rápido.

Si tratamos de obtener el máximo rendimiento de una reacción; para unas condiciones fijas de volumen de reactantes y de reactor, se deberán incrementar la potencia aplicada y el tiempo de digestión.

I.0.3.- Reacciones llevadas a cabo en hornos de microondas.

A continuación se comentan, brevemente, las principales reacciones llevadas a cabo en hornos de microondas, destacando las ventajas obtenidas por comparación con los sistemas convencionales de calentamiento.

I.0.3.1.- Reacciones de oxidación.

El tolueno se oxida a ácido benzoico por el permanganato en medio básico. La reacción se lleva a cabo a reflujo y en 25 minutos se obtiene un rendimiento del 40%. Geyde y col. (1988) obtienen el mismo rendimiento utilizando un horno de microondas aplicando una potencia de 560w durante 5 minutos.

I.0.3.2.- Reacciones de esterificación.

El ácido benzoico reacciona con los alcoholes en medio H_2SO_4 para dar los correspondientes ésteres. Estas reacciones proporcionan rendimientos muy altos, superiores al 75%, para un tiempo de reacción de varias horas que depende de la naturaleza del alcohol. Cuando las reacciones de esterificación se llevan a cabo en un horno de microondas, empleando una potencia de 560w durante 5 a 20 minutos se obtienen rendimientos del mismo orden (Geyde y col 1988).



La reacción en horno de microondas tiene un rendimiento máximo del 79% y a una temperatura de 134-137°C que no depende del alcohol utilizado y sí de la potencia aplicada. Cuanto más lentas y mayores son las limitaciones de temperatura en la reacción a reflujo mayor aceleración se obtiene empleando el horno de microondas; además, el estudio previo de la influencia de las variables experimentales, en especial de la potencia aplicada, permite acelerar aún más las reacciones.

1.0.3.3.- Reacciones S_N2 .

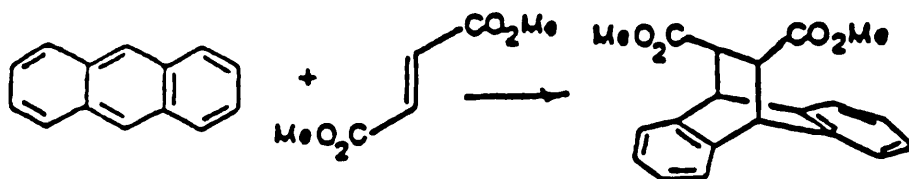
El ión cianofenóxido reacciona con el cloruro de bencilo, en medio metanol, mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular para formar el 4-cianofenilbenciléter. Esta reacción tiene lugar a reflujo con un rendimiento del 65% en 12 horas y del 89% en 16 horas. En un horno de microondas el tiempo se reduce a tan solo 35 segundos con un rendimiento del 65% y alcanzándose un rendimiento del 93% en 4 minutos empleando una potencia de 560w (Geyde y col. 1988).

I.0.3.4.- Reacción de Diels-Alder.

La reacción de Diels-Alder es uno de los métodos más valiosos para obtener alquenos cíclicos de 6 eslabones. Las reacciones no siempre son rápidas, y en ocasiones se llevan a cabo a reflujo requiriendo hasta 72 horas. Takano y col. (1989) han llevado a cabo la racemización de (-)-vincadiformina en DMF; y el grupo de Giguere (1986, 1987) ha estudiado algunas de estas reacciones y ha comparado los resultados obtenidos a reflujo con los encontrados en horno de microondas, empleando tubos de reacción protegidos por un revestimiento de vermiculita, que actúa a su vez como absorbente de la radiación de microondas. Los siguientes ejemplos dan una idea de la aceleración de las reacciones que se pueden obtener.

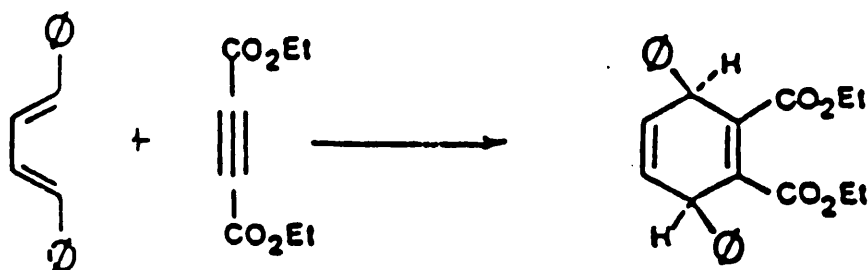
La reacción del antraceno con el anhídrido maléico transcurre en 10 minutos con un rendimiento del 90% cuando se emplea p-xileno como disolvente y una temperatura de 138°C. En horno de microondas la reacción alcanza un rendimiento del 92% en tan solo 3 minutos siendo la temperatura de 160-187°C.

La reacción



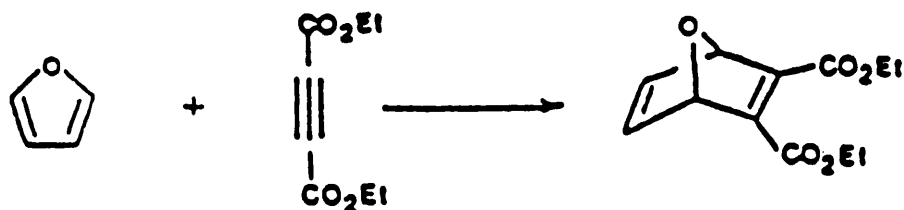
requiere 72 horas a 101°C en dioxano para obtener el 90% de rendimiento y en p-xileno se alcanza un 67% calentando durante 4 horas a 136°C. Por su parte, cuando se emplea un horno de microondas la reacción alcanza un rendimiento del 87% en solo 10 minutos, siendo la temperatura alcanzada de 325-361°C cuando se emplea p-xileno como disolvente.

La reacción



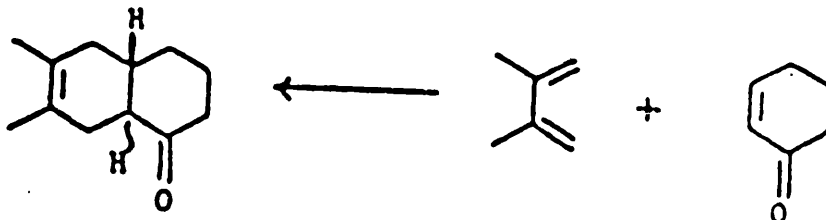
requiere 5 horas de calentamiento a 150°C para obtener un rendimiento del 81%, pero en horno de microondas se obtiene un rendimiento del 55% en tan solo 12 minutos alcanzándose una temperatura de 325-361°C.

La reacción



transcurre con un rendimiento del 68% calentando a 100°C durante 4 horas, mientras que en horno de microondas se obtiene un 66% en 10 minutos, alcanzándose temperaturas entre 325-361°C.

La reacción



requiere 72 horas para alcanzar un rendimiento del 89% a 195°C y se alcanza un rendimiento del 75% en dos horas. En horno de microondas se llega a alcanzar una temperatura de 400-425°C en 15 minutos y el rendimiento es del 25%.

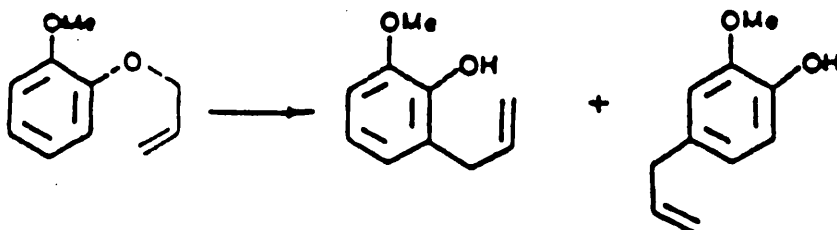
1.0.3.5.- Transposición de Claisen.

El éter alilfenílico se transpone a o-alilfenol con un rendimiento del 85% a 220°C para un tiempo de reacción de 6 horas; alcanzándose un rendimiento del 17% en 6 minutos cuando la temperatura es de 320°C. En un horno de microondas (Giguere y col. 1986) la reacción transcurre hasta un 21% cuando se somete al compuesto a una potencia de 600w durante 10 minutos. Utilizándose como disolvente dimetilformamida la reacción transcurre hasta el 92% en tan solo 6 minutos.

El empleo de un disolvente adecuado como medio de reacción parece ser un aspecto particularmente importante en las reacciones de transposición y no es de extrañar que el

rendimiento obtenido en DMF sea mejor; ya que este disolvente se calienta de manera más eficaz (Geyde y col. 1988).

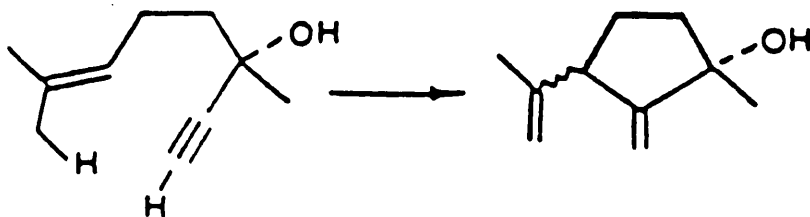
Otro ejemplo de reacción de transposición:



que transcurre en estufa térmica con un rendimiento del 71% a 265°C, para un tiempo de calentamiento de 45 minutos, y con un rendimiento del 92% en 12 minutos cuando la temperatura es de 320°C puede acelerarse en horno de microondas, habiéndose obtenido rendimientos de entre el 71 y el 87% en menos de 10 minutos en distintas condiciones; siendo de destacar que se alcanza un 87% en tan solo 90 segundos cuando se emplea como disolvente la *n*-metilformamida (Giguere y col. 1986). Estos últimos datos parecen indicar que más que la temperatura, es el disolvente el factor que controla el rendimiento de la reacción.

I.0.3.6.- Reacciones -eno.

Otro ejemplo de reacción de reagrupamiento intramolecular es la que se indica a continuación:



que transcurre a 180°C con un rendimiento del 60% al cabo de 12 horas y que en horno de microondas alcanza rendimientos del 62% en tan solo 15 minutos de exposición a una potencia de 600w habiéndose medido temperaturas entre 400 y 425°C en estas condiciones (Giguere y col. 1986).

I.0.3.7.- Reacciones de síntesis de derivados.

En el análisis cualitativo orgánico la caracterización de los compuestos se realiza por comparación de los productos de fusión de los compuestos de partida y de los derivados sintetizados a partir de ellos, con los datos tabulados para cada grupo funcional.

Gedye y col. (1988) han propuesto el empleo de un horno de microondas para la síntesis de 4-nitrobencilésteres a partir de ácidos carboxílicos, ácidos ariloxiacéticos a partir de los correspondientes fenoles, oximas a partir de aldehidos y cetonas, y ácidos carboxílicos a partir de ésteres. En la tabla I.1 se resumen las ventajas del empleo

de los hornos de microondas para la síntesis de estos derivados que se centra en la reducción en el tiempo de reacción, desde una hora hasta 2 minutos, manteniéndose prácticamente constante el rendimiento de las reacciones.

Tabla I.1: Características del empleo de los hornos de microondas para la síntesis de derivados.

Compuesto	Derivado	Tiempo reacción		R(%)	
		reflujo	NO	reflujo	NO
Acido cinámico	4-nitrobencilester	1.5h	120s	26	39
2-naftol	Acido ariloxiacético	1 h	120s	14	13
Benzoato de metilo	Acido carboxílico	1 h	150s	95	84
Benzofenona	Oxima	2 h	120s	68	71

Las reacciones anteriores se realizan en agua y en medio básico (para la síntesis de 4-nitrobencilester, el ácido ariloxacético y los ácidos carboxílicos) y en medio piridina-etanol para las oximas.

I.0.3.8.- Otras reacciones de síntesis.

Es en este tipo de reacciones donde ha habido un salto importante en la aparición de trabajos publicados durante los últimos años. De todos ellos destacan: la síntesis de polipéptidos (Harada y col. 1986; Yanagawa y col. 1990), síntesis de fármacos (Linders y col. 1988) y radiofármacos (Hwang y col. 1987), síntesis de heterociclos (Bose y col. 1990) y síntesis de compuestos organometálicos (Ali y col. 1989, Baghurst y col. 1989; Baghurst y Mingos 1990; Baghurst y col. 1990).

También han aparecido en la bibliografía procedimientos de síntesis en seco; es decir, se absorben los reactivos sobre un soporte inorgánico y este se irradia con microondas. Así se han sintetizado indoles (Villemín y col. 1989), se han llevado a cabo alquilaciones (Bram y col. 1990; Villemín y Alloum 1990) e isomerizaciones (Ben-Alloum y col. 1989).

Las últimas tendencias se centran en la realización de reacciones de síntesis en hornos de microondas mediante inyección en flujo continuo. Chen y col. (1990) han propuesto la síntesis, a escala preparativa, mediante cinco tipos de reacciones diferentes: esterificación del ácido p-hidroxibenzoico con metanol y 1-butanol, racemización de aminoácidos ópticamente puros en ácido acético, hidrólisis ácida de sucrosa en glucosa y fructosa, reacción S_N2 del

fenóxido con cloruro de bencilo y, la ciclación del 1,4-butanodiol y del dietilenglicol.

I.0.3.9.- Reacciones de hidrólisis.

La benzamida se hidroliza a ácido benzoico en medio sulfúrico con un rendimiento del 90% tras 1 hora de calentamiento a reflujo, mientras que en horno de microondas se alcanza el 99% en tan solo 10 minutos utilizando una potencia de 560w (Geyde y col. 1986,1988).

En un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, se llevó a cabo la hidrólisis de diacepan a 1-metilaminoclorobenzofenona (de la Guardia y col. 1989c), consiguiéndose, en tan solo 5 minutos y empleando una potencia de 560w, que la reacción fuera completa, con la consiguiente mejora respecto a otros métodos en reactores abiertos (Lafargue y col. 1971) o a presión (de la Guardia y col. 1989ba).

En los últimos años también se han empleado las microondas en la preparación de muestras para el análisis aminoácidos. A este respecto se ha realizado la hidrólisis de polipéptidos y de proteínas (Chen y col. 1987; Yu y col. 1988; Chiou y Wang 1989; Pecavar y col. 1990; Woodward y col. 1990).

Otros procesos de hidrólisis llevados a cabo en hornos de microondas para el análisis de metabolitos primarios incluyen el tratamiento de triglicéridos (Lie y col. 1988), de almidón (Straathot y col. 1988), de resinas (Yu y col. 1988), racemización de aminoácidos (Chen y col. 1989), y la hidrólisis de nucleótidos (Sun y col. 1988; Jahngen y col. 1991).

En general, se puede concluir que el empleo de los hornos de microondas para la aceleración de reacciones es un tema relativamente reciente, cuyo interés va en aumento y en el que todavía son necesarios muchos estudios para establecer con claridad la influencia de las condiciones experimentales sobre los procesos de reacción y desarrollar nuevas aplicaciones.

**I.1- HIDROLISIS DE BENZODIACEPINAS EN
HORNO DE MICROONDAS.**

I.1.1.- Objetivo.

En esta parte de la tesis se ha desarrollado un método para realizar la hidrólisis de una serie de benzodiazepinas a sus correspondientes benzofenonas, de una forma rápida y cuantitativa.

Se ha escogido esta reacción porque es de gran interés en el análisis farmacéutico y clínico, especialmente por su utilización como etapa previa en la derivatización de estos fármacos para su análisis cromatográfico.

El procedimiento utilizado para el seguimiento de la reacción ha sido la determinación del porcentaje de benzofenona formada mediante espectrofotometría UV, utilizando el método isodiferencial para conseguir eliminar la interferencia de la benzodiazepina no hidrolizada.

I.1.2.- Introducción

Las benzodiazepinas son sustancias sintéticas obtenidas a partir de las correspondientes benzofenonas por reacción con aminas o hidroxilaminas. Se caracterizan por presentar un anillo bencénico unido a un heterociclo de siete miembros con dos átomos de nitrógeno. La posición relativa de estos dos

átomos de nitrógeno en el seno del heterociclo, así como la posición del núcleo bencénico en relación a éste, permite distinguir varias familias, de entre las cuales las 1,4-benzodiazepinas son las más utilizadas.

Las benzodiazepinas son uno de los grupos de fármacos más extensamente utilizados en la actualidad. El interés terapéutico de estos compuestos justifica las numerosas investigaciones que se llevan a cabo para establecer métodos analíticos, tanto para el control de la pureza de los preparados farmacéuticos como de los procesos de absorción-eliminación en el organismo humano.

La hidrólisis en medio ácido de las benzodiazepinas para formar sus correspondientes benzofenonas se ha venido utilizando como paso previo a la determinación cromatográfica de estos psicofármacos en matrices biológicas (Lafargue y col. 1971; Schutz 1982).

La hidrólisis de las benzodiazepinas puede llevarse a cabo con ácido clorhídrico 6M a temperaturas elevadas. Se ha propuesto un procedimiento sencillo para obtener 5-cloro-2-metilamino benzofenona, que implica el tratamiento del diazepam en tubos sellados con HCl 6M durante 1 hora a 100°C en un baño de agua (de Silva y col. 1964).

En un estudio previo habíamos utilizado un horno de microondas doméstico para acelerar la hidrólisis ácida del diacepan (de la Guardia y col. 1989c), lo que ha servido como base para el desarrollo del presente estudio.

La espectrofotometría de absorción molecular en la zona UV/V ha sido durante muchos años la técnica más ampliamente utilizada en el análisis de compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica. El enfrentamiento con nuevos problemas más complejos, como el análisis multicomponente ha estimulado la introducción de las derivadas que suponen una ampliación de su eficacia tanto en la resolución de mezclas como en la eliminación de interferencias de matriz.

La idea de diferenciar las curvas experimentales mediante el empleo de derivadas fue sugerida por Lord Rutherford (Dymond 1923) en los años 20 para detectar discontinuidades en los potenciales de excitación de gases en espectroscopía de masas. Su aplicación a otras técnicas como la polarografía (Peronne y Mueller 1965), análisis térmico (Erdey y col. 1956), espectroscopía infrarroja (Collier y Singleton 1956), raman (Hammond y Price 1953), y ultravioleta visible (Morrison 1953; Giesey y French 1955) no se dió hasta los años 50 cuando se incorporaron la diferenciación electrónica y los microcomputadores a la instrumentación analítica. Desde entonces han sido numerosos los artículos y revisiones que han aparecido en la literatura especializada

sobre los aspectos teóricos relacionados con su empleo en diversas técnicas (Fell 1980; Levillain y Pompeydie 1986; Sanchez-Rojas y col. 1988) y sobre el diseño de instrumentación para la obtención de las derivadas (Overend 1967).

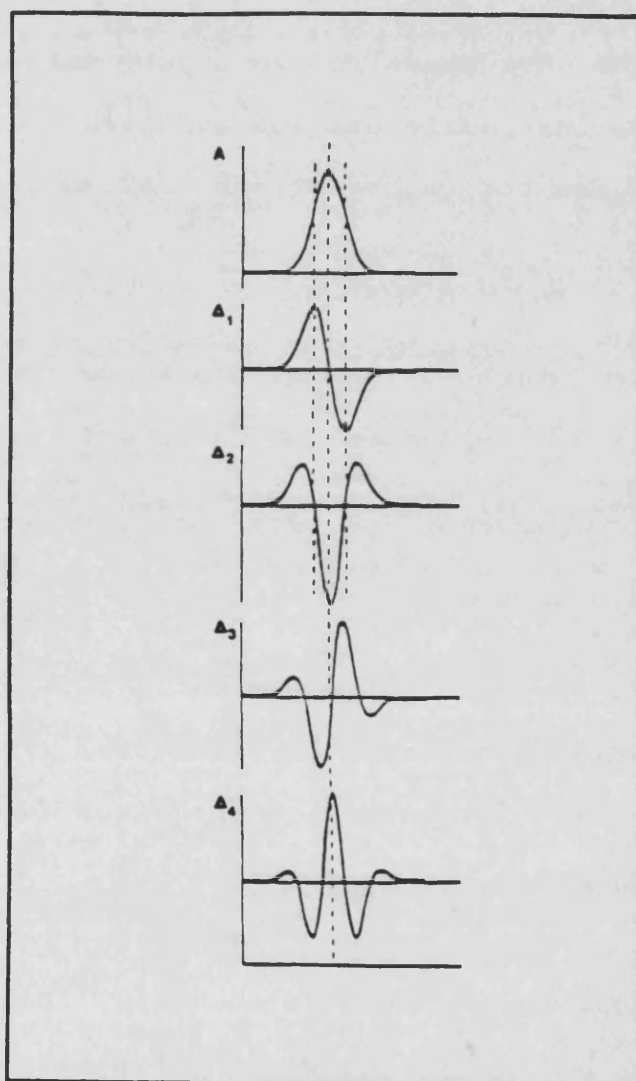
Un espectro de absorción en el UV/V resulta del solapamiento de numerosas bandas ligadas a las transiciones de energía electrónica, vibracional y rotacional, dando lugar a una banda ancha. La ecuación que define a esta curva es muy compleja, resultando difícil calcular sus derivadas. Por ello los estudios para determinar las propiedades de estos espectros se realizan sobre curvas teóricas gaussianas o lorencianas (Fell 1980; Morrey 1968).

En la figura I.1 están representadas las cuatro primeras derivadas de una curva gaussiana.

La primera derivada representa la pendiente de la recta tangente al espectro de orden cero, se anula en el máximo, es positiva en el intervalo donde la absorbancia crece y negativa en el intervalo en que decrece.

El espectro de segundo orden representa la pendiente de la tangente a la curva diferencial de primer orden. Se caracteriza por sus dos puntos de anulación, correspondientes al máximo y mínimo de la curva precedente, que están separados por un mínimo.

Figura I.1: Espectros de derivadas de una banda de absorción gaussiana.



De manera análoga, por recurrencia, se pueden estudiar las derivadas sucesivas constatando que:

- La curva diferencial de orden n se anula n veces, delimitando $n+1$ bandas alternativamente positivas y negativas.

- El máximo del espectro de orden cero se corresponde con un punto de anulación en los espectros de derivadas de orden impar y con un valor extremo (máximo o mínimo) en los espectros de derivadas de orden par.

La espectrofotometría ultravioleta de derivadas se ha utilizado para la eliminación de interferencias de matriz (Fell y col. 1981; Salvador y col. 1990) y también para la resolución de mezclas de sustancias con espectros anchos y próximos entre sí (Levillain y Pompeydie 1986; Sanchez-Rojas y col. 1988)., y se ha propuesto en la bibliografía para el análisis de benzodiazepinas por nuestro grupo de trabajo (Randez-Gil y col. en prensa), y por otros autores (Martinez y Gimenez 1981; Duhau y col. 1989).

El tratamiento isodiferencial, basado en la cuantificación de uno de los componentes de una mezcla en el punto de anulación, en primera o segunda derivada, del otro componente, es la aproximación más prometedora para analizar un compuesto en presencia de una concentración desconocida de

otro, que posee un espectro de absorción similar (García-Sánchez y col. 1987; de la Guardia y col. 1989b), también denominado "zero crossing" (Mariatud y col. 1988; Morelli 1988), el cual consiste en obtener el espectro de derivadas de los patrones de los dos compuestos estudiados y determinar el punto isodiferencial, en el que $dA/d\lambda$ de un compuesto (A) es igual a cero independientemente de su concentración. A esta longitud de onda se establece la ecuación de calibrado para el segundo compuesto (B), determinándose los valores de $dA/d\lambda$ de las muestras e interpolándose en la recta de calibrado. Análogamente se procede para la determinación del otro compuesto (A).

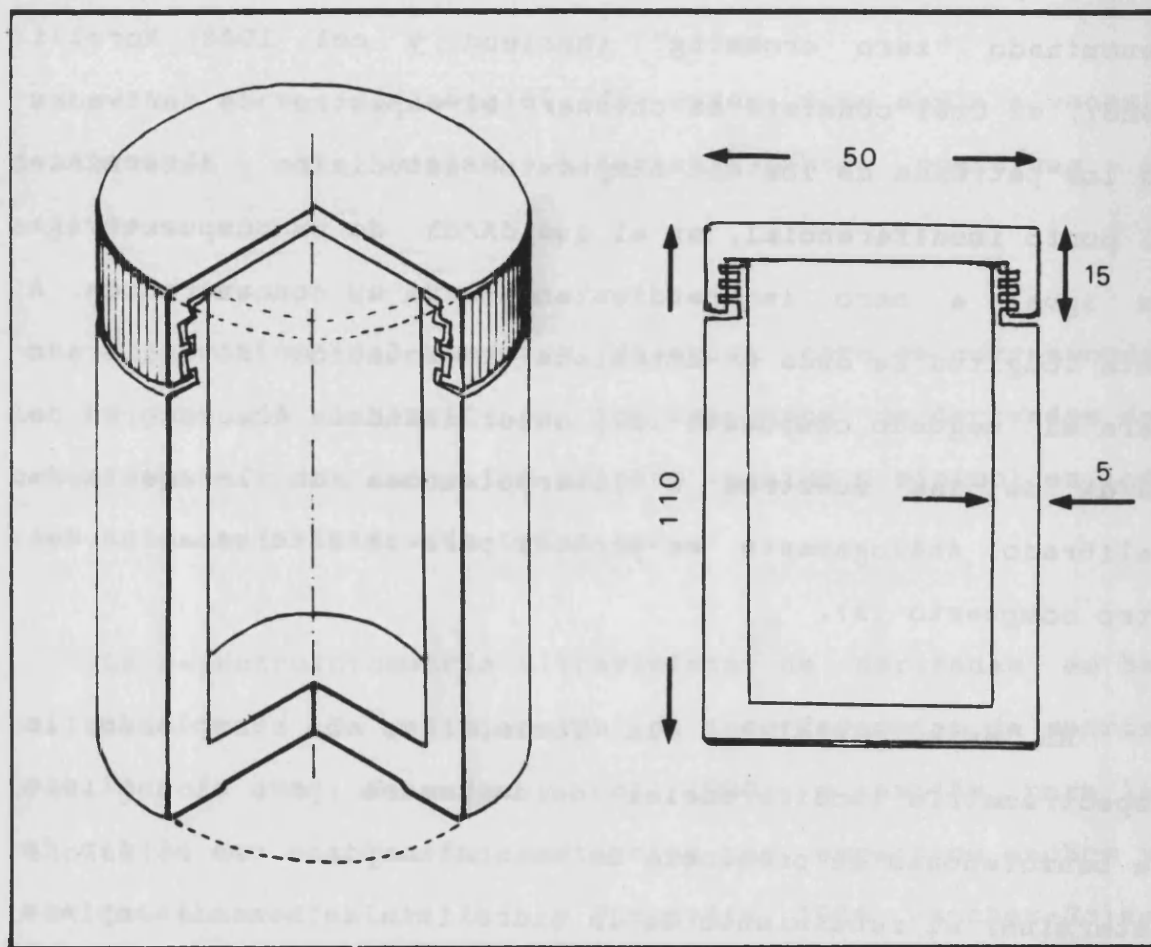
En esta parte de la Tesis, se ha empleado la espectrometría isodiferencial de derivadas para el análisis de benzofenonas en presencia de benzodiazepinas con el fin de determinar el rendimiento de la hidrólisis de benzodiazepinas en un horno de microondas.

I.1.3.- Parte experimental.

I.1.3.1.- Aparatos y reactivos.

Para llevar a cabo la hidrólisis de las benzodiazepinas se ha empleado un horno de microondas doméstico Balay, modelo BHM-100, con una frecuencia de magnetrón de 2450 MHz y una potencia máxima de 650W, y reactores de teflón cerrados herméticamente, con un volumen de 100 mL.

Figura 1.2: Reactor de teflón utilizado en el tratamiento de muestras en horno de microondas diseñado en nuestro departamento.



Debido a que la distribución de potencia dentro de la cavidad del horno de microondas no es homogénea, es necesario controlar la posición en que se colocan los reactores para posibilitar un estudio sistemático de los factores que influyen en la hidrólisis de la proteína, por lo que se ha estudiado previamente la distribución de la radiación de microondas en la cavidad del horno.

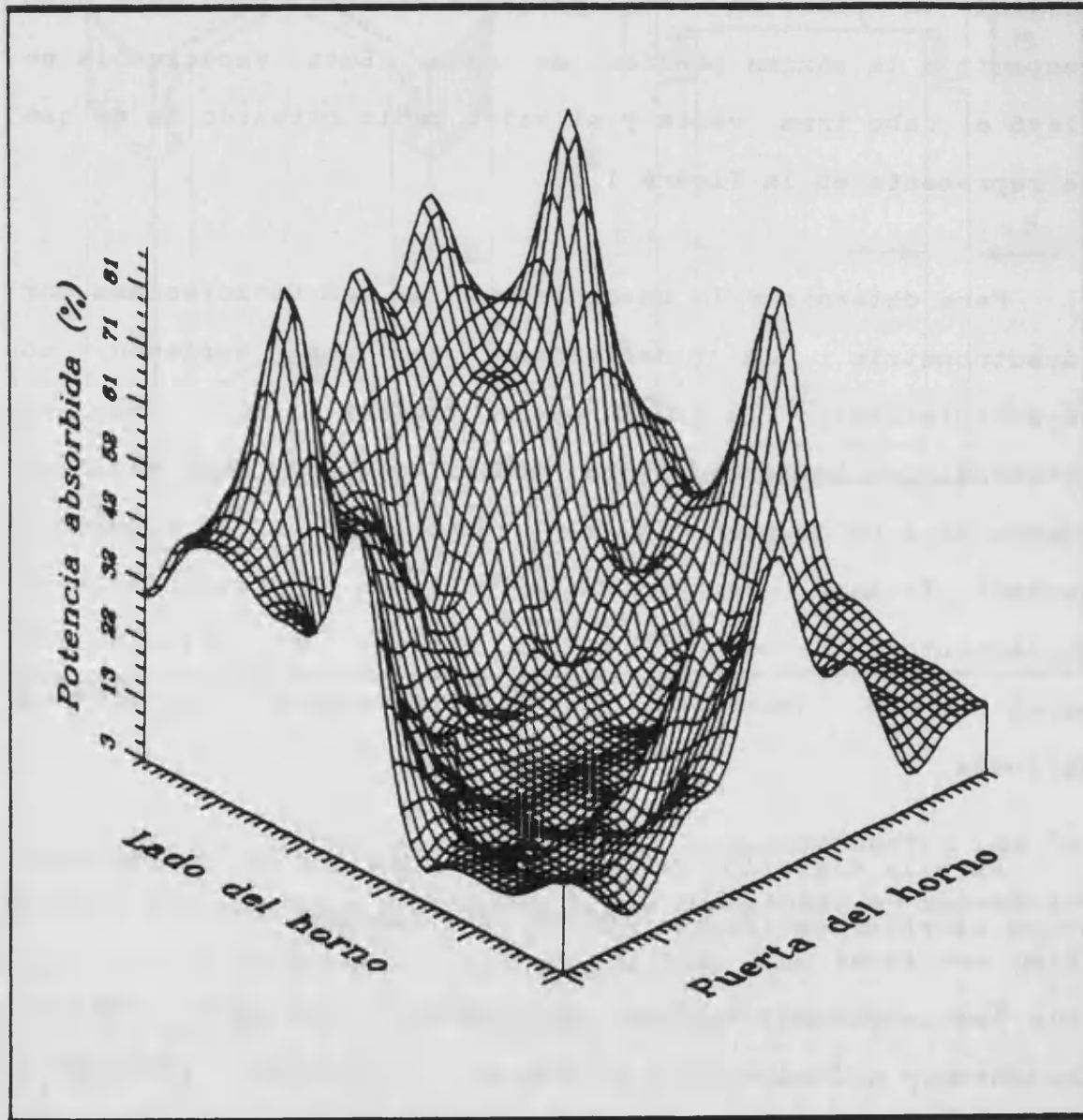
Para ello, el procedimiento seguido fué: introducir simultáneamente 64 frascos de plástico de 100 mL de capacidad conteniendo 25 g de agua cada uno, de manera que ocupen toda la cavidad del horno en una distribución de 8x8. Calentar durante 10 minutos al 100% de potencia y determinar la pérdida de peso en cada posición, normalizando este dato respecto a la máxima pérdida de agua. Esta experiencia se llevó a cabo tres veces y el valor medio obtenido es el que se representa en la figura I.3.

Para determinar la concentración de las benzofenonas por espectrometría de derivadas se ha empleado un espectrofotómetro ultravioleta visible de red de fotodiodos Hewlett-Packard 8452A, equipado con celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y acoplado a un ordenador Hewlett Packard Vectra ES/12 para el almacenamiento y tratamiento de datos, con en el que se han obtenido los espectros de absorción y, matemáticamente, su primera derivada.

Para la digestión ácida de las muestras se ha empleado ácido clorhídrico (Panreac 37,5%, $d=1.19\text{g/mL}$).

Las benzodiazepinas utilizadas, oxacepan (Madaus Carafarm), y clonacepan, loracepan, nitracepan, pracepan y cloracepato dipotásico (suministradas por el Departamento de Bromatología de la Universidad de Valencia) fueron empleadas sin ningún tratamiento previo de purificación.

Figura I.3: Distribución de potencia en el horno de microondas.



Se prepararon disoluciones "stock" en HCl 6M para cada una de las benzodiazepinas consideradas con una concentración del orden de 10^{-4} M, y a partir de ellas se prepararon series de varias disoluciones patrón, en un intervalo de concentraciones de $0.9 \cdot 10^{-5}$ M a $6 \cdot 10^{-5}$ M, en HCl 6M. En todos los casos, las disoluciones de benzodiazepinas se prepararon diariamente para evitar su posible descomposición.

Las disoluciones patrón de las benzofenonas se obtuvieron por hidrólisis térmica de las respectivas benzodiazepinas en tubos de vidrio pyrex con tapones herméticamente cerrados siguiendo el procedimiento recomendado por de Silva y col. (1964).

I.1.3.2.- Procedimiento general.

I.1.3.2.1.- Estudio de la hidrólisis en horno de microondas.

Se introducen 4 mL de la disolución de benzodiazepina en HCl 6M en un reactor de teflón de 100 mL con rosca hermética. Se cierra el reactor y se introduce dentro del horno de microondas empleando distintos valores de potencia y tiempo. Se deja enfriar, se abre el reactor y se diluye el producto de hidrólisis a 25 mL con agua destilada.

I.1.3.2.2.- Determinación espectrofotométrica de benzofenonas en presencia de benzodiazepinas.

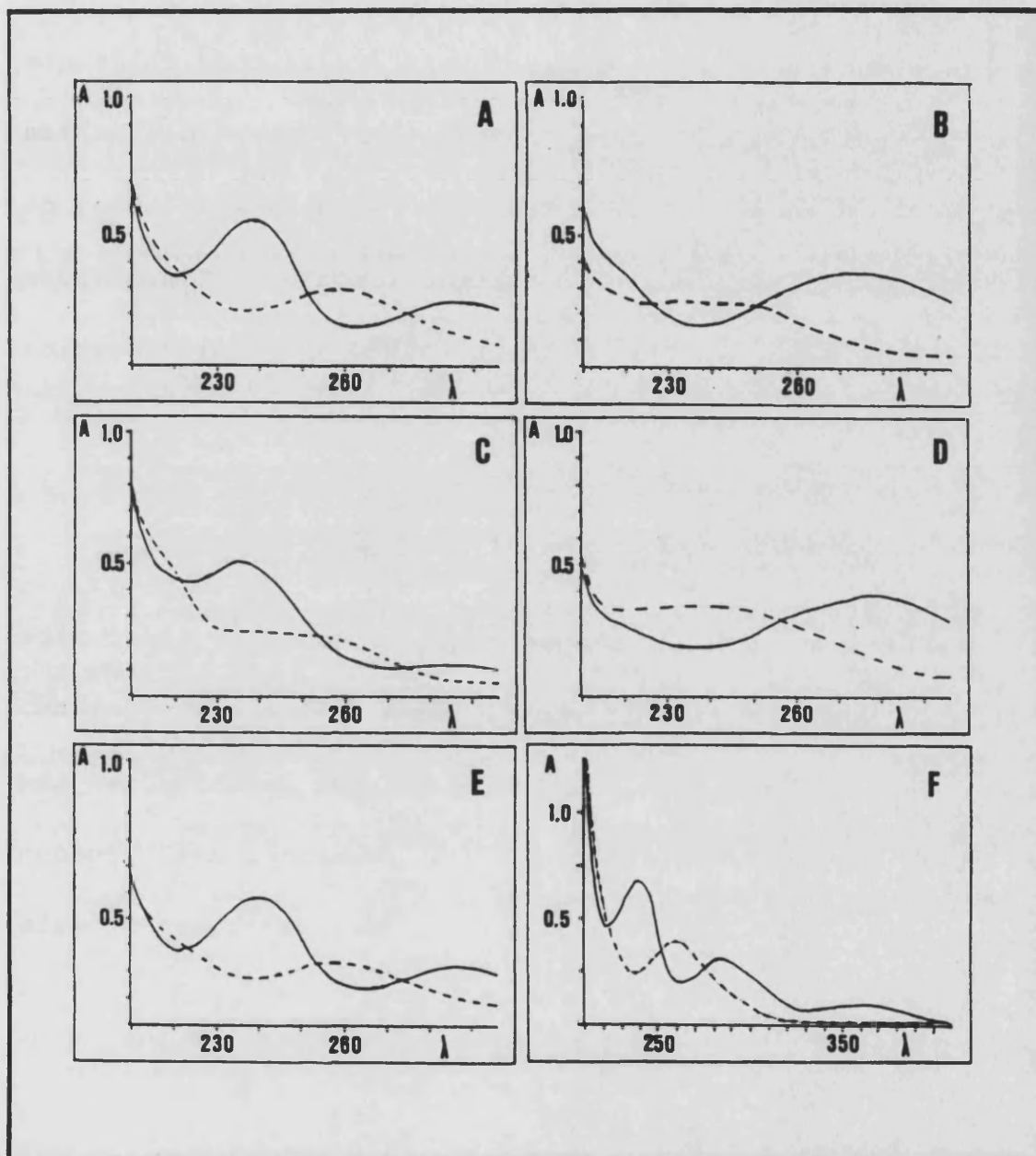
Para cada benzodiazepina, se registran los espectros de absorción de las disoluciones patrón y de los patrones de su correspondiente benzofenona en el intervalo desde 210 a 290 nm y se establecen las longitudes de onda en las que las señales de la primera derivada sean cero para cada benzodiazepina. En estos valores de longitud de onda se establece la ecuación de calibrado para las benzofenonas y también en dichos valores de λ se miden las señales de las muestras, interpolándolas en los calibrados para obtener la concentración de benzofenona en cada caso.

I.1.4.- Resultados y discusión.

I.1.4.1.- Uso de las derivadas en la determinación de benzofenonas en presencia de benzodiazepinas.

Como puede verse en las figura I.4 (A-E), todas las benzodiazepinas estudiadas y sus respectivas benzofenonas proporcionan espectros con bandas de absorción muy próximas y por ello es difícil determinar la concentración de benzofenona en presencia de benzodiazepina, situación que se presenta en los casos de hidrólisis parcial.

Figura 1.4: Espectros de absorción ultravioleta de distintas benzodiazepinas (—) y sus respectivas benzofenonas (---).

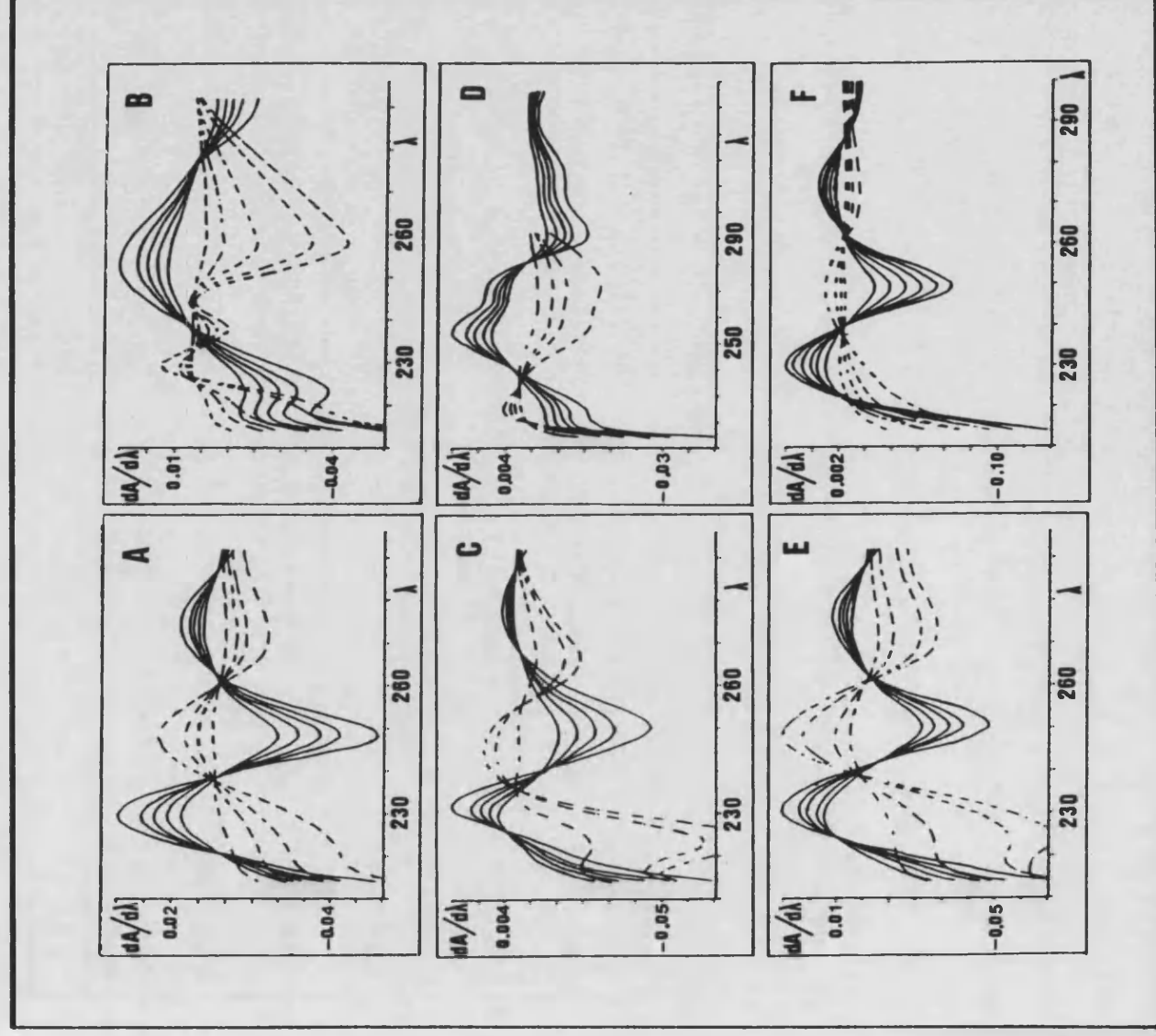


- A: Oxacepan y 2-amino-5-clorobenzofenona.
 B: Clonacepan y 2-amino-5-nitro-2'-clorobenzofenona.
 C: Loracepan y 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.
 D: Nitracepan y 2-amino-5-nitrobenzofenona.
 E: Pracepan y 2-ciclopropil-metilamino-5-clorobenzofenona.
 F: Clorazepato potásico y 2-amino-5-clorobenzofenona.

La derivada de primer orden de los espectros de las benzodiazepinas presenta varias longitudes de onda en la que $dA/d\lambda$ se anula, lo cual corresponde a una absorbancia máxima o mínima en el espectro de orden cero. A estas longitudes de onda puede determinarse la concentración de benzofenona independientemente de la concentración de benzodiazepina presente.

Las figuras I.5 (A-E) permiten localizar los puntos isodiferenciales para cada uno de los sistemas considerados, y la tabla I.2 resume las condiciones experimentales en las que las benzodiazepinas y las benzofenonas pueden determinarse sin interferencias mutuas utilizando este tratamiento.

Figura 2: Espectros de la derivada de primer orden de las disoluciones patrón de benzodiacepinas (—) y las correspondientes benzofenonas (---).



- A:** Oxacepan y 2-amino-5-clorobenzofenona.
B: Cionacepan y 2-amino-5-nitro-2'-clorobenzofenona.
C: Loracepan y 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.
D: Nitracepan y 2-amino-5-nitrobenzofenona.
E: Pracepan y 2-ciclopropil-metilamino-5-clorobenzofenona.
F: Clorazepato potásico y 2-amino-5-clorobenzofenona.

Tabla I.2: Condiciones experimentales para el análisis de benzodiazepinas y benzofenonas en mezclas de ambos compuestos.

Benzodiazepina	λ /nm	Benzofenona	λ /nm
Oxacepan	238, 259	2-amino-5-clorobenzofenona.	221, 239 263, 266
Clonacepan	226, 234 224	2-amino-5-nitro-2'-clorobenzofenona.	236, 276
Loracepan	236, 256 264, 268	2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.	226, 240
Nitracepan	220, 234	2-amino-5-nitrobenzofenona.	240, 260
Pracepan	239, 260 264, 267	2-ciclopropil-metilamino-5-clorobenzofenona.	223, 241
Clorazepato potásico	238, 260	2-amino-5-clorobenzofenona	222, 240 263, 266

I.1.4.2.- Parámetros analíticos de la determinación de benzofenonas.

Las rectas de calibrado típicas, obtenidas en los puntos isodiferenciales para cada una de las benzofenonas consideradas, se indican en la tabla I.3 así como los correspondientes coeficientes de regresión y los valores de sensibilidad y límites de detección. A partir de estos datos se puede concluir que las benzofenonas se pueden determinar en presencia de benzodiazepinas a un nivel de concentración del orden de $10^{-8}M$.

Tabla I.3: Parámetros analíticos de la determinación de benzofenonas por espectrofotometría ultravioleta en derivadas.

Benzofenona	λ /nm	Recta de calibrado	r	Sensibilidad ^a	LOD ^b
2-amino-5-clorobenzofenona.	221	-1140,62C+7,61 10 ⁻³	-0,996	1,21 10 ⁻³	4,66
2-amino-5-nitro-2'-clorobenzofenona.	276	-239,83C+9,14 10 ⁻⁴	-0,995	1,76 10 ⁻⁴	2,19
2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.	226	-1669,60C+1,20 10 ⁻²	-0,9997	4,40 10 ⁻⁴	0,79
2-amino-5-nitrobenzofenona.	280	-290,02C+2,15 10 ⁻⁴	-0,999	1,80 10 ⁻⁴	1,86
2-ciclopropil-metilamino-5-clorobenzofenona.	223	-812,37C+1,81 10 ⁻³	-0,99992	1,26 10 ⁻³	4,66
2-amino-5-clorobenzofenona.	222	-911,05C+3,61 10 ⁻³	-0,9997	6,26 10 ⁻⁴	2,06

a: u.a. M⁻¹.
b: 10⁻⁶M

I.1.4.3.- Efecto de los parámetros de digestión

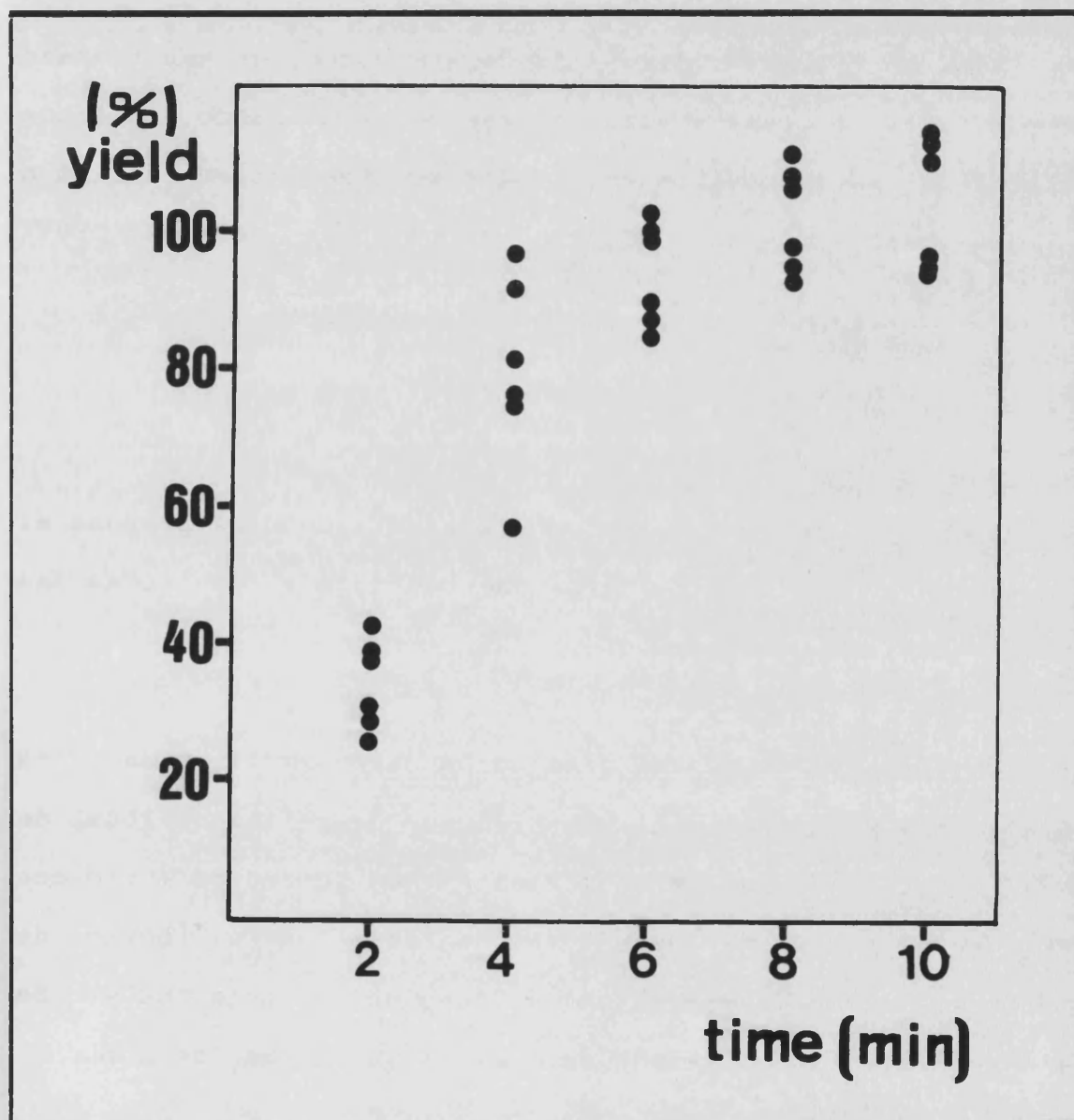
Para establecer las condiciones experimentales apropiadas para la hidrólisis de las benzodiazepinas se ha empleado clorazepato dipotásico como molécula testigo.

En todos los casos se ha introducido junto con los reactores de teflón un volumen adicional de 200 mL de agua en el horno de microondas para asegurar una carga suficiente, incluso si debido a alguna fuga la muestra llegara a sequedad, y así evitar que la potencia reflejada aumente y pueda dañarse el magnetrón (Andrews y Atkinson 1984; Neas y Collins 1988). Se ha evaluado el efecto del tiempo de digestión y de la potencia suministrada sobre el rendimiento de la hidrólisis.

I.1.4.3.1.- Tiempo de digestión.

Se ha introducido en el horno de microondas un volumen de 4mL de una disolución $2,16 \cdot 10^{-4}M$ de clorazepato dipotásico en HCl 6M irradiándose al 80% de potencia durante distintos periodos de tiempo. Los resultados obtenidos se resumen en la figura I.6. Se observa que tiempos de digestión de 6 minutos son suficientes para obtener una hidrólisis cuantitativa.

Figura 1.6: Efecto del tiempo de digestión sobre el rendimiento de hidrólisis del cloracepato dipotásico en un horno de microondas, utilizando el 80% de potencia máxima.



I.1.4.3.2.- Potencia.

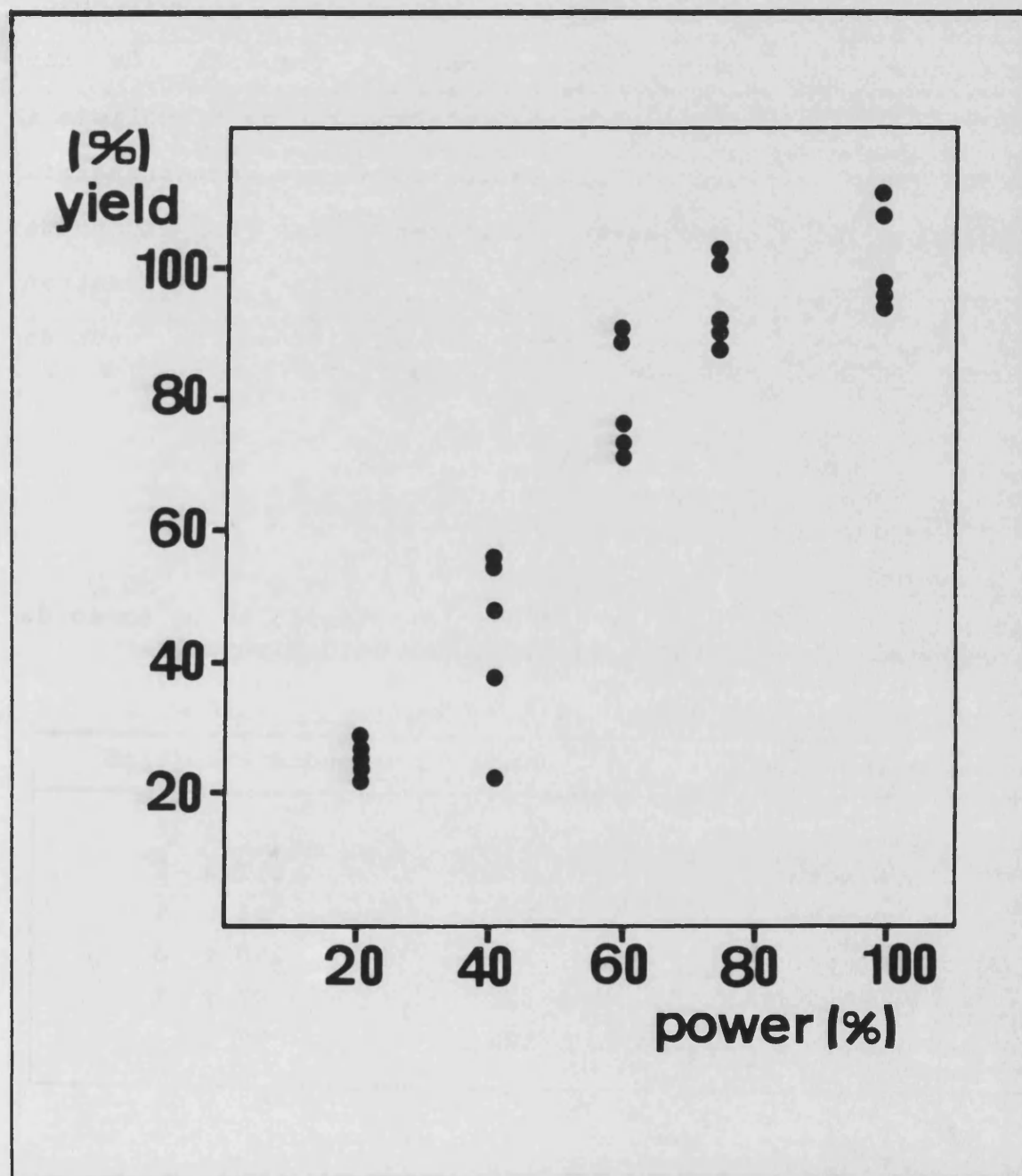
El horno de microondas empleado permite la selección del 20,40, 60, 80 y 100% de la potencia total que es 650W.

Para un tiempo de digestión de 8 minutos, se han tratado disoluciones de cloracepato dipotásico utilizando distintos valores de potencia. Los resultados se muestran en la figura I.7. Se observa que se requiere una potencia del 80% (520W) para obtener la hidrólisis completa.

A partir de los estudios llevados a cabo se propone el siguiente procedimiento para la hidrólisis de todas las benzodiazepinas ensayadas:

Se toman 4 mL de una disolución de benzodiazepina $10^{-4}M$ en HCl 6M y se introducen en un reactor de teflón de 100mL de capacidad. Se cierra herméticamente y se introduce junto con una carga adicional de 200mL de agua en el horno de microondas durante 8 minutos al 80% de potencia (520w). Se deja enfriar y el contenido se lleva a un volumen de 25mL.

Figura 1.7: Efecto de la potencia del horno de microondas sobre el rendimiento de hidrólisis del cloracepato dipotásico.



I.1.4.4.- Hidrólisis de benzodiazepinas.

En las condiciones experimentales empleadas para la hidrólisis del cloracepato dipotásico en horno de microondas se han llevado a cabo las digestiones de oxacepan, clonacepan, loracepan, nitracepan y pracepan. Se han determinado los correspondientes rendimientos de hidrólisis a partir del análisis de las benzofenonas por espectrometría isodiferencial de derivadas, utilizando las longitudes de onda indicadas en la tabla I.2. En la tabla I.4 se muestran los resultados obtenidos para las longitudes de onda de trabajo.

Tabla I.4: rendimiento de hidrólisis obtenido en un horno de microondas para un tiempo de digestión de 8 minutos.

Benzodiazepina	λ /nm	rendimiento(%) \pm S
Oxacepan	221	103 \pm 26
Clonacepan	276	117 \pm 3
Loracepan	226	98 \pm 1
Nitracepan	280	115 \pm 3
Pracepan	223	97 \pm 7
Clorazepato dipotásico	222	97 \pm 1

I.1.5.- Conclusiones.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que, dentro del nivel de confianza de los datos experimentales, la hidrólisis en hornos de microondas de las benzodiazepinas estudiadas tiene lugar cuantitativamente en solo 8 minutos, independientemente de la estructura de los compuestos considerados, lo que supone una clara ventaja frente a los tiempos largos de la hidrólisis convencional.



**I.2- HIDROLISIS DE ALBUMINA EN HORNO DE
MICROONDAS.**

I.2.1.- Objetivo.

Se ha tratado de desarrollar un método de hidrólisis de proteínas que tenga lugar de una forma rápida y cuantitativa, y sin que se modifique la naturaleza de los aminoácidos.

Se ha escogido este tipo de reacción por su gran interés en el análisis bioquímico, seleccionando como proteína tipo la albúmina.

El procedimiento utilizado para el seguimiento de la reacción ha sido la determinación del porcentaje de aminoácidos formados mediante espectrofotometría UV, empleando el método de la ninhidrina.

También se ha realizado un análisis cromatográfico de los productos obtenidos por hidrólisis de la albúmina en horno de microondas comparándolos con los encontrados por hidrólisis convencional, para ver en qué forma los aminoácidos son afectados por el proceso de digestión.

I.2.2.- Introducción.

La importancia de la determinación de la cantidad de aminoácidos en las proteínas se ve reflejada en el gran número de trabajos publicados.

El reactivo empleado en la hidrólisis de proteínas debe romper todos los enlaces peptídicos presentes en los productos naturales. Además, el enlace peptídico debe ser accesible al agente hidrolítico; sin embargo, dos características de la estructura de las proteínas dificultan dicha accesibilidad. Por un lado el efecto estérico, debido al tamaño de las cadenas laterales de los aminoácidos alifáticos, y por otro lado la estructura propia de cada proteína (estructura secundaria y terciaria). Una consecuencia de que el reactivo hidrolítico pueda reaccionar más fácilmente con una parte de la molécula que con otra es el gran número de métodos distintos de hidrólisis publicados.

En 1820 Braconnot utilizó ácido sulfúrico para la hidrólisis de proteínas. No fue hasta 1849 cuando se utilizó el ácido clorhídrico (Bopp), con el que la velocidad de hidrólisis del enlace peptídico es mayor a igualdad de concentración.

Mcpherson en 1946 puso a punto un método para cantidades grandes de proteína (>0.2 g), en el cual se añadían 20 mL de ácido clorhídrico por gramo de proteína y se diluía con agua bidestilada para obtener una concentración del HCl del 20% w/w, dejando la disolución a reflujo durante 24 horas. El exceso de HCl se eliminaba a vacío parcial y la muestra se diluía a un volumen adecuado con HCl 0.1 M.

Spies y Chambers en 1949 desarrollaron un método de hidrólisis alcalina que protege al triptófano de la destrucción a temperaturas superiores a 185 °C sin adición de antioxidantes en la disolución.

Moore y Stein en 1963 concluyeron que el método más apropiado de hidrólisis de proteínas puede llevarse a cabo por reacción con HCl 6M durante 24 horas a 110 °C bajo condiciones rigurosamente excluyentes de oxígeno, mediante congelación de la muestra y sellado bajo vacío, evitando también las sustancias no proteicas y metales. Este método es el preferido actualmente para la hidrólisis de las muestras de proteínas (método convencional). Si bien este método proporciona rendimientos de recuperación superiores al 95% para el ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, metionina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina y arginina, se obtienen pérdidas del 5-15% para la treonina y serina, en concordancia con los estudios realizados por Rees en 1946 con HCl en los que constataba una recuperación de estos dos aminoácidos de aproximadamente el 90%, y que el triptófano se destruye totalmente por la hidrólisis ácida.

Spies en 1967 describió dos métodos para la determinación de triptófano en proteínas: en uno las proteínas se hidrolizan con NaOH en atmósfera libre de oxígeno y acetato de plomo e histidina para evitar la

oxidación del triptófano por parte de la serina y de la cisteína; y en otro se lleva a cabo una hidrólisis enzimática empleando la pronasa.

Roach y Gehrke en 1970 compararon el método convencional de hidrólisis ácida (HCl 6M, 110 °C, 24h) con una hidrólisis ácida más rápida (HCl 6M, 145 °C, 4h) obteniendo rendimientos similares para ambos métodos.

Mondino y Bongiovanni, en el mismo año, realizaron un estudio de la degradación de los aminoácidos en condiciones clorhídricas exentas de oxígeno. Para la mayoría de los aminoácidos se obtuvieron recuperaciones próximas al 100%, a excepción de la serina y treonina que eran un poco degradados, y del triptófano y cistina que eran destruidos. Por otra parte el aumento de la recuperación para la prolina ocurre cuando el análisis se lleva a cabo en condiciones que no permiten la separación de la cisteína de los aminoácidos.

Oelshlegel y col. en 1970 realizaron una hidrólisis básica con NaOH 6M y tiodiglicol, como agente protector, burbujeando nitrógeno durante 4 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y realizando la reacción en tubos de plástico a 120 °C durante 20 horas, obteniendo una recuperación para el triptófano de $94.8 \pm 5.4\%$.

En el mismo año, Maravalhas propuso un método de hidrólisis utilizando ácido oxálico cristalizado y HCl en un tubo sellado, siendo este proceso más eficiente que la hidrólisis clásica en la que solo se utiliza el HCl.

Liu y Chang en 1971 propusieron la utilización de ácido p-toluensulfónico para la hidrólisis de proteínas a 110 °C durante 22 horas en tubos de ensayo, en los que se hizo vacío. Los resultados obtenidos son comparables a los que se consiguen con la hidrólisis convencional, con las ventajas de que el triptófano no se destruye y que la disolución se puede introducir en la columna de intercambio iónico sin eliminar el disolvente.

Savoy y col. en 1975 realizaron una revisión de los parámetros de hidrólisis más utilizados, concluyendo que las condiciones óptimas para la recuperación de los aminoácidos a partir de las proteínas son: una razón mg proteína/mL HCl 6M de 10:1, 110 °C y un tiempo de digestión de 22 horas, utilizando una corriente de nitrógeno para eliminar el oxígeno, congelación de la muestra y sellado de los tubos de reacción al vacío.

Tsugita y Scheffler en 1982 propusieron la utilización de una mezcla de HCl y CF_3COOH (2:1). La presencia del ácido orgánico proporciona una hidrólisis eficiente de los enlaces peptídicos más hidrófobos, obteniéndose para una temperatura

de 166 °C y un tiempo de 25 minutos, aproximadamente, los mismos resultados que con el método convencional. En este método también se destruye por completo el triptófano.

Si bien a lo largo de los años se ha ido mejorando el método convencional de hidrólisis de proteínas en cuanto a la reducción del tiempo de digestión, sigue siendo una metodología larga y tediosa.

Durante el desarrollo de nuestras investigaciones, han aparecido en la bibliografía algunos trabajos en los que se propone la utilización de los hornos de microondas para la hidrólisis de algunas proteínas y péptidos.

En 1987 Chen y col. introdujeron la posibilidad de hidrolizar proteínas y péptidos en un horno de microondas, estudiando en concreto la hidrólisis de la ribonucleasa A y de la insulina B. Para ello emplearon reactores de teflón de 2 mL de capacidad. Varios de estos reactores se cerraban a su vez dentro de uno más grande como medida de precaución para que no hubiera emisión de gases en el horno de microondas. Las hidrólisis se realizaron con HCl 6M y con una mezcla 1:1 de ácido propiónico-HCl 12M. Las muestras eran desoxigenadas mediante una corriente de nitrógeno antes de proceder al cierre de los reactores y la digestión se llevó a cabo con una potencia correspondiente al 80% de la proporcionada por el aparato, variando el tiempo de reacción de 1 a 7 minutos.

Las muestras se hidrolizaron también por el método convencional y los resultados de ambos procedimientos fueron comparables. Las desviaciones típicas encontradas en el análisis de los aminoácidos fueron del 5% aproximadamente para el ácido cistéico, treonina, serina, prolina, metionina y tirosina, siendo de 2% para el resto de los aminoácidos. Los resultados obtenidos empleando la mezcla propiónico/HCl son mejores para la treonina y para la serina que el procedimiento convencional tras 24 horas a 110 °C.

En 1989, Chiou, y Chiou y Wang propusieron cambios en el diseño de los reactores para la hidrólisis de las proteínas, empleando unos tubos de teflón-pyrex con cierre de teflón diseñados para pasar una corriente de nitrógeno. Estudiaron la hidrólisis de la ribonucleasa A oxidasa y la lisozima. El estudio de la estabilidad de los aminoácidos frente a la digestión en horno de microondas empleando una potencia de 960w evidenció tan solo una pérdida pequeña de algunos aminoácidos lábiles como la serina, treonina, metionina, tirosina e histidina, que es algo normal en la hidrólisis convencional. La hidrólisis de la ribonucleasa oxidasa se realizó con HCl 6M en 5 minutos de tratamiento en horno de microondas. Para la hidrólisis de la lisozima se propuso el empleo de ácido metanosulfónico como agente de hidrólisis, con lo que no se destruye el triptófano. La hidrólisis completa se alcanzó para un tiempo de 4 minutos, siendo la temperatura del orden de $180 \pm 5^\circ\text{C}$.

Otros autores han hidrolizado proteínas en horno de microondas, como Mannenberg y Lahm, que en 1989 hidrolizaron melitina, insulina B bovina e interferón humano recombinante. Las condiciones óptimas de hidrólisis fueron 4 minutos con una potencia de 900w con HCl 6M, las mismas que si se empleaba ácido metanosulfónico. Los rendimientos obtenidos para la hidrólisis en horno de microondas fueron similares o superiores a los obtenidos por el procedimiento clásico.

Pecavar y col. (1990) han utilizado ácido p-toluensulfónico 3M o HCl 6M para la hidrólisis de proteínas en horno de microondas empleando tiempos de irradiación de 15 minutos.

Los últimos trabajos publicados hacen referencia a la hidrólisis en fase vapor utilizando la técnica de las microondas (Mannenberg y Lahm 1989; Gilman y Woodward 1989; Du 1989; Woodward y col. 1990).

1.2.3.- Parte experimental.

1.2.3.1.- Aparatos y reactivos.

Para la digestión de muestras se ha utilizado un horno de microondas BALAY, modelo Bahm-100, con una frecuencia de 2450 MHz y una potencia de salida máxima de 650w, y para

contrastar los resultados se ha utilizado una estufa convencional Kowell D2-I.

Se han utilizado reactores de teflón de 115 mL de volumen interno con 1 cm de espesor de pared y tapón de rosca diseñados en nuestro departamento y tubos pyrex de 25 mL con junta de teflón y tapones resistentes a alta temperatura.

Como método de análisis se ha utilizado la evaluación del contenido total de aminoácidos por espectrofotometría UV, previa reacción con ninhidrina usando un espectrofotómetro UV/V de fila de diodos Hewlett-Packard HP 8452A equipado con celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

Así mismo se ha realizado un estudio cromatográfico de los aminoácidos obtenidos por hidrólisis convencional y por hidrólisis en horno de microondas, utilizando un analizador de aminoácidos LKB-4151 Alpha Plus, modelo 63, provisto de una columna con resina de sodio.

Las experiencias de hidrólisis se han hecho con albúmina bovina FLUCKA. Para la digestión de la proteína se utilizó HCl (37%) PANREAC. Para eliminar el oxígeno de los reactores se pasó una corriente de nitrógeno C-50.

Se ha utilizado un tampón de acetato de litio preparado a partir de 16,8 g de LiOH·H₂O MERCK (98%) disueltos en ácido

acético glacial PROBUS que se añadió lentamente hasta un volumen de 29,3 mL para conseguir un pH de 5,2.

Para el análisis de los aminoácidos se ha utilizado una disolución de ninhidrina preparada a partir de 0,4 g de ninhidrina MERCK a los que se añadieron 0,008 g de SnCl_2 PROBUS y 2,5 mL del tampón de acetato de litio, llevando a un volumen de 10 mL con dimetilsulfóxido PANREAC. Esta disolución se mantuvo al abrigo de la luz.

Se ha utilizado una disolución 1:1 de etanol PROBUS en agua en la preparación de las muestras y de los patrones.

Para la preparación de los patrones se ha utilizado DL-fenilalanina SCHARLAU.

1.2.3.2.- Procedimiento general.

1.2.3.2.1.- Hidrólisis en horno de microondas.

Se prepara la disolución "stock" de la proteína pesando una cantidad de albúmina bovina del orden de 0,2 g, disolviéndola en agua destilada, y diluyendo hasta un volumen de 100 mL.

Esta disolución se utiliza para la hidrólisis en horno de microondas y estudio de los parámetros de interés tales como: volumen de reacción, concentración de ácido, potencia del horno y tiempo de digestión, que se varían hasta lograr el mejor grado de hidrólisis.

Para ello se introducen en el reactor de teflón distintas cantidades de la disolución "stock" de proteína y a la que se añaden distintas cantidades y concentraciones de HCl, se pasa una corriente de nitrógeno durante un minuto y se cierra el reactor.

Se sitúa el reactor en el punto correspondiente a la mayor absorción de potencia dentro del horno, según se indicó en la figura 1.3. Dentro del horno se sitúa un recipiente con 50 mL de agua para asegurar una carga suficiente, que como ya se ha dicho evite posibles daños en el magnetrón.

Se realiza la hidrólisis en el horno de microondas variando la potencia y el tiempo.

1.2.3.2.2.- Método de hidrólisis convencional.

Se han empleado dos variantes del método convencional propuesto por Moore y Stein en 1963.

La primera de ellas, y más sencilla, consiste en introducir volúmenes iguales de disolución "stock" de proteína y de HCl 12M en un tubo de 25 mL de capacidad, y tras el paso de una corriente de nitrógeno durante 1 minuto cerrar herméticamente y mantener en una estufa convencional durante 24 horas a 110 °C.

El segundo método consiste en introducir cantidades iguales de disolución de proteína y de HCl 12M en una ampolla de vidrio, congelar la muestra y conectar a una bomba de vacío. Una vez realizado el vacío, sellar la ampolla en la llama, e introducir también en un horno convencional durante 24 horas a 110 °C.

1.2.3.2.3.- Determinación espectrofotométrica.

Después de la digestión en el horno de microondas se deja enfriar el reactor y se trasvasa el hidrolizado de albúmina obtenido a un matraz aforado de 25 mL, enrasando con agua destilada.

Se toman 0,4 mL de esta disolución y se vierten en un tubo pyrex de 25 mL de capacidad, se añaden otros 0,4 mL del reactivo de ninhidrina y se cierra el tubo. Se deja en un baño de agua a 100 °C durante 15 minutos. Una vez se ha enfriado se abre y se añaden 10 mL de disolución de etanol (1:1).

Los patrones se preparan de igual forma partiendo de 0,4 mL de disoluciones de DL-fenilalanina de diferentes concentraciones, y se mide la absorbancia de muestras y patrones a 570 nm, determinando el porcentaje de recuperación o grado de hidrólisis de la albúmina para formar aminoácidos mediante comparación de los resultados obtenidos en horno de microondas con los encontrados, en la misma sesión de trabajo, mediante el procedimiento de hidrólisis ácida convencional.

I.2.3.2.4.- Estudio de la recuperación de los diferentes aminoácidos tras la hidrólisis en horno de microondas.

Se realizó un análisis cromatográfico de las disoluciones procedentes de la digestión en horno de microondas y de los procedentes de la digestión convencional empleando un analizador de aminoácidos con columna de resina de sodio y empleando un tampón de acetato de litio.

Este estudio fue realizado en el Dpto. de Fisiología de la Facultad de Medicina de Valencia.

1.2.4.- Resultados y discusión.

1.2.4.1.- Efecto de los parámetros de digestión.

Se ha estudiado la influencia de los parámetros de digestión tales como el volumen total de muestra y reactivos en el reactor, la concentración de ácido empleada en el proceso de digestión, la potencia del horno utilizada y el tiempo de hidrólisis.

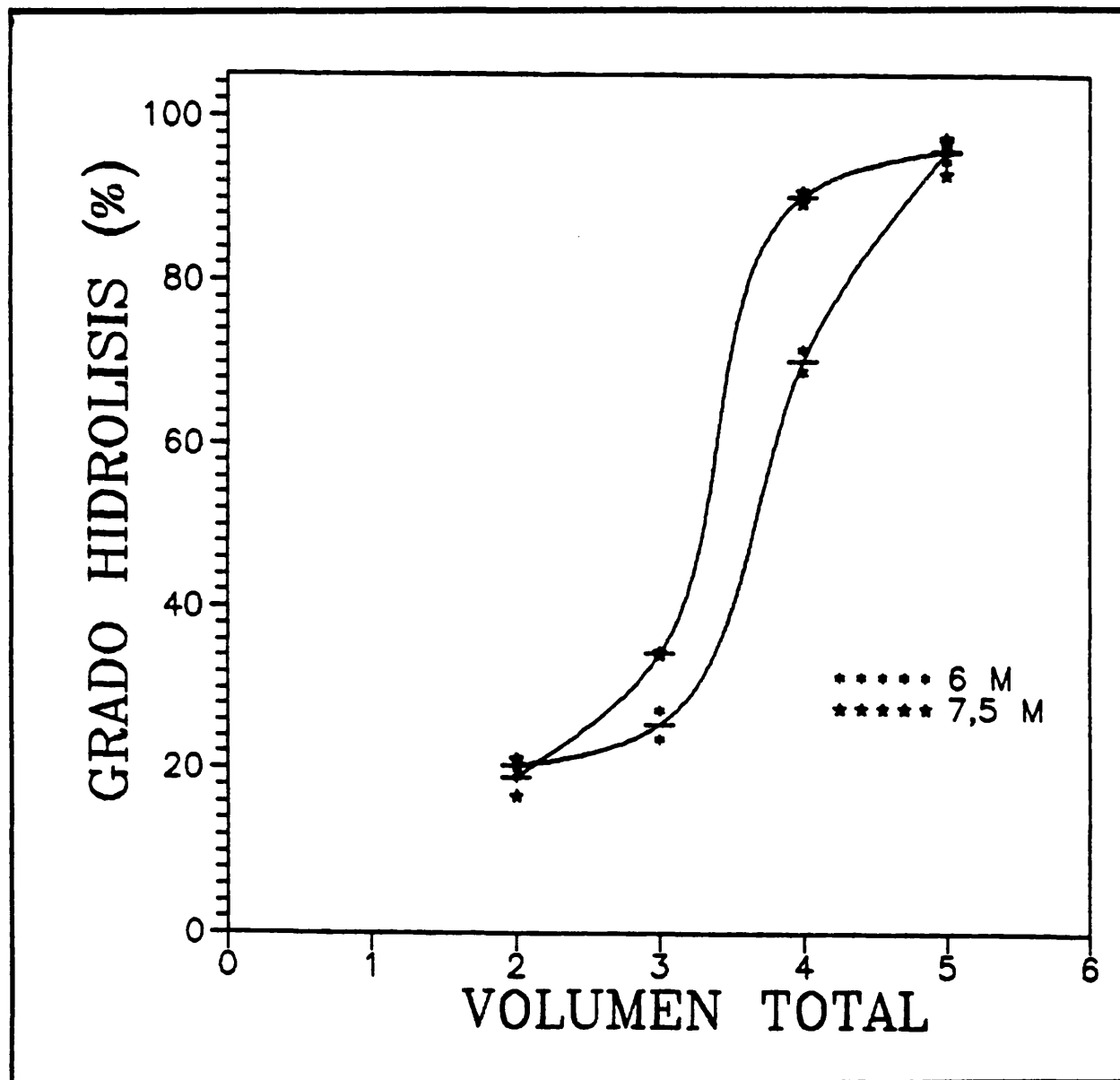
1.2.4.1.1.- Volumen de reacción.

En la figura I.8 se muestra la influencia del volumen total de reacción sobre el grado de hidrólisis. Para ello se tomaron volúmenes crecientes de la disolución "stock" de proteína a los que se añade HCl 12M en relación 1:1, de tal manera que la concentración de proteína y de HCl(6M) permanece constante.

Se observa que el rendimiento de la reacción se incrementa con el volumen total de reacción, lo que puede justificarse en base a que la presión y la temperatura alcanzados son mayores. Sin embargo, un volumen de 5 mL provoca fugas en los reactores, por lo que se escogió el volumen de 4 mL como como volumen de trabajo.

Con concentraciones fijas de HCl 7,5M se observó un comportamiento análogo y mejores rendimientos de hidrólisis.

Figura 1.8: Efecto de la variación del volumen de reacción sobre el grado de hidrólisis para diferentes concentraciones de ácido.



Concentración	Volumen total (mL)			
	2	3	4	5
HCl				
6 M	20.3±0.5	25 ±3	70 ±2	95±1
7.5M	18 ±3	34,3±0,2	90,3±0,9	95±2

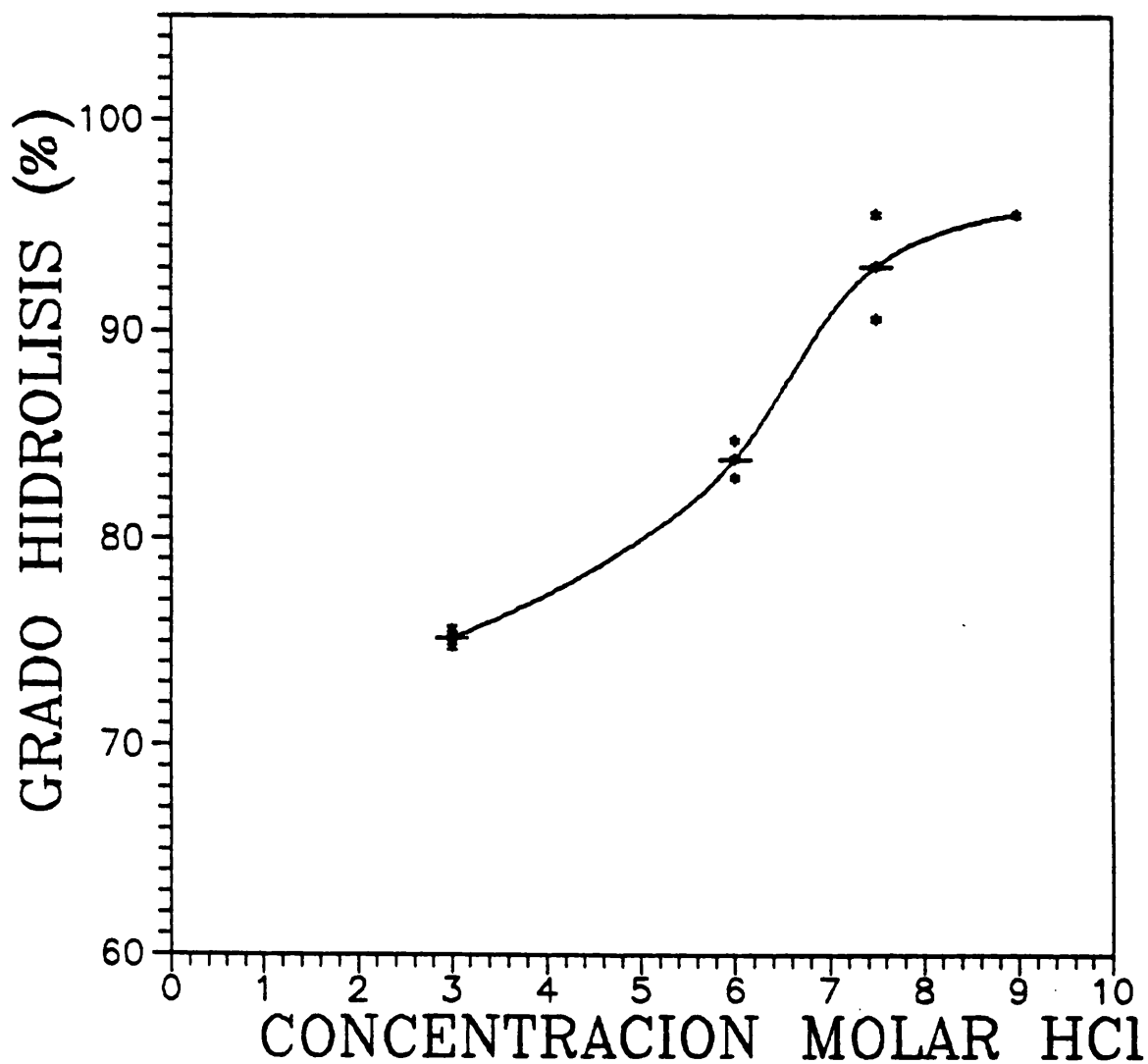
1.2.4.1.2.- Concentración de ácido.

Se ha estudiado el efecto de la concentración de HCl sobre el grado de hidrólisis, manteniendo constantes el resto de los parámetros de digestión. Los resultados se muestran en la figura I.9.

El aumento de la concentración de HCl aumenta el rendimiento de la reacción. Sin embargo, para una concentración de HCl 9M no se produce un aumento sensible. Teniendo en cuenta, como contrapartida, las fugas que se producen en las digestiones, como consecuencia de la sobrepresión, se ha preferido emplear una concentración de HCl 7,5M para realizar las digestiones.

Esta observación contradice lo previsto por la teoría del calentamiento en el horno de microondas. Las disoluciones de HCl menos concentradas se calientan más rápidamente, al absorber el agua más radiación que el ácido. La explicación de esta diferencia puede basarse en la cinética de la reacción, ya que la velocidad de la reacción depende de la concentración de los reactivos, y este efecto parece predominar en nuestro caso frente a la diferente absorción de las microondas por las disoluciones diluidas y concentradas.

Figura 1.9: Efecto de la concentración de ácido sobre el grado de hidrólisis.



Concentración HCl (M)	3	6	7.5	9
Grado de Hidrólisis (%)	75,2±0,6	84±1	93±3	96±1

1.2.4.1.3. - Potencia del horno.

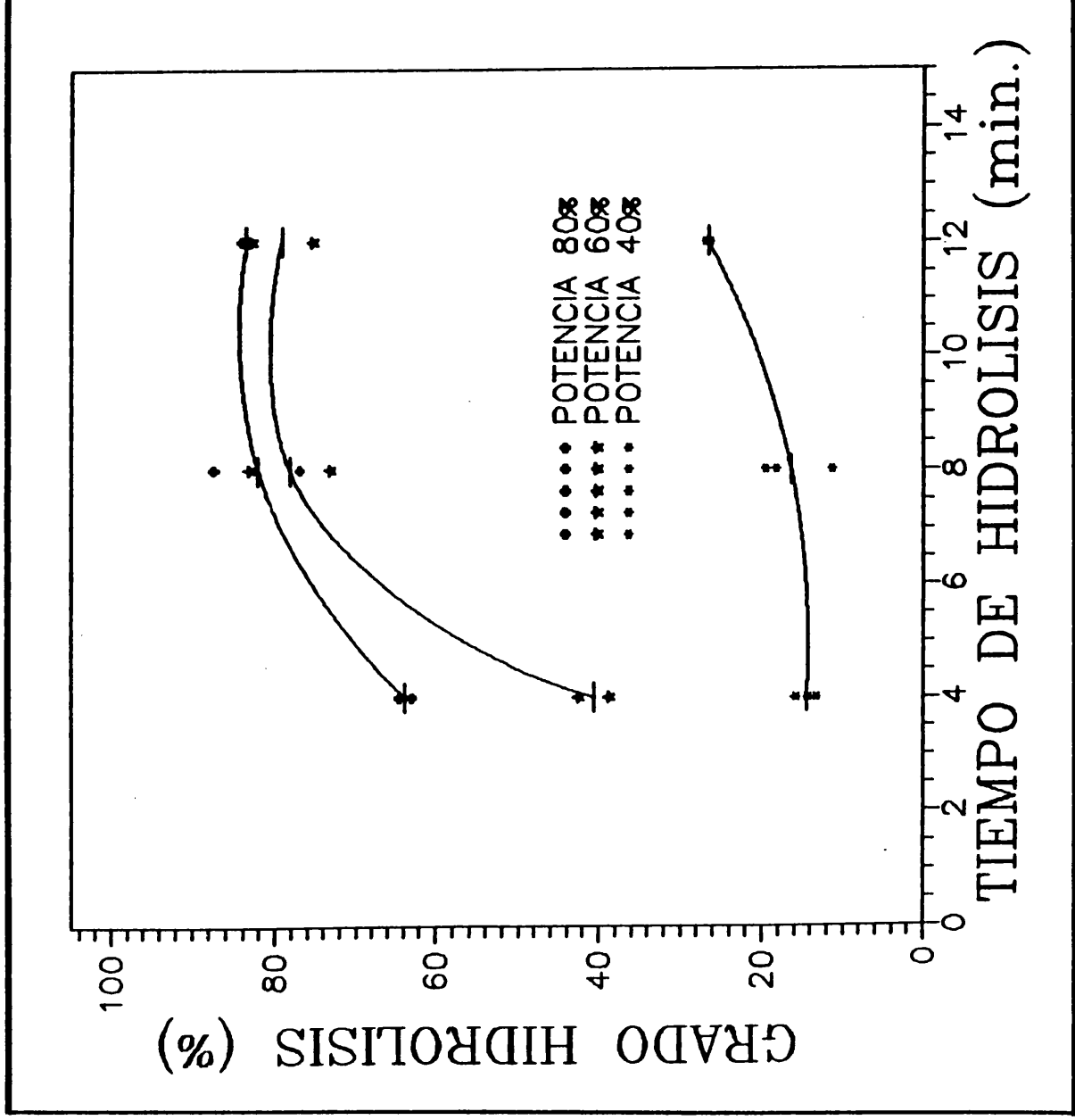
El modelo de horno de microondas empleado permite la selección del 20, 40, 60, 80 y 100 % de la potencia total que es 650W.

Los ensayos se han realizado a distintos tiempos; 4,8 y 12 minutos respectivamente. Para tiempos de 8 y 12 minutos se han empleado etapas de 4 minutos de calentamiento, seguidas de enfriamiento antes de iniciar otra etapa de calentamiento.

En la figura I.10 se indican los resultados encontrados. Los datos para una potencia del 20% no se indican, ya que para tiempos cortos no se detectaron productos de hidrólisis; ni tampoco para una potencia del 100% ya que se producían fugas en los reactores; llegando a provocarse en algunos casos la rotura de la rosca del cierre.

Como se observa, para una potencia del 40% los tiempos empleados no son suficientes para producir la hidrólisis completa de la albúmina. Como es lógico, el aumento del tiempo de exposición a la radiación conlleva un aumento de la concentración de aminoácidos encontrados en el hidrolizado.

Figura I.10: Efecto de la potencia sobre el grado de hidrólisis.



Potencia (%)	Tiempo de digestión (minutos)		
	4	8	12
40	14 ± 1	16 ± 4	26,5 ± 0,3
60	40 ± 3	78 ± 7	79 ± 5
80	64 ± 1	82 ± 7	83,6 ± 0,7

Si se eleva la potencia del horno al 60% se observa un aumento visible del grado de hidrólisis, obteniéndose un grado de hidrólisis máximo. Análogamente sucede para una potencia del 80%. Debido a que la diferencia en el grado de hidrólisis a las potencias del 60 y 80% no es muy elevada, se escogió la potencia mínima para evitar así las posibles fugas que ocurrían, ocasionalmente, cuando se trabajaba al 80 % de potencia.

I.2.4.1.4.- Tiempo de hidrólisis.

El tiempo de hidrólisis es el parámetro más importante, por lo que se deben condicionar el resto de los parámetros a la obtención de un tiempo mínimo que conlleve una mayor rapidez del análisis. Como se vió en la figura I.10 un mayor tiempo de exposición a las microondas supone un mayor grado de hidrólisis.

Se ha estudiado la influencia del tiempo de hidrólisis utilizando distintas períodos de calentamiento: 4, 5 y 6 minutos, alternados con períodos de enfriamiento. Los resultados se representan en la figura I.11.

Como ya se ha comentado, un aumento del tiempo de hidrólisis conlleva un avance en la reacción hasta alcanzar el máximo grado de hidrólisis. No existe diferencia

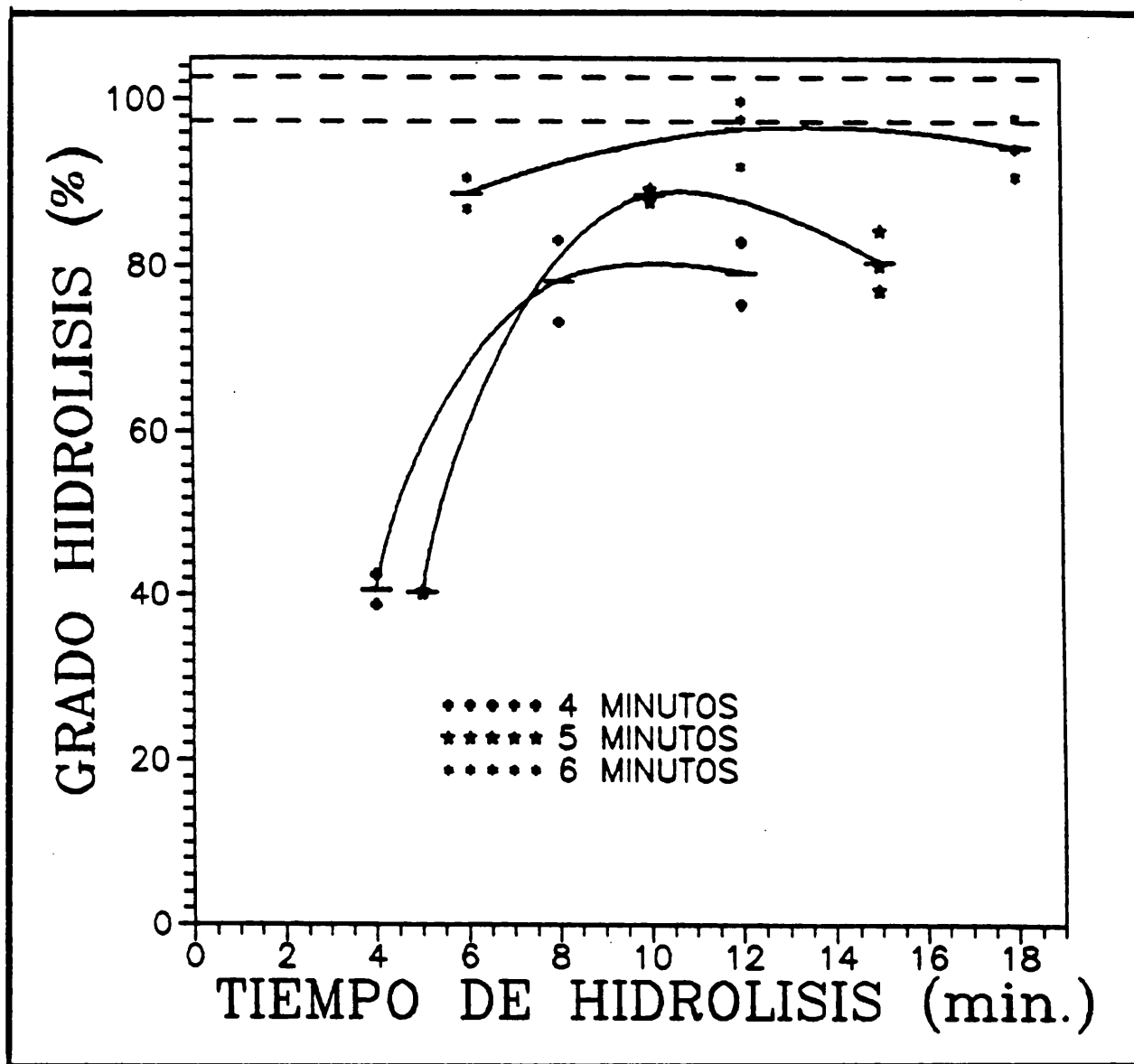
apreciable entre el empleo de etapas de calentamiento de 4 ó 5 minutos, en cambio cuando se prolonga el ataque durante 6 minutos se obtiene una concentración de aminoácidos bastante más elevada, llegándose a un grado de hidrólisis del orden del 97% en solo dos etapas de 6 minutos de calentamiento.

Probablemente un calentamiento continuo sin etapa de enfriamiento intermedio, además de disminuir apreciablemente el tiempo del análisis, podría facilitar la hidrólisis de los enlaces peptídicos, si bien en estos momentos no existen en el mercado reactores, utilizables en horno de microondas, resistentes a la presión que se alcanza en las condiciones de reacción.

Del estudio del efecto de los parámetros experimentales sobre la hidrólisis de la albúmina bovina en horno de microondas se deduce el siguiente procedimiento recomendado:

Se toman 1,5 mL de una disolución de proteína 0,2 g/100mL, y se le añaden 2,5 mL de HCl 6M. Se introducen en un reactor hermético, se cierra el reactor y se coloca en el horno de microondas. Se irradia durante 6 minutos al 60% de potencia (390w), se deja enfriar y se vuelve a irradiar 6 minutos a 390w.

Figura 1.11: Efecto de la variación del periodo de calentamiento sobre el grado de hidrólisis.



Períodos (minutos)	Número de períodos		
	1	2	3
4	(4) 40 ±3	(8) 78 ±7	(12) 79 ± 5
5	(5) 40,3±0,1	(10) 88,6±0,9	(15) 80 ± 4
6	(6) 88 ±3	(12) 96 ±4	(18) 94 ± 4

(): Los números entre paréntesis indican el tiempo total de digestión en el horno de microondas.

I.2.4.2.- Análisis cromatográfico de los aminoácidos.

Podría ocurrir que las microondas no solo actuasen sobre los enlaces peptídicos, produciendo la hidrólisis, sino también sobre los propios aminoácidos destruyéndolos y dando lugar a una disminución en la concentración de alguno o de todos los aminoácidos. Por este motivo se llevó a cabo un estudio cromatográfico de la recuperación de cada aminoácido de la albúmina dependiendo del método de hidrólisis, con el fin de comprobar si la hidrólisis en horno de microondas altera la naturaleza de los aminoácidos de la proteína. En la tabla I.5 se indican los coeficientes de recuperación de los aminoácidos de la albúmina por el método convencional y por digestión en horno de microondas, y a la vista de los cromatogramas (figuras I.12 a I.15) y puesto que no desaparece ningún aminoácido en la digestión con microondas, se puede concluir que la exposición a las microondas de la albúmina bovina no afecta a la naturaleza de los aminoácidos que la componen.

En líneas generales se observa que la hidrólisis en horno de microondas existe una dependencia entre la recuperación de los distintos aminoácidos y el tiempo de digestión. Comparando los datos para los dos tiempos de calentamiento en el horno de microondas se producen recuperaciones menores al aumentar el tiempo de calentamiento, mientras que para algunos aminoácidos

aumentan. Sin embargo estos datos tan solo deben tomarse como indicativos ya que no pudieron obtenerse en las mejores condiciones de hidrólisis, establecidas en el horno de microondas mediante el empleo de la reacción con ninhidrina.

Tabla I.5: Recuperación de los aminoácidos de la albúmina.

Aminoácido	Hidrólisis convencional	Hidrólisis microondas
A. aspártico	91	103
Treonina	89	90
Serina	95	121
A. Glutámico	108	97
Prolina	106	83
Glicina	104	105
Valina	102	71
Cisteína	104	87
Isoleucina	93	60
Leucina	94	84
Tirosina	97	97
Fenilalanina	95	82
Lisina	94	87
Histidina	92	84
Arginina	98	90

Figura I.12: Cromatograma de la hidrólisis convencional en ampolla de vidrio sellada al vacío.

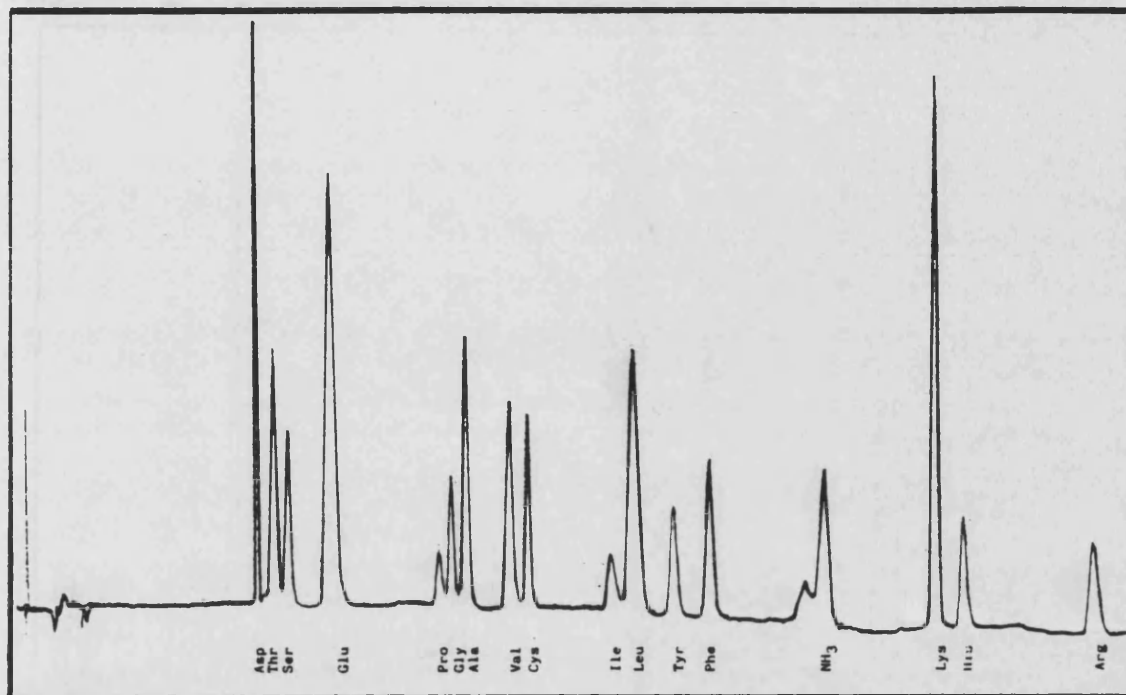


Figura I.13: Cromatograma de la hidrólisis convencional en tubo pyrex y atmósfera de nitrógeno.

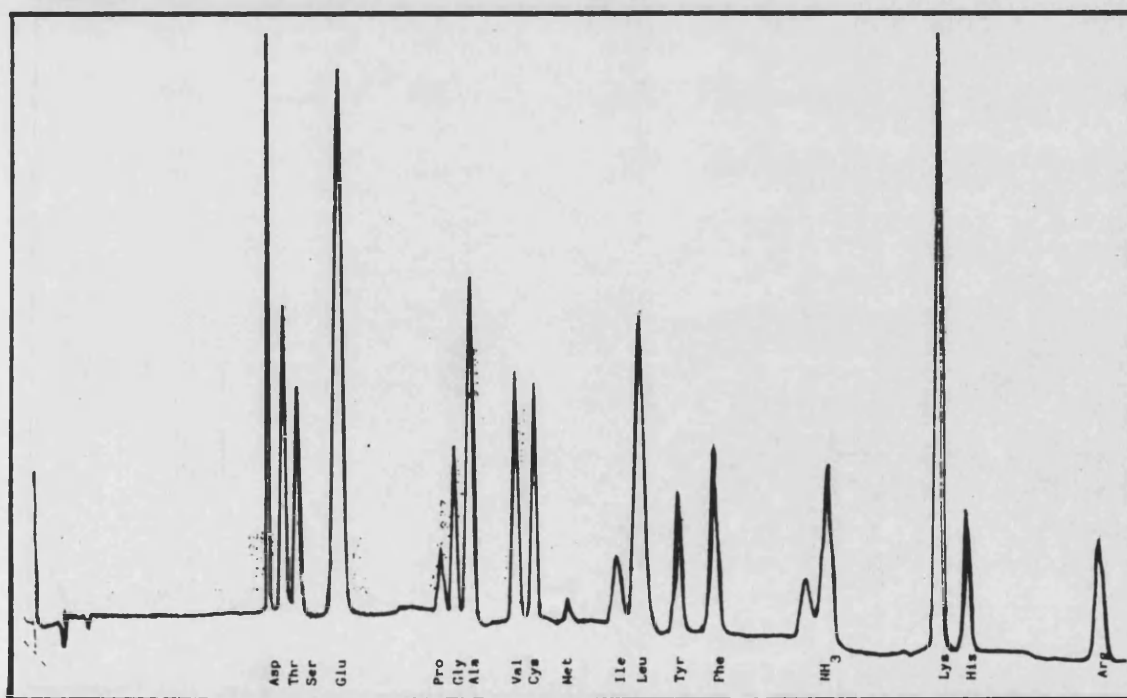


Figura I.14: Cromatograma de la hidrólisis en horno de microondas durante dos periodos de calentamiento de 5 minutos al 60%.

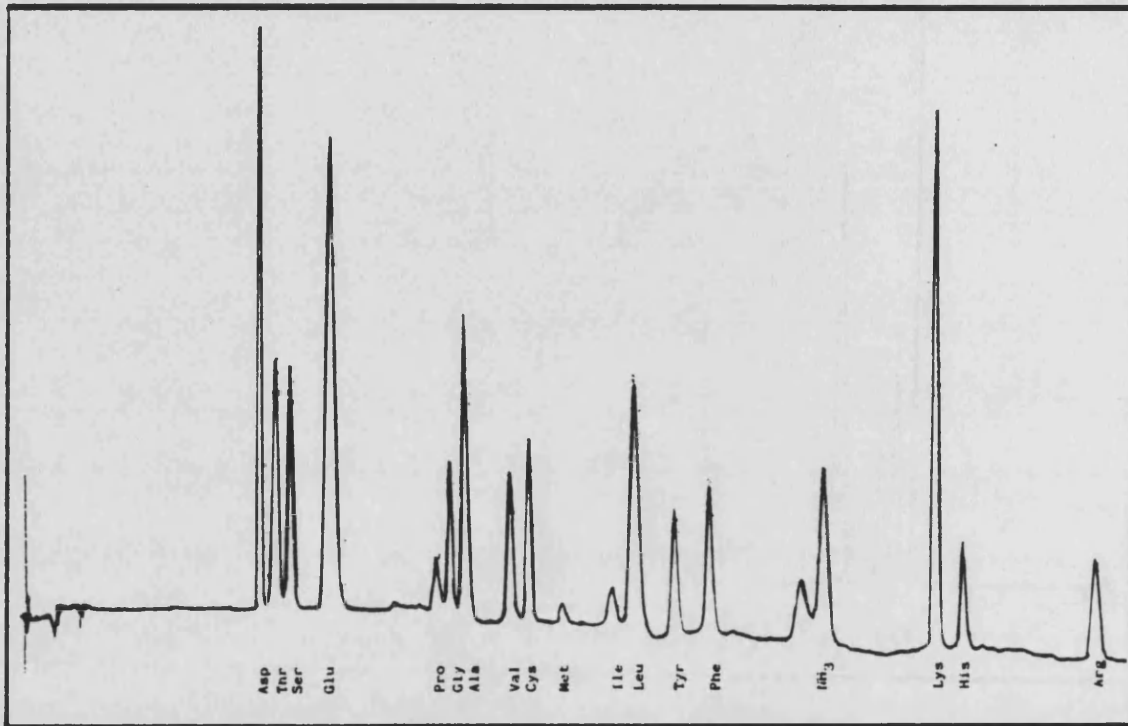
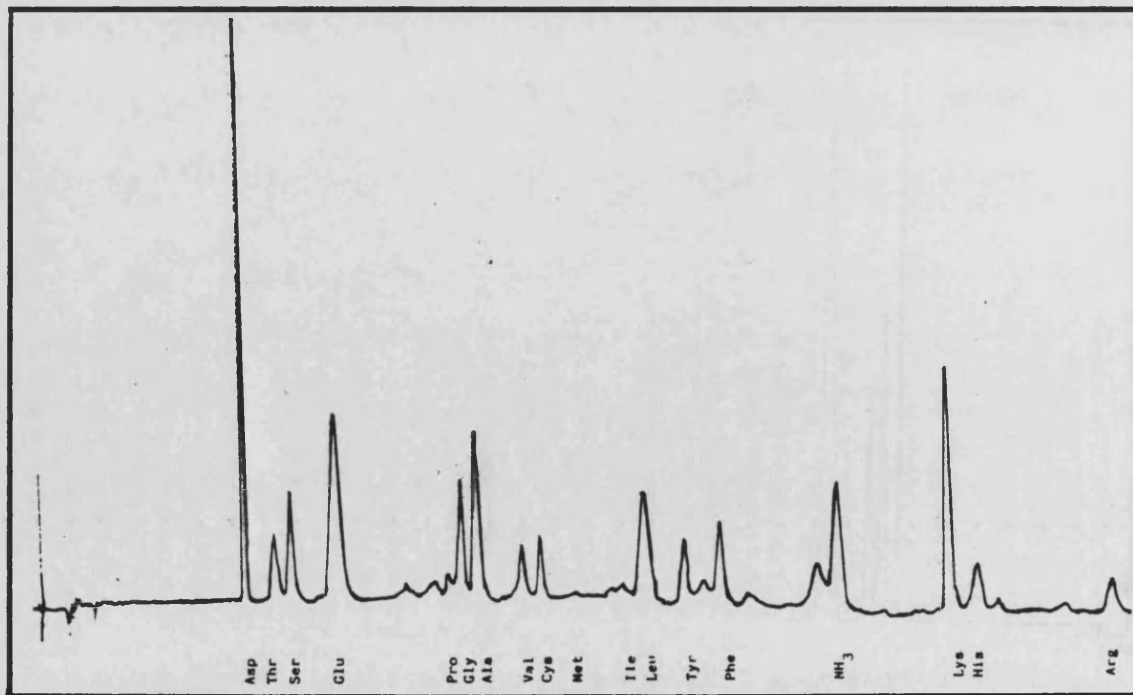


Figura I.15: Cromatograma de la hidrólisis en horno de microondas durante tres periodos de 5 minutos al 60%.



I.2.4.3.- Comparación de la hidrólisis de albúmina con la de otras proteínas en horno de microondas.

Ya se comentó al principio que durante el desarrollo de los estudios de hidrólisis ácida de albúmina, en horno de microondas, han aparecido en la bibliografía varios trabajos en los que se propone este sistema para digerir otras proteínas.

La disparidad de condiciones empleadas en la digestión ácida de proteínas en horno de microondas hace difícil la comparación de las mismas, si bien se puede concluir que en todos los casos se han empleado valores de potencia inferiores al 100%; lo que corrobora nuestra experiencia, en el sentido de que las presiones alcanzadas en los procesos anteriores puedan provocar problemas con los reactores. En todos los casos se empleó HCl 6M, probablemente más por mantener las condiciones de acidez de la digestión convencional que porque se hubiera estudiado la influencia de este parámetro y, respecto al tiempo de hidrólisis este va de 3-5 minutos para proteínas como la insulina B (Chen y col. 1987) hasta 8 minutos para la lisozima (Chiou y Wang 1989), 12 minutos para los péptidos sintéticos (Woodward y col. 1990) y hasta 30 minutos para el interferón α -humano recombinante (Mannenbergl y Lahm 1989); con lo cual se puede concluir que, hasta el momento, no se ha podido desarrollar un proceso de hidrólisis ácida en horno de microondas que

pueda ser aplicable a cualquier proteína y todavía se requiere un esfuerzo grande de investigación para desarrollar un tipo de reactores que resistan altas presiones y en las que se puedan efectuar las hidrólisis con total seguridad.

1.2.5.- Conclusiones.

De los resultados expuestos se puede concluir que es posible realizar la hidrólisis de la albúmina en horno de microondas por tratamiento con HCl en solo dos etapas de 6 minutos de calentamiento sin que se degrade la naturaleza de los aminoácidos formados, presentando por tanto la ventaja de la rapidez frente a los métodos convencionales (24h).

4.- PARTE II:

EMPLEO DEL HORNO DE MICROONDAS EN LA DIGESTION DE MUESTRAS. DETERMINACION DE ELEMENTOS METALICOS POR ESPECTROMETRIA ATOMICA CON LLAMA MEDIANTE INTRODUCCION DE SUSPENSIONES DE MUESTRAS DIGERIDAS.

II.0.1.- Digestión de muestras en hornos de microondas.

A continuación se exponen algunos aspectos básicos de la digestión de muestras en hornos de microondas a través de la revisión de la bibliografía publicada sobre el tema.

II.0.1.1.- Bases para el ataque de muestras sólidas en hornos de microondas.

Como hemos visto, la radiación de microondas consiste en campos magnéticos y eléctricos alternantes cuya frecuencia, del orden de los gigahercios, es generada en el magnetrón del horno de microondas y guiada hacia la cavidad del horno, lugar donde la absorben las moléculas de la muestra y del disolvente.

Unicamente las moléculas polares absorben la energía de las microondas (Van Zante, 1973; Hill y col. 1969). El momento dipolar de las moléculas polares permanece alineado con el campo eléctrico generado por la radiación y debido a los rápidos cambios de dirección producidos en el campo eléctrico ($2.45 \cdot 10^9$ veces por segundo), las moléculas polares se alinean y realinean cuando las microondas pasan a su través. De este modo la muestra se calienta por efecto de la fricción de sus moléculas. En consecuencia, la polaridad tiene un papel importante en la temperatura alcanzada por una

sustancia en el horno de microondas y por ejemplo, se ha observado (Watkins, 1983) que la temperatura de 100 mL de agua aumenta 70°C en 80 segundos, mientras que la temperatura de 100 mL de CCl_4 sólo se incrementa 2°C en 140 segundos. Para un mismo volumen de palmitato de metilo se obtiene un aumento de 30°C en 140 segundos.

El calentamiento de la muestra en el horno de microondas se incrementa con la potencia suministrada y el tiempo de irradiación y decrece con la masa de la muestra y, en general, con la carga del horno (Koh 1980; Hesek y Wilson 1974).

Debido a la influencia del carácter dipolar de las moléculas en la absorción de las microondas se necesita llevar a cabo la digestión de las muestras en presencia de un ácido o una mezcla de ácidos. Los líquidos dieléctricos calentados en contacto con las partículas dieléctricas generarán el calentamiento de las moléculas de la superficie de la muestra. Esto puede crear grandes corrientes de convección térmica que agiten y rompan las capas de la superficie, exponiéndose una nueva superficie a la disolución ácida y proporcionando una disolución de la muestra muy eficiente.

El calentamiento y ataque de la muestra no se produce por efecto de una fuente externa de calor, sino que se genera

en la interacción de la propia mezcla de reacción con la radiación de microondas, de modo que la mezcla de los ácidos con las muestras actúa como un excelente absorbente de la radiación. Ahora bien, es preciso tener en cuenta que solo el carácter polar de los constituyentes de esta mezcla permite su calentamiento, siendo el agua la especie más absorbente; por lo que, en general, será necesaria su presencia para asegurar un rápido calentamiento de las muestras.

En un trabajo de Kingston y Jassie (1988) se estudia la potencia absorbida por 50mL de disoluciones de distintos ácidos, encontrándose que el agua es el mejor absorbente, por lo que cuanto más diluido es el ácido más energía absorbe y más se calienta. Además, comparando los ácidos concentrados se aprecia que el H_2SO_4 es mejor absorbente que el HNO_3 y este lo es más que el HF y el HCl.

II.0.1.2.- Modificación de los hornos de microondas para su empleo en el laboratorio.

Los hornos de microondas han encontrado un amplio uso en cocina. Estos hornos pueden descongelar, calentar y cocinar alimentos muy rápidamente y, si son manejados con cuidado, no presentan ningún peligro para las personas que los utilizan.

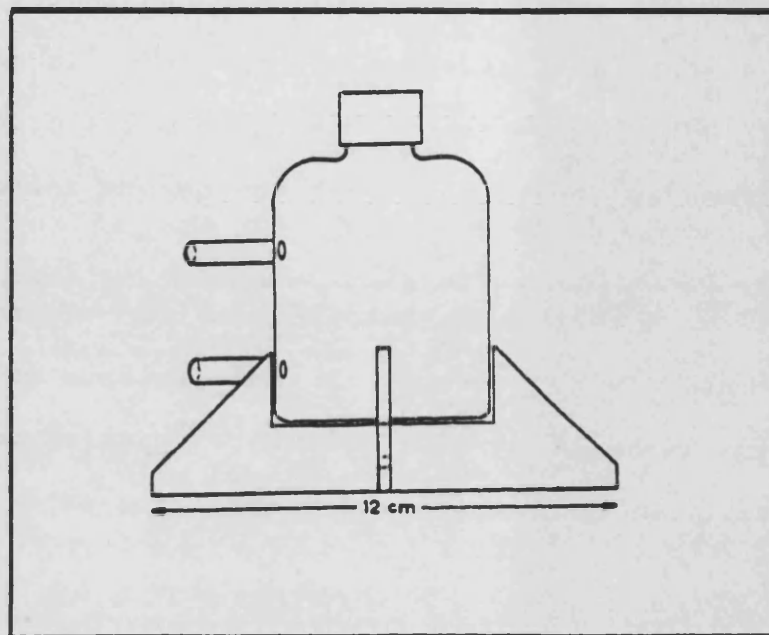
Sin embargo cuando los hornos disponibles comercialmente se quieren utilizar en el laboratorio es necesario considerar algunos puntos para evitar el deterioro del magnetrón y el potencial riesgo de la operación.

Es importante observar que, cuando las muestras se tratan en el horno, la carga de este disminuye a medida que la muestra va secándose y cuando el horno pierde toda su carga, la energía, que todavía está siendo aplicada, no es absorbida y el magnetrón tiende a crear un arco eléctrico y destruirse a sí mismo (Andrews y Atkinson, 1984).

La figura II.1 muestra el sistema de compensación de carga propuesto por Andrews y Atkinson (1984) para modificar un horno de microondas para su empleo en el laboratorio evitando el problema mencionado. Se trata simplemente de una botella de propileno adherida a la pared del horno y en la que se asegura un volumen constante renovado de agua.

Este sistema es seguro, pero habría que reprocharle que reduce drásticamente la potencia disponible; por lo que para prevenir que el magnetrón trabaje en seco es preferible simplemente introducir en el horno un recipiente estanco con la menor cantidad posible de agua que, como se ha comentado en la Parte I, evita que la carga del horno disminuya excesivamente.

Figura II.1: Sistema propuesto por Andrews y Atkinson (1984) para mantener constante la carga de un horno de microondas.



Otro peligro es el riesgo potencial de explosión cuando se calientan compuestos orgánicos y se producen vapores alrededor del equipo eléctrico (Watkins, 1983).

Por otro lado materiales altamente ácidos no deberían secarse en un horno de microondas, sin tomar precauciones, puesto que los vapores ácidos podrían atacar las paredes de la cavidad (Hesek y Wilson, 1974). Así, para llevar a cabo digestiones ácidas en un horno de microondas, es importante disponer de un sistema convenientemente seguro que evite la permanencia del ácido o de los vapores del disolvente en la cavidad.

Sin embargo, y a pesar de que este inconveniente puede hacer pensar en la necesidad de utilizar una instrumentación específica para el tratamiento de las muestras, la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha sobre digestión en horno de microondas se han realizado con hornos domésticos.

Para llevar a cabo la evacuación de los vapores ácidos formados durante la digestión, el procedimiento más general propuesto en la bibliografía consiste en introducir las muestras dentro de un recipiente cerrado que está conectado con el exterior del horno.

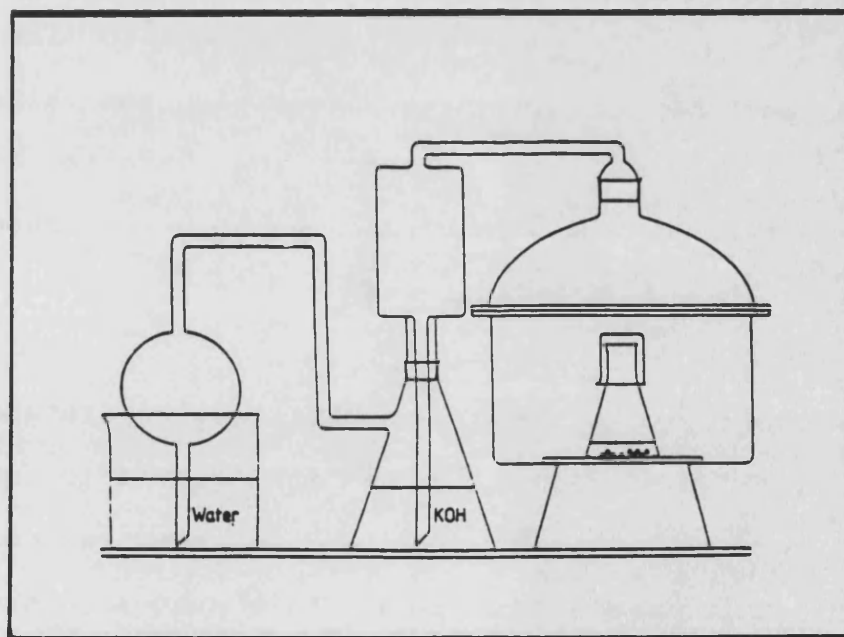
Abu Samra y col. (1975a) utilizaron cajas de plexiglas, Barrett y col. (1978) recipientes cromatográficos rectangulares de vidrio pyrex y Tsukada y col. (1985) vasos de vidrio resistentes al calor con una boca de 1 cm. de diámetro. Estos recipientes protegen el interior de la cavidad del horno y permiten ajustar un sistema de extracción que puede conectarse a una trompa de vacío o un extractor de gases.

Pougnat y Wandt (1986) proponen el uso de un recipiente de digestión formado por un desecador (en el que se depositan los erlenmeyer conteniendo las muestras y los ácidos) conectado a un erlenmeyer con KOH (donde se neutralizan los humos ácidos) y un vaso de precipitados con agua. Este

conjunto se introduce dentro del horno. La presencia del agua evita el exceso de potencia reflejada y la destrucción del magnetrón y el empleo de un sistema cerrado protege las paredes del horno del ataque de los ácidos.

Como se puede observar en la figura II.2 este montaje no exige modificar los hornos disponibles comercialmente para su empleo en el laboratorio.

Figura II.2: Sistemas para la digestión de muestras propuesto por Pougnet y Wandt (1986).



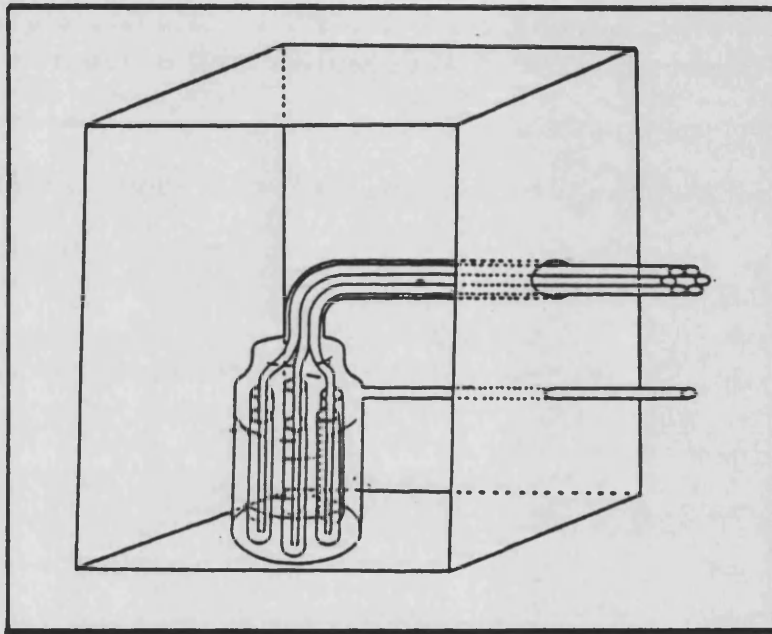
En la mayoría de los trabajos se extraen los vapores ácidos, sin embargo, Lamothe y col. (1986) recomiendan la purga del horno con una corriente de aire comprimido durante el calentamiento de las muestras en recipientes a presión introducidos en un contenedor tipo "tupperware". La purga se asegura por diferentes tubos de plástico insertados a través de los orificios de ventilación de una cara del horno, y tiene por objeto prevenir fugas en los digestores.

Cuando la digestión de la muestra se lleva a cabo a presión en recipientes cerrados, parece que una precaución suficiente sería encerrar estos en un recipiente de mayores dimensiones para evitar el deterioro del horno en caso de roturas o fugas (Nadkarni 1984). En éste caso, los frascos a presión permiten alcanzar temperaturas más altas de la muestra-disolución, sin embargo, los vapores ácidos son transparentes a las microondas y solo la fase líquida continúa absorbiendo la energía.

Burguera y col. (1988) han utilizado un sistema de tubos pyrex colocados debajo de una campana de vidrio que conecta con el exterior, para digerir las muestras con ácidos y extraer continuamente los gases. Este sistema, que se puede apreciar en la figura II.3, puede adaptarse para la digestión en línea de las muestras, utilizando una válvula de aspiración para extraer las muestras de los tubos de

digestión e introducirlos en un sistema de flujo continuo (de la Guardia y col. 1988).

Figura II.3: Sistema para la extracción de gases en la digestión de muestras en horno de microondas (Burguera y col. 1988).



Como ya hemos señalado, en el mercado existen diferentes tipos de hornos de microondas adaptados especialmente para el trabajo en el laboratorio.

Los equipos de la CEM Corporation mantienen la estructura básica de los hornos de cocina pero, incorporan un sistema de evacuación de humos y un circulador para evitar la

radiación reflejada y además emplean digestores con un minucioso control de la presión y temperatura durante el proceso de digestión.

Los equipos de Prolabo son a simple vista muy diferentes de los hornos de microondas convencionales; ya que la cavidad del microondas esta diseñada especialmente para alojar los reactores que reciben toda la potencia del magnetrón a través de la guía de ondas. El sistema trabaja a presión atmosférica y permite programar todas las etapas desde la adición de ácidos y reactivos hasta los tiempos y potencia de trabajo.

Otro problema que hay que tener en cuenta, comentado en la introducción, es la elección, tanto de los recipientes como de los reactores de digestión.

Los materiales metálicos son impermeables a las microondas y a causa de ello no se pueden utilizar. Sin embargo el teflón, el vidrio pyrex y algunos plásticos como el policarbonato y el polietileno son adecuados como recipientes para el ataque de las muestras. Además, el teflón y el vidrio pyrex se pueden utilizar en el tratamiento de muestras bajo presión. No obstante, los recipientes de vidrio pyrex acumulan calor rápidamente y por este motivo se utilizan con mayor frecuencia los frascos de teflón.

Se podría recomendar la utilización de materiales plásticos como recipientes de digestión en el horno de microondas, sin embargo el poliestireno comienza a ser inestable por encima de los 70°C y no se puede utilizar.

Matthes y col. (1983) y Lamothe y col. (1986) recomiendan la utilización de frascos a presión de policarbonato, ya que el policarbonato es transparente a las microondas y es un plástico con una elevada resistencia a la tracción, resistente a los ácidos y con un punto de fusión de 135°C. No obstante, cuando se utiliza una mezcla de ácidos minerales fuertes para disolver muestras en un horno de microondas, es normal que el plástico se torne después de cuatro usos de un tono amarillento y se produzca un gradual deslustramiento de las paredes del bote.

II.0.1.3.- Digestión húmeda en horno de microondas.

Cuando se secan las muestras biológicas dentro de un horno de microondas, la temperatura máxima que alcanzan, trabajando a potencia mínima durante 15 minutos, es de 95-100°C. Sin embargo, se alcanza una temperatura de 120°C en 5 minutos al utilizar HNO_3 y H_2SO_4 en las digestiones (Tsukada y col. 1985). Por este motivo los hornos de microondas son adecuados tanto para secar como para digerir muestras.

Desde la publicación en 1975 del trabajo de Abu Samra y col., varios autores han aplicado esta técnica de digestión ácida de las muestras. La tabla II.1 resume los trabajos publicados hasta la fecha. En ella se indican tipo de matriz, elementos determinados, técnica empleada, así como las condiciones de digestión.

Puede observarse que en la mayoría de los casos los trabajos atienden al análisis por espectrometría de absorción atómica y emisión en plasma, determinándose todo tipo de elementos: metales de transición, alcalinos, alcalinotérreos, elementos volátiles y otros de escasa solubilidad, fósforo y azufre.

La mayor parte de las muestras son tejidos biológicos (Abu-Samra y col. 1975a; Pougnet y Wandt 1986; Nadkarni 1984; Blust y col. 1985; Schnitzer y col. 1988, 1989; ...), alimentos (Tsukada y col. 1985; Demura y col. 1985; Puscher 1986; ...) y plantas (White y Douthit 1985; Wang y col. 1990; ...), sin embargo, también se han digerido muestras de carbón, minerales, rocas y sedimentos (Nadkarni 1984; Uchida y col. 1986; Mahan y col. 1987; ...). En la mayoría de los trabajos publicados se han utilizado hornos domésticos con una potencia del orden de 650 w.

El peso de muestra utilizado varía desde 1 mg hasta 10 g, siendo entre 100 y 1000 mg la cantidad empleada con mayor frecuencia.

El tiempo de digestión es generalmente de pocos minutos, pero algunos autores recomiendan tratamientos de 30 minutos e incluso tiempos mayores. No obstante, parece que tiempos de digestión reducidos son suficientes para asegurar la recuperación completa de los elementos que se determinan.

Generalmente no se producen pérdidas de elementos durante el proceso de digestión (Demura y col. 1985). Empleando disoluciones patrón se puede comprobar que la mayor parte de los elementos no se volatilizan durante su digestión (Nadkarni 1984; Blust y col. 1985; Wandt y Pougnet 1986). Sólo se encontraron pérdidas de hasta un 26% de Cr y hasta un 20% de Pb cuando se tratan las disoluciones patrón con 10 mL de agua regia y 5 mL de HF durante 5 minutos a 625 w (Nadkarni 1984).

Sin embargo, los elementos metálicos en las muestras reales no están presentes en una forma iónica pura, sino que se encuentran formando diferentes tipos de compuestos y por ello es más difícil que en estos casos ocurran pérdidas durante el proceso de digestión. En el análisis de muestras certificadas se ha comprobado que no existen pérdidas de elementos relativamente volátiles como As, Se, Cr y Hg, durante la digestión con microondas de materiales biológicos (Abu-Samra y col. 1975; Barrett y col. 1978).

Tabla II.1: Digestión en horno de microondas.

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Biológica	As Co Cu Cr Ni Pb Se Zn	AALL, AN	Frascos erlenmeyer 125 mL
Biológica	Cd Cu Fe Mn Pb Zn	ICP	Frascos cónicos abiertos
Biológica	Cd Cu Fe	ETAA	Copas de polietileno o polipropileno
Biológica	Metales	-	Frascos erlenmeyer
Biológica	Cd Zn	FIA-AA	Tubos de ensayo de vidrio
Biológica	Hg	CVAA	Frascos borosilicato
Biológica	As	HAA	-
Sangre	Fe	AALL, UV, AN	Frascos erlenmeyer 250 mL
Sangre	Zn	AN	Frascos erlenmeyer 125 mL
Sangre	Pb	P, VA	Tubos de vidrio

CONDICIONES DE DIGESTION	REFERENCIA
0,5 g con 10 mL HNO ₃ /HClO ₄ (3 minutos) 1-5 mg con 100µL HNO ₃ y 100µL H ₂ O ₂ (15 minutos)	Abu-Samra y col. 1975a, 1975b
150 mg con 5 mL HNO ₃ y 1 mL HClO ₄	De Boer y Maessen 1983
con 100 µL HNO ₃ (5 minutos a 700w)	Blust y col. 1985, 1988
(pulsos de 10 s cada 3 minutos durante 19 minutos a 70w)	Aysola y col. 1988
con HNO ₃ (8 minutos a 200w)	Burguera y col. 1988
1g con 3,5 mL HNO ₃ ó 2mL HNO ₃ + 1,5mL H ₂ SO ₄ ó 2mL HNO ₃ + 1,5mL H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂ (10 minutos)	Schnitzer y col. 1988, 1989
0,25-1 g con 5mL HNO ₃ (5 min 50%)+ 2mL H ₂ SO ₄ (10 min 60% + 10 min 70%)+ 0,5mL H ₂ O ₂ (5 min 50%)+ 0,5mL H ₂ O ₂ (5 min 50%)	Schnitzer y col. 1990
con 200 ó 400 µL de HNO ₃ /HClO ₄	Carni y col. 1980
1-5 mL con 20mL HNO ₃ y 3mL H ₂ O ₂	Janghorbani y col. 1981
HNO ₃ -HClO ₄ -H ₂ SO ₄ (24:24:1)	Matsumara y col.1982

Tabla II.1: (cont.)

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Sangre	Cu Fe Zn	FIA-AA	Sistema FIA abierto
Pelo	Pb	FIA-AA	Tubos de ensayo abiertos
Huesos	Si	AALL	Frascos cónicos 25 mL
Cálculos urinarios	Al Ca Cu Fe K Li Mg Mn Mo Na P Pb S Sr Zn	ICP	Frascos erlenmeyer 50mL
Pescado	Hg	CVAA	Tubos de ensayo pyrex
Alimentos	Cu Zn	AALL, ETAA	Tubos de vidrio
Alimentos			Frascos borosilicato
Alimentos	Cd Cu Mn Pb Zn	AALL	Frascos erlenmeyer
Alimentos	As	ETAA	Frascos erlenmeyer
Alimentos	Cu Zn	AALL, ETAA	-
Alimentos y huesos	Pb	AALL	Frascos erlenmeyer 125mL

CONDICIONES DE DIGESTION	REFERENCIA
60-100 μ L de HCl 0,3M / HNO ₃ 0,4M	Burguera y col. 1986
100mg con 2mL HNO ₃ /HClO ₄ (1:1)	Burguera JL y col. 1987, Burguera y Rondón 1987
200mg con 3mL HNO ₃ y 3mL HClO ₄	Brown y Keyzer 1987
250mg con 1mL HClO ₄ y 2mL HNO ₃ (3 min a 650w)	Wandt y Pougnet 1986
5-15mg con 300 μ L HNO ₃ /HClO ₄ /H ₂ SO ₄ , 6 5-10 g con 20 mL HNO ₃ /H ₂ SO ₄ (10 min)	Barret y col. 1978
500mg con 20 mL HNO ₃ y 10 mL HClO ₄	Andoh y col. 1982
5g con HNO ₃ /HClO ₄ 5:1, 6 HNO ₃ /H ₂ O ₂ 1:1	Ishii 1984
20mg-1g con 15-75mL HNO ₃ y 0,1-0,5mL H ₂ SO ₄ (10-30 min 1000w)	Demura y col. 1985
0,1-2g con 4mL Ni(s), 15-100mL HNO ₃ y 0,5mL H ₂ SO ₄ (10-30 min)	Tsukada y col. 1985
0,5g con 10-40mL HNO ₃ , 5-15mL HClO ₄	Fischer 1986
HNO ₃	Denton y col. 1980

Tabla II.1: (cont.)

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Biológicas y sedimentos	Al As Ba Be Ca Co Cr Cu Fe K Li Mg Mn Na Ni P S Si Sr Ti V Zn	ICP	Recipientes de teflón o policarbonato
Biológicas y minerales	36 elementos	ICP	Recipientes pyrex de 100 mL ó recipientes teflón 500mL
Biológicas y vegetales	Al Ca Cu Fe K Mg Mn Na P Sr Zn	ICP	Frascos erlenmeyer 50 mL
Alimentos	Cu Fe	FIA-AA	Viales de 50 mL
Plantas acuáticas	-	-	Frascos erlenmeyer 125 mL
Vegetal	Cu Pb Zn	ETAA	-
Botánica Alimentos	Se	AN	Frascos erlenmeyer de 125mL o frascos borosilicato
Vegetal	Cu Zn	ETAA	Frascos erlenmeyer de 125 mL
Plantas	Ba Ca K Mg Mn Na P S Zn	ICP	Frascos Kohlraush 100 mL
Vegetal	-	-	-

CONDICIONES DE DIGESTION	REFERENCIA
50-100mg con 10mL HNO ₃ /HClO ₄ (5:4), ó HNO ₃ /HClO ₄ (1:1) ó 3mL HNO ₃	Que-Hee y Boyle 1988
200mg con 5 mL HNO ₃ /HCl y 2mL HF (3 min 625w); adicionando H ₃ BO ₃	Nadkarni 1984
250mg con 1mL HClO ₄ y 2mL HNO ₃ (3 min 650w)	Pougnnet y Wandt 1986
3mL de leche + 1mL HNO ₃ (5 min 700w)	Burguera M y col. 1987
500 mg con 8mL HClO ₄ y 2mL HNO ₃	Cooley y col. 1977
HNO ₃ /H ₂ SO ₄ (2:1)	Krasowsky y Copeland 1979
1g con 25mL HNO ₃ y 10mL HNO ₃ /HClO ₄ (4:1)	Morris y col. 1980
0,5-1g con HNO ₃	Nichols y Woodriff 1980
0,5g con 10mL HNO ₃ (30 min 540w), o con 10mL HNO ₃ y 1mL H ₂ O ₂ (30min 540w)	White y Douthit 1985
mezcla de ácidos	Wang y col. 1990

Tabla II.1: (cont.)

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Plantas y suelos	Cd Pb	ETAA	-
Rocas	Fe (II-III)	UV	Recipientes teflón abiertos
Sedimentos	Ca Cr Fe Mn Pb Zn	AALL	Tubos de centrifuga de policarbonato 50mL o de polipropileno 250mL

AALL: Absorción atómica con llama.

HAA: Generación hidruros-AA.

ETAA: Cámara de grafito.

CVAA: Vapor frío-AA.

EA: Espectrometría de emisión atómica.

FIA-AA: FIA-AA

ICP: Espectrometría de emisión atómica de plasma de inducción
acoplada.

CONDICIONES DE DIGESTION

REFERENCIA

HNO₃/H₂SO₄ (1:1)

Walsh y col. 1979

25mg con 0,25mL HF, 0,5mL H₂SO₄ (9M)

Uchida y col. 1986

0,1-200mg con 20mL MgCl₂ y HNO₃/HCl
(4:1) y mezcla de HClO₄/HF/HCl

Mahan y col. 1987

ICP-MS: ICP-Espectroscopía de masas.

DCP: Plasma de corriente continua.

UV: Ultravioleta-visible.

FA: Espectrometría de fluorescencia atómica.

P: Polarografía.

VA: Voltametría anódica.

DI: Dilución isotópica.

AN: Análisis activación neutrónica.

Se obtienen valores de recuperación bajos en la determinación del Fe en plantas y sin embargo para el hígado bovino se consiguen resultados muy buenos (Pougnnet y Wandt 1986). Este hecho se interpreta en base a la formación de un producto de reacción volátil entre este elemento y otros componentes de las muestras digeridas, o de su retención sobre un pequeño residuo obtenido cuando se lleva a cabo la digestión en el horno de microondas; aunque en la mayoría de los casos se debe a la existencia de compuestos muy difíciles de atacar.

Los valores de recuperación obtenidos para Cd, Cu, Mn, Pb y Zn en análisis de alimentos cuando las muestras se digieren en un horno de microondas con HNO_3 y H_2SO_4 durante 10 a 30 minutos varían desde el 84,3% hasta el 113% con coeficientes de variación del 0.1 al 6% (Demura y col. 1985).

La determinación de elementos más volátiles, como Pb y Hg en muestras de pescado (Barrett y col. 1978) y As en alimentos (Tsukada y col. 1985) podría llevarse a cabo mediante una digestión previa con ácidos minerales a un nivel de potencia alto durante 10 a 30 minutos. En estos casos se observó una disminución significativa en el valor del blanco de reactivos para el Pb debido a un tiempo de exposición menor de la muestra al ambiente y no se encontró ninguna pérdida ni de Pb ni de Hg durante la digestión con microondas. Los resultados alcanzados en la determinación del

As en el tratamiento de diferentes compuestos de As(III) y As(V) durante 30 minutos en el horno de microondas revelan que el As no tiene pérdidas en ningún tipo de disolución patrón. Sin embargo, en la digestión de muestras reales se recomienda la adición de 400 mg de Ni para prevenir la formación de compuestos volátiles.

El tratamiento de las muestras minerales no es tan sencillo como en el caso de las muestras biológicas o de alimentos.

En la determinación de elementos metálicos en muestras de carbón se obtienen resultados bajos para el Ba, Cr y Ti debido a la presencia de sales muy insolubles de Cr y Ti en las muestras.

El análisis de muestras geológicas es particularmente difícil y una mezcla de agua regia con HF (Nadkarni 1984) no bastan para extraer cuantitativamente el Cr, igualmente se obtienen resultados bajos en la determinación de Mg y Ti en el análisis de muestras certificadas.

Otra aplicación de la digestión de las microondas es la eliminación del azufre del carbón y fueles y la extracción del azufre de la pirita. Sin embargo, los compuestos orgánicos, como el bencil disulfuro, no son afectados por el calentamiento de las microondas (Lamothe y col. 1986).

Los sistemas de microondas diseñados especialmente para su empleo en el laboratorio suelen proporcionar informaciones técnicas sobre las condiciones de digestión de distintos tipos de muestras. En la tabla II.2 se indican los del sistema MICRODIGEST A300 de Prolabo, que emplea en general digestiones a presión atmosférica en matraces abiertos a los que se adapta un sistema de reflujo.

tabla II.2: Datos sobre el sistema microdigest A300 de Prolabo.

Muestra	Elementos/método	Reactivos	Tiempo/min	
Productos biológicos	Sangre, pelo, extractos biológicos para cosméticos y dientes	Sn, Ca, P, Cu, Fe, metales pesados	H_2SO_4 , HNO_3 y H_2O_2	12-25
Alimentos	harina, pescados, leche en polvo, espinacas...	N, As, Se, Pb, Hg, Ca, Mn, Cu, Zn y otros metales pesados	H_2SO_4 + catalizador, HNO_3 y H_2O_2	10-40
Metales	NBS362, NBS364, NBS4H...	ICP	H_2SO_4 , HNO_3 , HCl, H_3PO_4 , $HClO_4$ agua	7-40
Productos petróleo	destilados, combustible pesado y aceites	metales pesados y P	H_2SO_4 , HNO_3 y H_2O_2	19-25
Farmacéuticos	PVP, penicilina...	N, Na, Ca	H_2SO_4 + catalizador y H_2O_2	15-17
Plantas	SRM1572, alfalfa...	N, Cu, Ni y metales pesados	H_2SO_4 + catalizador, HNO_3 y H_2O_2	4-40
Plásticos	PVC, polipropileno...	C, Sn, Sb, Mg, Al, P, y metales pesados	H_2SO_4 y H_2O_2	8-40
Agua	Sedimentos y lodos	metales pesados	HNO_3	10-15
Otros	silicatos, vidrio...	metales	HNO_3 , H_2SO_4 , HCl, HF, H_2O_2	20-60

Los tiempos de digestión varían de 4 a 60 minutos, empleándose en general HNO_3 o mezclas de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, H_2SO_4 o mezclas de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$. Para los materiales plásticos se utilizan simultáneamente H_2SO_4 y H_2O_2 y para los metales agua regia y mezclas de H_2SO_4 , H_3PO_4 y HClO_4 . En el análisis de óxidos y silicatos parece preferible el empleo de HF, especialmente para atacar los silicatos.

II.0.1.4.- Comportamiento de los ácidos frente a las microondas.

Kingston y Jassie (1986) han realizado un estudio sistemático del comportamiento de los ácidos minerales frente a la radiación de las microondas, empleando el sistema de la CEM Corporation y digestores herméticamente cerrados provistos de sensores de presión y temperatura. Los datos de este trabajo son muy interesantes a la hora de estudiar las condiciones de digestión de los numerosos tipos de muestras y pueden orientar hacia la elección del ácido, o mezcla de ácidos más adecuada.

El hecho de que en la mayoría de los trabajos recientemente publicados se haya optado por la digestión a presión en matraces cerrados proporciona una utilidad todavía mayor a estos resultados.

El HNO_3 es el ácido más utilizado para la digestión de muestras debido a su carácter de ácido fuerte oxidante y al hecho de que los nitratos sean sales muy solubles; por lo que resulta útil para la posterior disolución de los residuos. Sin embargo, tiene una temperatura de ebullición muy baja (120°C) lo que limita su empleo en sistemas térmicos abiertos. En un horno de microondas 5mL de HNO_3 sometidos a una potencia de 144w llegan a alcanzar temperaturas de 176°C al cabo de 8 minutos, obteniéndose una presión de 5 atm en recipientes de un volumen aproximado de 100mL. Aumentando la potencia a 258w, 3mL de HNO_3 alcanzan en 2,5 minutos una temperatura de 175°C y una presión de 4,5 atmósferas. Esta temperatura, aproximadamente 50°C superior a la temperatura de ebullición del ácido, exalta su poder oxidante y favorece la digestión de las muestras.

El ácido clorhídrico es también un ácido fuerte y, aunque no es oxidante, tiene un gran poder complejante; por lo que resulta de gran utilidad en la digestión de metales proporcionando cloruros fácilmente solubles. 7,3 g de HCl expuestos a una potencia de 430w alcanzan, en menos de 2 minutos, una temperatura de 175°C y presiones del orden de 7 atmósferas. Estas elevadas presiones que puede llegar a proporcionar el ataque con HCl pueden ser un inconveniente para su empleo en recipientes cerrados para la digestión en hornos de microondas; por lo que se deberán extremar las precauciones para evitar pérdidas o roturas de los digestores.

De las mezclas de HCl y HNO₃, el agua regia (3:1(v/v)) es la más conocida y utilizada para la disolución de muestras. Esta mezcla tiene un gran poder oxidante, debido a la producción de cloruro de nitrosilo (NOCl). Al calentar el agua regia se produce la disociación del NOCl en Cl₂, que continúa atacando las muestras. En un recipiente hermético, 8 mL de agua regia sometidos a una potencia de radiación de 316w alcanzan una temperatura de 180°C y una presión de 7atm al cabo de 16 minutos.

El comportamiento del HF frente a las microondas es análogo al del HNO₃; sin embargo, su baja temperatura de ebullición (106°C) y su elevada presión de vapor es la causa de que se obtengan presiones del orden de 8 atm cuando se calienta a 180°C. En consecuencia el HF deberá manejarse con las mismas precauciones antes indicadas para el HCl, debiéndose tener en cuenta que este ácido es muy agresivo con la sílice, generando SiF₄, por lo que no se podrá utilizar este material en las digestiones. Además el HF ataca la dermis y sus vapores pueden dañar la visión por lo que habrá que extremar las precauciones en su manejo, utilizando guantes, jeringas de plástico y recipientes de teflón, así como gafas de seguridad y una campana de extracción con buen tiro.

La utilidad del HF en la digestión de las muestras es máxima en el ataque de silicatos y muestras de vidrio; aunque en ocasiones, cuando la sílice puede constituir una seria interferencia en la determinación de los elementos de interés, probablemente es preferible evitar su empleo para no favorecer la disolución del SiO_2 .

Cuando se utilizan mezclas de HNO_3 y HF se obtienen temperaturas y presiones comparables a las encontradas para los dos ácidos por separado. No se obtienen productos de descomposición que aumenten el poder corrosivo de estos ácidos y su empleo conjunto solo se justifica por la acción conjunta de un ácido fuerte complejante y el poder oxidante del otro.

El ácido fosfórico es un ácido oxidante con un gran poder complejante que, debido a su elevada temperatura de ebullición, puede alcanzar temperaturas muy altas en un horno de microondas con valores bajos de presión. 5mL de H_3PO_4 sometidos a una potencia de 212w alcanzan una temperatura de 198°C en 4 minutos, proporcionando una presión de 2,5 atm, y pueden llegar a 240°C en 8 minutos con una presión de 3 atm. Estas temperaturas tan altas pueden dañar los digestores y nosotros hemos observado que el H_3PO_4 llega a fundir el teflón, por lo que se desaconseja la utilización del H_3PO_4 concentrado para la digestión directa de las muestras. Sin embargo, cuando la muestra se trata previamente con HNO_3 , el

posterior tratamiento con fosfórico no daña los reactores y favorece la recuperación de los metales en muestras de difícil disolución.

Por otra parte, las mezclas de HNO_3 y H_3PO_4 en proporción 3:1 alcanzan en los reactores herméticos valores de temperatura del orden de 180°C a una presión menor de 4 atm, alcanzándose estas condiciones en 3 minutos y con una potencia de 258w.

El H_2SO_4 concentrado es un disolvente muy efectivo, especialmente por su acción carbonizante sobre los tejidos y muestras orgánicas. La elevada temperatura de ebullición del H_2SO_4 (339°C) exige controlar su empleo en hornos de microondas cuando se utilizan digestores de teflón, ya que puede llegar a fundirlos. Sin embargo, utilizando reactores de pyrex o de cuarzo, se pueden alcanzar condiciones de digestión muy enérgicas. Utilizando una potencia de 574w, 5mL de H_2SO_4 llegan a alcanzar temperaturas de 300°C en 3 minutos, lo que acelera enormemente las digestiones de muestras orgánicas, incluso en recipientes abiertos. Además, en la digestión en horno de microondas al igual que en la digestión Kjeldahl, la adición de sales y catalizadores permite optimizar las digestiones.

El ácido perclórico concentrado es un poderoso oxidante y su empleo permite el ataque de muestras que no se

descomponen con otros ácidos. Sin embargo, hay que tener presente que el empleo del ácido concentrado y en frío no requiere precauciones especiales de manejo, al igual que el ácido diluido y en caliente, pero la utilización de disoluciones concentradas de HClO_4 a elevadas temperaturas puede provocar explosiones, especialmente si existen restos de materia orgánica.

Cuando se calienta HClO_4 en recipientes herméticos en un horno de microondas, alcanza rápidamente temperaturas superiores a los 200°C incluso para potencias bajas, del orden de 200w y así, Kingston y Jassie (1986) han comprobado que 5mL de HClO_4 calentados con una potencia de 212w alcanzan en 2 minutos una temperatura de 200°C y una presión de una atm, para aumentar su presión a 7 atm tras otros 2 minutos de calentamiento, manteniéndose la temperatura en el recipiente prácticamente constante sobre los 245°C . Además, la presión se mantiene constante aunque se enfríe el digestor, lo que evidencia una descomposición del ácido.

En consecuencia hay que ser prudentes en el empleo del HClO_4 para las digestiones en horno de microondas, evitar su empleo en presencia de muestras orgánicas, controlar la presión durante la digestión y una vez terminada esta, y controlar la temperatura para evitar el deterioro de los reactores.

En la bibliografía también se han propuesto otros ácidos, como el tetrafluorbórico para la digestión de muestras geológicas, y mezclas de ácidos con agua oxigenada para aumentar el poder oxidante, en especial para la digestión de muestras orgánicas, alimentos, productos farmacéuticos, productos petrolíferos y plásticos.

II.0.1.5.- Digestiones a presión en horno de microondas.

De todo lo dicho anteriormente, se deduce que tanto para la mayor seguridad del operador y mejor conservación de los hornos de microondas como para acelerar los procesos de digestión, es preferible realizar los ataques en reactores a presión. Además, la utilización de digestores herméticos evita las pérdidas de los elementos volátiles durante la digestión.

En la tabla II.3 se resumen algunas de las aplicaciones analíticas desarrolladas para la determinación de diferentes elementos en distintos tipos de matrices previa digestión a presión en hornos de microondas.

Tabla II.3: Digestión bajo presión en horno de microondas.

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Biológica	aminoácidos	-	Reactores teflón PFA 60mL
Biológica	Fe Mn Se	AALL, HAA FA	Reactores teflón PTFE 30mL
Biológica	Ca Cu Fe K Mg Mn Zn	AALL	Reactores teflón PFA 7mL
Biológica	Cu Zn	VA	Reactores teflón PFA 60mL
Biológica	Fe	AALL	Reactores teflón PFA 60mL
Biológica y geológica	Al Ba Ca Co Cr Cu Fe K Mg Mn Na Ni Sc Si Ti V Zn Zr	ICP	Reactores teflón PTFE 120mL
Biológica	As Cd Co Cr Cu Fe Mn Ni Pb Se Sr Zn	AALL, ICP ETAA	Reactores teflón PFA 120mL, reactores teflón Parr 23mL y reactores teflón Berghoff 100mL
Biológica	Cd Cu Fe Pb Zn	AALL	Reactores teflón
Biológica	Hg	CVAA	Reactores teflón PFA 60mL

CONDICIONES DE DIGESTION

REFERENCIA

250-300mg con 5-10mL HNO₃Kingston y Jassie
1986250mg con 2mL HNO₃ y 1mL H₂O₂Xu y col.
1987, 1988100-500mg con 2mL HNO₃, 0,3mL
HClO₄, 0,15mL HCl y 0,15mL HF

Kojima y col. 1988

250mg con 7,2g HNO₃ (130 °C, toda
la noche)+(5min 172w)+(5min 207w)
+(3min 230w)

Pratt y col. 1988

25-250mg con 1mL HNO₃ y 1mL H₂O₂
(15 min 25%)

Vanwyck y col. 1988

0,25-0,5g con 20mL agua regia

Bettinelli y col.
198950-250mg con HNO₃/H₂O₂ variableMatusiewicz y col.
1989HNO₃ (menos de 1min)

Stripp y Bogen 1989

100mg con 1mL HNO₃ (8min 20%) +
(8min 40%) + (4min 60%)

Vermeir y col. 1989

Tabla II.3: (continuación).

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Biológica	Al As Ba Ca Cd Ce Cr Cs Cu Fe La Li Mg Mn Mo Ni Rb Sb Se Sr Tl V Y Zn	ICP-MS	Reactores teflón PFA
Biológica	As Ca Cd Cu K Fe Mg Mn Na P Pb Zn	AALL, HAA ETAA, EA ICP	Reactores teflón 23mL
Hueso	Al	ETAA	Reactores teflón PFA
Biológica y geológica		ICP-MS	Reactores teflón PTFE
Zumos	B Ba Ca Cu Fe K Li Mg Mn Na P Rb Sn Sr Zn	ICP	Reactores teflón 60mL
Alimentos	Nitrógeno orgánico	UV	Tubos ensayo pyrex 200mL
Alimentos y heces	Ca Cu Fe K Mg Mn P Zn Si Ti V Zn Zr	ICP	Reactores teflón PFA 120mL
Alimentos	Ca Cu Fe Mg Mn Zn	ICP	Reactores teflón PTFE 44mL

CONDICIONES DE DIGESTION	REFERENCIA
100mg con 2mL HNO ₃ (75s 350w)	Friel y col. 1990
100 mg con 1mL HNO ₃ (30 min 665w)	Lachica 1990
200-800mg (1h a 200°C) + 3mL HNO ₃ (6min)	Skelly y DiSteffano 1988
-	Noeltner y col. 1990
25g con 5mL agua regia	Nikdel y Temelli 1987
50-60mg con 2mL H ₂ SO ₄ , 0,4g K ₂ SO ₄ , 2,5mL HgO	Alvarado y col. 1988b
500-1000mg con 5mL HNO ₃ y 2mL HCl 6M (30 min).	Schelkoph y Milne 1988
200-300mg con 2mL HNO ₃ y 1mL H ₂ O ₂ (3min 500w)	Xu y Shen 1988, 1989

Tabla II.3: (continuación).

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Biológica y vegetal	Ca Cd Cr Cu Fe Ni Pb Zn	AALL	Reactores teflón 60mL
Vegetal	Al Ca Fe K Mg Mn Na P S	ICP	-
Vegetal	Ca Fe Mg Mn Zn Cd Cu Pb K Na	AALL ETAA, EA	Reactores teflón PTFE 120mL
Vegetal	S	ICP	Reactores teflón
Vegetal	Al Ca Cd Co Cu Fe Mg Mo Ni Pb	ICP-MS	Reactores de teflón
Sulfuros minerales	Cu Ni	AALL	Reactores de teflón 150mL
Muestras geológicas	Pb U	DI	Reactores teflón 60mL dentro de otro reactor de 300mL
Muestras geológicas	Ag Al As Au B Ba Be Bi Ca Cd Ce Co Cr Cu Fe Ga Ge In K La Li Mg Mn Mo Na Nb Ni P Pb Sb Sc Si Sn Sr Ti Tl V W Y Yb Zn Zr	ICP	Reactores de policarbonato 250mL

CONDICIONES DE DIGESTION	REFERENCIA
250mg con 1,5mL H ₂ SO ₄ y 1,5 mL HNO ₃ (1 min 700w)	Aysola y col. 1987
500mg con 10 mL HNO ₃ (30 min 90%) + 1mL H ₂ O ₂ (15 min 90%) + 2mL HCl (10 min 30%)	Kalra y col. 1989
500mg con 8 mL HNO ₃ + 2mL HCl, (15 min 300w) + (20 min 510w)	Nieuwenhuize y Poley-Vos 1989
0,5g con HNO ₃ /H ₂ O ₂ (2-25 min)	Finch y col. 1990
1g con HNO ₃ /HCl 7:14 (v:v) (5 min 420w)+ (10min 480w) + (15min 540w)	Imbert 1990
0,5-1g con 10mL HNO ₃ , 5mL HF y 1,5g KClO ₃	Smith y col. 1985a
500mg con 1mL HNO ₃ , 3mL HF, 0,5mL HClO ₄ y 2mL de disolución isotópica (5min 15%)+ (15min 23%) + 4mL HF + (1-5h 23%)	Fischer 1986
0,1g con 2mL HNO ₃ y 5mL HCl:HF (7:3) (2,5min 650w) + H ₃ BO ₃ + (10min 650w)	Lamothe y col. 1986

Tabla II.3: (continuación).

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Minerales	Al Ca Fe K Mg Mn Na Si Ti	AALL	Reactores teflón PFA 60mL
Sedimentos marinos y rocas basálticas	Al Ba Ca Co Cr Fe K Mg Mn Na Ni Sc Si Ti V Zn Zr	ICP	Reactores teflón PTFE 120mL
Minerales sulfurosos	Al Ba Ca Co Cr Cu Fe K Mn Mg Na Ni S Si Ti V Zn	ICP	Reactores teflón PFA 150mL
Lodos y aguas residuales	-	-	Reactores de teflón
Suelos	As	HAA	Reactores de teflón PFA 150 mL.
Sedimentos marinos	As Cd Co Cr Cu Fe Mn Ni Pb Se Zn	AALL ETAA ICP	Reactores de teflón 120 mL
Suelos	Hg	AN	Reactores teflón 120 mL
Suelos y sedimentos marinos	Al B Ba Ca Co Cr Fe K Li Mg Mn Na Ni Pb Ti V Zn	ICP	Reactores de teflón

CONDICIONES DE DIGESTION	REFERENCIA
100-250mg con 2mL H ₂ O ₂ , 20mL HCl, 2mL HNO ₃ , 2mL HF	Westbrook y Jefferson 1986
100-200mg con 5mL HF y 15mL agua regia	Bettinelli y col. 1987
500mg con 6mL HNO ₃ y 2mL HCl	Bouvier y Hall 1987
1g de lodo ó 100mL de agua con HNO ₃ , HNO ₃ -HClO ₄ (600w).	Bofelli 1988
0,1-0,5g con HNO ₃ (9min 720w)+ 3,5mL HNO ₃ , 1,5mL HClO ₄ , 1,5mL H ₂ SO ₄ (3 intervalos 2,5min 720w).	Huang y col. 1988
200-600mg con 6mL HNO ₃ + 0,51mL HClO ₄ , ó 3mL HNO ₃ + 3mL HF + 1mL HClO ₄	Nakashima y col. 1988
500mg con 10 mL H ₂ O, 6 mL HCl, 2 mL HNO ₃	Van Delft y Vos 1988
0,5-1g con diferentes mezclas de HNO ₃ , HCl, H ₂ O ₂ (diferentes tiempos y potencias).	Kammin y Brandt 1989

Tabla II.3: (continuación).

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Suelos	Cu Zn	AALL	Reactores de teflón PFA
Sedimentos marinos		ETAA, ICP	Reactores de teflón PFA
Sedimentos marinos	Al Cr Si Zn	AALL, ETAA	Reactores teflón PFA 20mL
Fertilizantes	-	AALL	-
Suelos y sedimentos	Ba Ca Cr Cu Fe Mg Mn Sr Zn	ICP	Reactores teflón PTFE
Turba	Al Ca Cu Fe K Li Mg Mn Ni Zn	AALL	Reactores de teflón PTFE 60mL
Suelos	Ga Ge	AALL, ETAA	Reactores de teflón
Rocas	Al Ca Fe K Mg Na Si	AALL	Reactores de teflón PFA 120mL
Aleaciones Cu-Ni y feldespatos	Al Ca Fe Mg Mn Na Si	AALL	Reactores policarbonato 250mL

CONDICIONES DE DIGESTION	REFERENCIA
500mg con 4mL HNO ₃ + 7mL HF (7min 400w)	Kratochvil y Mamba 1990
HNO ₃ /HCl (20min)	Millward y Kluckner 1989
HF/agua regia (1 min)	Rantala y Loring 1989
HNO ₃ , HCl/HNO ₃ , HNO ₃ -H ₂ O ₂ , (6-90 min 40-100%)	Piccione y col. 1989
0,1-0,2g con 2mL HNO ₃ + 1mL H ₂ O ₂ + 1mL HF+(3min 500w)+0,5g H ₃ BO ₃ + (1min 500w)	Xu y Shen 1989 Xu y col. 1989, 1990
500mg con 5mL HNO ₃ , 2mL HClO ₄ , 4mL HF	Papp y Fischer 1987.
HNO ₃ , HF, H ₃ BO ₃ y KNO ₃	Davidson y col. 1990
200mg con 20mL EtCOOH + 1mL HF + 3mL HNO ₃ + (3 min 100%) +(30min 90%)+ 10mL H ₃ BO ₃ 10% + (10min 60%)	Kemp y Brown 1990
100-500mg con 5mL HCl:HF (7:3) y 2mL HNO ₃	Matthes y col. 1983

Tabla II.3: (continuación).

MATRIZ	ELEMENTOS	TECNICA	REACTORES DIGESTION
Acero	Al As Cu Cr Mn Mo Ni P Si Sn Ti V W	DCP	Reactores teflón 60mL
Materiales orgánicos e inorgánicos	Al As Ca Cr Fe I Mg Mn P Ti Se V	ICP	Reactores teflón 20mL o Recipientes de cuarzo 10mL
Silicatos	Ba Li Sr	ICP	Reactores de teflón PFA 15mL
Silicatos	Al Ca Fe K Mg Mn Na P Si	DCP	Reactores polipropileno 125mL
Cenizas de carbón	As Cd Pb Sb Se Tl	ETAA	Reactores teflón PFA
Carbón	Fe Ni V	ETAA	Tubos de ensayo pyrex 200mL
Aleaciones matriz compleja Ni-Cr-Al-Y, Fe-Cr-Al-Y, Co-Cr-Al-Y	Y	ICP	Reactores policarbonato 250mL
Aceros	-	ICP	-

CONDICIONES DE DIGESTION

REFERENCIA

1g con 3mL HNO₃ , 3mL HCl y 2mL HF
(80min 625w)

Fernando y col. 1986

30mg con HCl, HCl + HF, HNO₃ y
mezclas de HNO₃ + HCl

Buresch y col. 1987

100mg con 0,5mL HCl, 1mL HF y 0,5mL
HClO₄

Kojima y col. 1987

100mg con 4mL HF, 3mL agua regia

Quezada y col. 1987

250mg con 5mL HF, 15 mL agua regia

Bettinelli y col.
1988

100-1150mg con 5mL HNO₃ y 2mL HClO₄

Alvarado y col.
1988a, 1990

0,2-1,0g con 10mL HCl + 5mL HNO₃ +
3mL HF + (15min 210w)

Vozzella y Condit
1988

HNO₃-HCl-HF (20-50 min)

Chang y col. 1990

AALL: Absorción atómica con llama.

HAA: Generación hidruros-AA.

ETAA: Cámara de grafito.

CVAA: Vapor frío-AA.

EA: Espectrometría de emisión atómica.

FIA-AA: FIA-AA

ICP: Espectrometría de emisión atómica de plasma de inducción acoplada.

ICP-MS: ICP-Espectroscopía de masas.

DGP: Plasma de corriente directa.

UV: Ultravioleta-visible.

FA: Espectrometría de fluorescencia atómica.

P: Polarografía.

VA: Voltametría anódica.

DI: Dilución isotópica.

AN: Análisis activación neutrónica.

Como se puede observar en la digestión de muestras biológicas, la utilización de digestiones a presión permite la recuperación completa de los elementos metálicos con una mezcla de HNO_3 y H_2SO_4 a 700w y en 1 minuto (Aysola y col. 1987); además, otras muestras más resistentes al ataque de los ácidos pueden ser digeridas rápidamente en estos sistemas.

El peso de muestra recomendado para la digestión a presión varía entre 25 mg y 25 g y el volumen de los reactores empleados entre 7 y 250 mL, siendo éstos usualmente de teflón. El tiempo de digestión requerido está comprendido entre 1 y 30 minutos, excepto para algunas muestras geológicas para las que Fischer (1986) recomienda utilizar una potencia baja y un período de tiempo largo (incluso 5 horas).

Cuando se utilizan recipientes a presión la recuperación del Cr, B, Pb y Si es muy buena. Sin embargo, la recuperación del Al a partir de minerales alumino-silicatos y la recuperación del Si a partir de muestras que contienen cuarzo son muy malas. La recuperación de estos últimos elementos se incrementa cuando disminuye el tamaño de partícula de la muestra (Fischer 1986). En general, los minerales como el cuarzo, corindón, circón y rutilo no se disuelven con una mezcla de HNO_3 , HCl y HF trabajando en un horno de microondas con botes sellados de policarbonato durante 15min a 650w.

La digestión a presión es el método más rápido para el tratamiento de muestras biológicas en horno de microondas y es aplicable para la determinación de Ni y Cu en minerales (Smith y col. 1985) y para Pb y U en algunas matrices geológicas, incluyendo los compuestos de circonio menos estables (Fischer 1986).

La digestión ácida de muestras de aceros con HNO_3 , HF y HCl proporciona la recuperación total de Al, As, Cu, Cr, Mn, Mo, Ni, P, Si, Sn, Ti, V y W en 80s (Fernando y col. 1986). Los minerales sulfurosos pueden disolverse en reactores de teflón PFA con KClO_4 , HNO_3 y HF (Smith y col. 1985a); y los silicatos se pueden disolver con HF y agua regia (Quezada y col. 1987), y también con HCl, HF y HClO_4 (Kojima y col. 1987).

En resumen, la digestión en horno de microondas parece un procedimiento general de preparación de muestras biológicas para su análisis y puede utilizarse para otras matrices, habiéndose producido, en los últimos años una auténtica eclosión de las publicaciones sobre el tema.

La digestión en microondas también se ha aplicado a los métodos de análisis en flujo continuo FIA-AAS por algunos autores (Burguera M. y Burguera J.L. 1986; Burguera M. y col. 1986; Burguera J.L. y col. 1987; Burguera M. y col. 1987; Burguera M. y Rondón 1987), y por nuestro grupo de trabajo (de la Guardia y col. 1988) en el que se han llevado a cabo determinaciones "on line" (Carbonell y col. 1990).

II.0.2.- Empleo de suspensiones para la introducción directa de muestras en espectroscopía atómica.

El hecho de que, en algunos casos, las digestiones que se llevan a cabo en hornos de microondas, aunque permiten la extracción completa de los elementos a determinar no llegan a producir la destrucción total de la matriz, revaloriza el empleo de las suspensiones en el análisis por espectroscopía atómica; ya que la introducción directa de suspensiones de las muestras digeridas puede reducir los tiempos de digestión al no requerir la destrucción completa de las muestras.

A continuación se revisan algunos conceptos referentes al empleo de suspensiones o "slurries".

II.0.2.1.- Aspectos generales del análisis directo de sólidos.

El análisis directo de sólidos permite la disminución del tiempo de preparación de la muestra, al poderse eliminar el paso de descomposición del sólido. El riesgo de contaminación y de pérdidas del elemento a determinar también se reduce enormemente debido a que es factible llevar a cabo el análisis sin adición de ningún reactivo y eliminar pasos tales como separación y/o concentración de la muestra.

No obstante, el análisis directo de sólidos por espectroscopía de absorción atómica también presenta algunos inconvenientes, ya que aunque este tipo de análisis consume cantidades pequeñas de muestra, no deja de ser un método destructivo, y por otra parte, se pueden producir errores debido a esta pequeña cantidad de muestra utilizada. También se suelen producir errores sistemáticos en la medida de la absorción como consecuencia de las interferencias producidas principalmente por la matriz del sólido o por la deficiente atomización de las muestras sólidas.

Ya que las partículas sólidas o líquidas de la matriz producen una absorción de fondo considerable, se deben emplear tanto lámparas de deuterio, que actúan entre 180-350 nm, como lámparas de wolframio que compensan la radiación de fondo desde 300 hasta 800 nm para disminuir el efecto de la absorción inespecífica.

La señal obtenida en el análisis directo de sólidos por espectroscopía de absorción atómica depende de la velocidad de formación y desaparición de átomos libres que, fundamentalmente, son función del tipo de matriz. Por este motivo se deben utilizar patrones con una composición similar a la de las muestras (Van Loon, 1980).

Los primeros trabajos que utilizaron este tipo de metodología introducían los sólidos directamente en el

sistema de atomización, bien en recipientes, o como recubrimiento de un vástago rígido que se introducía en la llama (Govindaraju y col. 1971). Sin embargo, se alcanzaban temperaturas en las llamas relativamente bajas y sólo se lograban determinar los elementos más volátiles.

En un intento por determinar elementos menos volátiles, Venghiattis (1967) empleó mezclas de las muestras en polvo con un combustible sólido, introduciéndola en la llama, si bien la reproducibilidad de este método no fue satisfactoria.

Sin embargo, la mayoría de los métodos propuestos para el análisis directo de muestras sólidas por absorción atómica poseen mala precisión y dificultades de estandarización. En este tipo de análisis se considera como normal una desviación típica del 5 al 10% para elementos con concentraciones de alrededor de 1 ppm y del 10 al 30% para elementos con concentraciones a nivel del 1 ppb (Langmyhr y Wibetoe, 1985); en consecuencia, este procedimiento no se recomienda cuando se quieren determinar los elementos con un alto grado de precisión.

II.0.2.2.- Empleo de suspensiones.

El empleo de suspensiones para la introducción de muestras se presentó como una alternativa a la introducción

directa de sólidos. Encontró al principio su más directa aplicación en el análisis de metales de desgaste en lubricantes, aceites hidráulicos y grasas usadas, donde únicamente se diluye la muestra en un disolvente orgánico (para disminuir la viscosidad de la matriz) y la suspensión se aspira directamente en la llama. En estas muestras los metales se encuentran en suspensión; como partículas, por lo que la eficiencia de la aspiración y la atomización en la llama depende en gran medida del tamaño de éstas (Langmyhr, 1979; Langmyhr y Wibetoe, 1985).

Lacourt y col. (1971), en muestras geológicas y Willis (1975) en partículas metálicas de Cu, Fe y Ag estudiaron la eficiencia de atomización de estas partículas en suspensión en agua o en mezclas de disolventes orgánicos aspirándolas directamente en la llama, y llegaron a la conclusión de que el tamaño de las partículas influye sobre la eficiencia de atomización, obteniendo una buena atomización hasta partículas de 1 μm de diámetro.

Langmyhr (1979) cita varios trabajos que hacen uso de esta técnica en los que se llega a la conclusión de que las partículas más grandes no se evaporan totalmente, con lo que no se obtienen resultados cuantitativos.

No obstante, las medidas son rápidas y sencillas y el método se emplea ampliamente para análisis semicuantitativos

de los metales de desgaste de los motores. Además, se consiguen valores con una exactitud suficiente para muestras geoquímicas (Willis, 1975).

En los últimos años esta técnica se ha utilizado para la determinación de As, Bi, Sb, Te, Tl y V en lodos de depuradoras (Kempton, 1982), de Cu, Fe, Mg y Mn en suspensiones de suelos (Stupar y Ajlec, 1982), de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn y Zn en suspensiones de cenizas de materia vegetal (Fagioli y col., 1983; Fagioli y Landi, 1983), de Cu, Mn y Zn en homogeneizados de tejidos animales (Mohamed y Fry, 1981).

A pesar del aumento en el empleo de esta técnica, Langmyhr y Wibetoe (1985) exponen que el principal inconveniente del procedimiento es la imposibilidad de evaporar y atomizar las partículas más grandes de la muestra en la llama, no recomendándolo cuando se necesite un alto nivel de exactitud, en beneficio de la atomización en celdas sin llama.

La escuela del profesor Ebdon (Ebdon y Wilkinson, 1987) ha propuesto un método de trituración previa de las muestras, en recipientes de poliestireno, utilizando bolas de óxido de circonio para obtener un tamaño de partícula adecuado y garantizar una eficiente atomización de los elementos a determinar en la llama; si bien, la técnica en la que han logrado unos mejores resultados es el plasma de emisión ICP.

Además, para la mayoría de las matrices, el tiempo de trituración de las muestras requerido es del orden de 2 ó 3 horas si se desean partículas inferiores a 8 μm de diámetro, o de 24 horas si se precisan inferiores a 3 μm (Norman y Ebdon, 1987).

A pesar de todos los inconvenientes señalados, el empleo de las suspensiones como forma de introducir las muestras en los sistemas de atomización no solo ofrece la ventaja de evitar una digestión previa de las muestras; acoplada a procedimientos rápidos de extracción de los elementos a determinar puede evitar, como ya se ha indicado, las operaciones de filtrado o centrifugación, obviando los problemas prácticos de manipulación de disoluciones fuertemente ácidas y evitando los riesgos de retención de los elementos disueltos por los restos de la matriz.

También se han utilizado los hornos de microondas para acelerar la adsorción de algunos elementos sobre soportes sólidos, con el fin de preconcentrarlos para su análisis posterior. Kubrakova y col. (1989) y Kuz'min y col. (1990) han determinado Pd y Rh, y Pt y Rh respectivamente, en cámara de grafito a partir de suspensiones de estos sólidos, estabilizados en glicerol.

Utilizando la introducción de suspensiones, previo tratamiento de las muestras, se han propuesto métodos para la

determinación de elementos alcalinos y alcalinotérreos en leche en polvo (de la Guardia y col., 1986) y para la determinación del Ca en alimentos en polvo que son independientes del tamaño de partícula (Salvador y col., 1988; la muestra se pone en suspensión con agua destilada, tras un tratamiento previo con HNO_3 para solubilizar los elementos, introduciéndose la suspensión directamente en la llama. Los resultados obtenidos son coincidentes con los encontrados en una experiencia paralela de calcinación de la muestra. La última tendencia en este sentido es la utilización de las suspensiones, previa digestión ácida, en la determinación de elementos metálicos mediante inyección en flujo continuo que ha sido llevada a cabo por nuestro grupo de trabajo (Martinez-Avila y col. 1990; Carbonell y col. 1990).

II.1- DIGESTION DE LODOS.

II.1.1.- Objetivos.

Se ha tratado de poner a punto un método para la digestión en horno de microondas de lodos de depuradora para determinar, posteriormente, los elementos presentes en los mismos.

Se ha escogido este tipo de muestras por las dificultades de disolución que presentan mediante digestión convencional dado su doble naturaleza orgánica e inorgánica.

Los elementos metálicos (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn) se han determinado por espectrometría atómica con llama, comparando los resultados obtenidos en el análisis de muestras de referencia con sus valores certificados.

II.1.2.- Introducción.

II.1.2.1.- Origen y composición de los lodos.

Los lodos son compuestos sólidos, con un alto componente orgánico, que se obtienen en el proceso de la depuración de aguas residuales. Según el tratamiento a que son sometidos se pueden clasificar en cuatro tipos:

- Lodos primarios: sólidos que se obtienen al dejar sedimentar las aguas residuales en el decantador primario.

- Lodos secundarios: posos que quedan en el decantador secundario tras un proceso de activación, por aireación prolongada o mediante lechos bacterianos, del agua procedente del decantador primario.
- Lodos de digestión aerobia: son lodos primarios y mixtos (mezcla de lodos primarios y secundarios) estabilizados aeróbicamente.
- Lodos de digestión anaerobia: obtenidos a partir de los lodos primarios y mixtos por estabilización anaerobia.

Además del agua, un componente importante de los lodos es la materia orgánica; de ahí que estos residuos presenten un alto interés como enmiendas de los suelos. El contenido medio de materia orgánica sobre materia seca de los lodos de depuradora oscila entre el 30 y el 50% (Sommers, 1977). El resto de la materia seca lo constituyen sales minerales, alcalinas, alcalino-térreas y los metales de transición.

Las especies metálicas presentes en los lodos pueden considerarse como una fuente importante de microelementos esenciales para las plantas. En los lodos frescos los metales pesados se encuentran en un equilibrio inestable entre las formas solubles e insolubles, dependiendo tanto de la naturaleza del lodo, como del estado del metal (potencial

redox, pH, dureza, presencia de fosfatos y sulfatos), aunque fundamentalmente se encuentran en la fracción sólida de los lodos.

El contenido total de elementos pesados varía enormemente en función de la procedencia de los lodos. Obviamente los lodos de origen industrial contienen una concentración de metales más alta que los lodos de origen doméstico. En algunos casos los contenidos de metales pesados son tan elevados que pueden provocar efectos tóxicos tanto en plantas como en animales.

En la tabla II.4 se indica el intervalo en ppm de metales pesados contenidos tanto en lodos de depuradora como en suelos.

TABLA II.4: Intervalo de concentraciones de los elementos pesados en lodos de depuradora (Sommers, 1977) y en suelos (Bowen, 1966).

ELEMENTO	INTERVALO (ppm)	
	LODOS	SUBLOS
Cd	3 - 3410	0.01 - 0.7
Cu	84 - 10400	2 - 100
Fe	1000 - 153000	7000 - 550000
Mn	18 - 7100	100 - 4000
Pb	13 - 19700	2 - 200
Zn	101 - 27800	10 - 300

II.1.2.2.- Métodos de extracción de elementos metálicos en lodos para su determinación por espectrometría de absorción atómica con llama.

A pesar de que existen otros muchos métodos, debido a lo complejo de las matrices de lodo, los más utilizados para determinar elementos metálicos en lodos son los basados en la espectrometría atómica de emisión y de absorción; siendo la absorción atómica con llama la técnica más ampliamente extendida.

Para la determinación de elementos metálicos por absorción atómica con llama se precisa, en general, una disolución previa de las muestras o una extracción de los elementos a determinar.

Para que un método de extracción sea apropiado se deben considerar los siguientes aspectos: concentración de los elementos a determinar, precisión, exactitud, recuperación de las disoluciones patrón digeridas, recuperación de alícuotas de un patrón añadidas a las muestras, consumo de tiempo y seguridad en el laboratorio.

No existe ningún procedimiento general reconocido para el tratamiento de las muestras de lodos para el análisis de los metales pesados por absorción atómica con llama. El método de extracción ideal debería cumplir unos requisitos

mínimos: disolver todos los metales aunque haya sílice en la muestra, destruir la materia orgánica de la muestra y no introducir iones interferentes.

Para la descomposición de la materia orgánica en la determinación de elementos metálicos en muestras ricas en sustancias orgánicas se utilizan fundamentalmente dos técnicas:

- Calcinación ("dry ashing") en un intervalo de temperaturas entre 350 - 500°C (Gorsuch, 1970).
- Digestión ácida ("wet ashing") usando diferentes ácidos o mezclas de ácidos (Van Loon, 1985).

Las técnicas de calcinación permiten una dilución menor de las muestras, evitando además el problema de utilizar, en los métodos de medida, disoluciones fuertemente ácidas (Dahlquist y Knoll, 1978). No obstante, se obtienen recuperaciones malas para elementos como el Fe, Al y Cr, así como pérdidas apreciables de elementos volátiles como Hg, As, Se y Pb (Ward y col. 1980).

La utilización de las técnicas de digestión ácida disminuye el riesgo de pérdidas por volatilización (Allen, 1984), sin embargo requiere una mayor atención por parte del operador y una dilución mayor de las muestras.

Empleando una combinación de ambas, llevando a cabo la calcinación a temperaturas bajas y añadiendo ácidos minerales (Hill y col. 1986), se consigue evitar alguno de estos problemas, sin embargo permanece el inconveniente del consumo de tiempo y lentitud de este tipo de técnicas.

Rosopulo y Scholl (1978) han comparado dos métodos de extracción de metales pesados: incineración a 450°C seguido de un tratamiento con HCl y redisolución con HNO₃ y digestión utilizando una mezcla de ácidos H₂SO₄, HNO₃ y HClO₄ llegando a la conclusión de que éste último era mejor que la incineración en seco.

Jennis y col. (1980) llegaron a la conclusión de que la digestión de los lodos de depuradoras con HNO₃ en reactores a presión o con una mezcla de HNO₃ y H₂O₂ proporciona recuperaciones más altas que la incineración o la digestión convencional con HNO₃ para la determinación de Cd y Pb por absorción atómica con llama.

Grabner y col. (1980) encontraron que la incineración a 500°C y disolución con HNO₃ daba unos valores de concentración más bajos que la digestión con agua regia o la digestión con HNO₃ y HClO₄.

De los cuatro métodos comparados por Katz y col. (1981) la calcinación aparece como el método menos eficiente para la

recuperación de los elementos. Consiguiéndose mejores resultados mediante digestión con HNO_3 en reactores a presión, digestión con HNO_3 y H_2O_2 o simplemente digestión con HNO_3 .

Christensen y col. (1982) compararon cuatro métodos de digestión para la determinación de Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn en muestras de lodos por espectrometría de absorción atómica: -calcinación seguida de digestión con agua regia, -digestión con agua regia, -digestión con HNO_3 , -digestión con HNO_3 seguida del tratamiento del residuo con H_2SO_4 y calcinación. Estos autores concluyen que el mejor método de digestión de lodos de depuradoras para las medidas rutinarias de los metales por absorción atómica es el tratamiento con HNO_3 .

Sin embargo Marchandise y col. (1982) obtuvieron los mejores resultados en la preparación de lodos de depuradoras y sedimentos de río para la determinación de Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn por absorción atómica con llama mediante un método que incluye calcinación a 550°C y lixiviación con una mezcla de HCl y HF.

En 1983 Smith realizó un estudio de 6 pretratamientos de lodos previo al análisis por espectrometría de absorción atómica de los elementos Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn: -Calcinación a 500°C seguida de extracción con HCl diluido,

-calcinación a 500°C seguida de tratamiento con agua regia,
-calcinación a 550°C con $Mg(NO_3)_2$ seguida de digestión con HCl y extracción con HNO_3 , -digestión con HNO_3 seguida por extracción con HCl, -extracción con agua regia, -extracción con HNO_3 .

En este estudio se llegó al convencimiento de que la digestión directa con ácidos minerales y/o los métodos de extracción proporcionan generalmente recuperaciones mejores que los procedimientos que implican calcinación de la muestra, a excepción del Al, que requiere un pretratamiento más drástico. De todos los métodos ensayados, la extracción directa con agua regia se reveló como el método más rápido y sencillo como pretratamiento de muestras para el análisis en lodos de todos los elementos estudiados.

Con agua regia a reflujo se obtiene una extracción mínima del 80% de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en lodos y en suelos tratados con lodos. Análisis de muestras de suelos de referencia canadienses no contaminados confirmaron este porcentaje de extracción mínimo para Cd, Fe y Zn (Berrow y Stein, 1983).

En unos trabajos posteriores Bocharov y col. (1986) concluyen que la preparación más adecuada de las muestras (lodos, suelos y plantas) para la determinación de Cd, Cr, Mn, Ni, y Pb consiste en la calcinación a 500-550°C durante

2-2'5 horas y disolución del residuo en HCl:H₂O (1:1) conteniendo HNO₃ o HF.

El desarrollo de procedimientos de digestión bajo presión (Uchida y col. 1981; Brzezinska y col. 1984) o los métodos de extracción ácida bajo condiciones energéticas de presión y temperatura (Solchaga y col. 1986) han reducido drásticamente el tiempo de preparación de la muestra. No obstante, en estos casos es necesario un tiempo mínimo de 1 ó 2 horas para la descomposición o extracción ácida.

Con una mezcla de HF, HNO₃ y HClO₄, cuya proporción en HF depende del contenido de SiO₂ en la muestra, se extrae completamente el Pb de sedimentos de diferente naturaleza (Casas y col. 1990), con un tiempo de digestión comprendido entre 1 y 6 horas en función de la temperatura a la que se realiza el proceso.

Otros métodos alternativos, como por ejemplo el uso de disoluciones alcohólicas de hidróxido tetrametilamónico (TMAH), permiten la solubilización de cantidades pequeñas de algunos tejidos o de muestras orgánicas a temperaturas bajas. Sin embargo, este método necesita un mínimo de 2 horas para la descomposición de 1 gramo de tejido (Cross y Parkinson, 1974). Además, este método no es adecuado para la disolución de muestras con una parte mineral. Por el contrario, la utilización de un horno de microondas permite digestiones de

muestras biológicas muy rápidas, disminuyendo el tiempo requerido hasta uno o varios minutos y puede utilizarse para la digestión de suelos y minerales.

Algunos autores han propuesto recientemente la utilización de los hornos de microondas para la digestión, tanto en recipientes abiertos como a presión, de sedimentos, suelos y lodos.

Lamothe y col. (1986) han determinado 42 elementos en 51 materiales geológicos de referencia. El proceso de digestión consistía en la disolución de 0,1 g de muestra con una mezcla de HF-HNO₃-HCl en reactores de policarbonato a presión durante un tiempo total de irradiación de 13 minutos aplicando una potencia de 650w.

Bettinelli y col. (1987, 1989) han determinado 25 elementos en muestras certificadas de lodos de depuradora de distinto origen. Pesaban 0,25 g de muestra en reactores de teflón PTFE a presión de 125 mL, añadían 5 mL de HF y 25 mL de agua regia e irradiaban durante un tiempo total de 25 minutos aplicando potencias del 50 y 100%. Tras la digestión no obtenían la disolución completa de las muestras, por lo que filtraban el residuo producido. Los valores encontrados para Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn fueron muy buenos, así como satisfactorios los obtenidos para los elementos mayoritarios Al, Ca, Fe, K, Mg y Ti.

Mahan y col. (1987) han propuesto un método para la extracción secuencial, en recipientes abiertos, de distintos elementos contenidos en sedimentos empleando un horno de microondas doméstico. La recuperación de todos los elementos con una mezcla de $\text{HClO}_4/\text{HF}/\text{HCl}/\text{HNO}_3$ en horno de microondas osciló entre el 62%-120% frente al 76%-120% obtenido para el procedimiento convencional. Para todos los elementos la recuperación fué aceptable a excepción del Fe (62% obtenido por el método de microondas frente al 76% alcanzado por el convencional).

Nakashima y col. (1988) han determinado As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se y Zn en sedimentos utilizando una mezcla de HNO_3 -HF- HClO_4 para la digestión de 0,2g de muestra, obteniendo resultados exactos y precisos.

También se ha determinado As en suelos, reduciendo el tiempo de digestión desde 15 h, por el procedimiento convencional, hasta 2 h empleando un horno de microondas (Huang y col. 1988). Los resultados hallados estaban en concordancia con los obtenidos por el método convencional.

Xu y Shen (1989) han empleado entre 3 y 5 minutos para digerir muestras de suelos y sedimentos en horno de microondas. Utilizaban una mezcla de HNO_3 , H_2O_2 y HF en reactores de teflón PTFE a presión aplicando una potencia de

500w. Dependiendo del número de reactores en el horno de microondas encontraban diferencias en el porcentaje de recuperación durante un mismo tiempo de exposición.

En un intento por desplazar a los tediosos métodos convencionales, Kammin y Brandt (1989) han comparado la digestión en horno de microondas con el procedimiento EPA 3050, encontrando que el procedimiento propuesto es preciso, exacto, y en la extracción de algunos elementos más cuantitativo que el método convencional.

Kratochvil y Mamba (1990) también han comparado un método convencional de digestión con la digestión en horno de microondas, obteniendo los mismos valores de concentración para el Cu y Zn en muestras de suelo, si bien, por el método de microondas no obtienen la disolución completa de la muestra, quedando un residuo insoluble.

En general, se puede apreciar que en la literatura reciente ya se ha logrado imponer la digestión en horno de microondas como una alternativa clara para la preparación de las muestras de lodos de depuradora para su análisis por técnicas atómicas. A esto ha contribuido, entre otros, el trabajo realizado por nuestro grupo; del que habría que destacar el empleo de unas condiciones de digestión muy poco agresivas, pero suficientes, para garantizar la recuperación total de los elementos estudiados.

II.1.3- Parte experimental.

II.1.3.1.- Aparatos y reactivos.

Espectrómetro de absorción atómica PELKIN-ELMER, modelo 3030B, equipado con lámparas de cátodo hueco monoelementales de Cd y Pb, lámpara de cátodo hueco multielemental de Cu, Fe, Mn y Zn, lámpara de deuterio, como corrector de fondo, e impresora modelo PR-100.

Las condiciones de medida empleadas para la determinación de cada elemento son las indicadas en la tabla II.5.

TABLA II.5: Condiciones de medida en absorción atómica para los elementos estudiados.

Elemento	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
Longitud de onda (nm)	228.8	324.8	248.3	279.5	283.3	213.9
Rendija (nm)	0.7	0.7	0.2	0.2	0.7	0.7
Tipo de llama	Aire/Acetileno, oxidante (pálido, azul)					
S. nebulizador	—————		Bola de impacto		—————	
Técnica	AA-BG	AA	AA	AA	AA-BG	AA-BG
Intensidad (mA)	4	25	25	25	10	25
Tiempo integración (s)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

AA-BG: Medida con corrector de fondo.

Balanza analítica SARTORIUS, modelo A120S; precisión de ± 0.0001 g.

Horno de microondas BALAY modelo BAHM-100 con una frecuencia de 2450 MHz y una potencia de salida máxima de 650w, y una estufa de secado P/Selecta, modelo 210 (220v, 1000w).

Como reactores para llevar a cabo la digestión en horno de microondas se emplearon frascos de vidrio pyrex con junta de teflón y tapones resistentes a alta temperatura de 50 y 100 mL de capacidad SCHOTT DURAN.

Acido nítrico Merck, R.A. (65%). Se emplearon etanol Panreac, R.A. (96% v/v) y 2-octanol Merck, R.A., como antiespumantes.

Disoluciones patrón monoelementales de 1000ppm \pm 1% Fisher Scientific Company de los elementos Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn. A partir de las disoluciones anteriores se preparan los patrones en medio nítrico mediante diluciones adecuadas, con los siguientes intervalos de concentración para cada elemento en ppm: Cd (0.1-1), Cu (1-10), Fe (0.5-5), Mn (1-5), Pb (1-12) y Zn (0.1-1).

Las disoluciones patrón al 1% (v/v) en nítrico se renovaron cada tres o cuatro días.

Material de vidrio volumétrico contrastado. El material se mantenía en HNO_3 al 10% y para su uso se enjuagaba varias veces con agua destilada. Después de su utilización se limpiaba con jabón, se volvía a enjuagar con agua destilada y se introducía en HNO_3 al 10%.

II.1.3.2.- Procedimiento general.

II.1.3.2.1.- Preparación de los patrones.

Se han utilizado varios tipos de patrones. Inicialmente se usaron patrones monoelementales con distinta proporción de ácido, dependiendo del porcentaje del mismo en la muestra para cada elemento medido, y preparados por adición de volúmenes, ya que las muestras se obtenían adicionando a la muestra digerida un cierto volumen de agua.

Se compararon las características reológicas de las muestras en suspensión y de patrones acuosos con una proporción de ácido equivalente, determinando sus caudales de alimentación, pretendiéndose con ello cuantificar los errores que podría implicar el uso de patrones sin carga.

Puesto que el empleo de patrones monoelementales con una acidez igual a la de las muestras era muy laborioso y se consumían grandes cantidades de ácido, se consideró la

posibilidad de preparar patrones multielementales con un porcentaje de acidez del 1%, para su conservación, para lo cual se estudió previamente el efecto de la concentración de HNO_3 sobre la absorbancia de los patrones de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn.

Se estudió la variación de la absorbancia en función de la cantidad de ácido utilizando patrones multielementales de igual concentración para cada elemento y distinta proporción de ácido.

Por último se estudió la influencia que ejerce la presencia de los demás elementos sobre cada uno en particular comparando las lecturas de absorbancia correspondientes a patrones monoelementales y multielementales con la misma acidez.

II.1.3.2.2.- Estudio de las condiciones de digestión de las muestras.

Se ha estudiado la determinación de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en lodos de depuradora.

Las muestras, finamente trituradas, se digieren en un horno de microondas empleando reactores de vidrio pyrex a presión. Una vez extraídos los elementos, el total de la

muestra se suspende, con o sin ayuda de un tensioactivo, y la suspensión se introduce directamente en la llama.

Se han estudiado de forma sistemática las condiciones de digestión y transporte de las muestras prestando atención al estudio de las variables del proceso de extracción ácida, puesta en suspensión y análisis y a los parámetros analíticos de los procedimientos desarrollados, utilizando muestras certificadas para el control de la exactitud.

Para comprobar el efecto de los parámetros de digestión sobre la recuperación de los elementos metálicos que se han determinado se varía el tiempo de digestión, la potencia del horno de microondas, la cantidad de muestra pesada y el volumen de ácido añadido.

Las muestras, una vez digeridas, se diluyen por adición de un volumen adecuado de agua destilada y se agitan para obtener una dispersión lo más homogénea posible. Dicha dispersión se alimenta directamente en el aparato de absorción atómica.

Para el análisis de las muestras se utilizaron patrones multielementales al 1% en HNO_3 .

II.1.4.- Resultados y discusión.**II.1.4.1.- Comportamiento de los patrones.**

La introducción directa de suspensiones de las muestras, parcialmente digeridas con un volumen apreciable de ácido, obliga a comparar la efectividad del empleo de patrones acuosos, totalmente disueltos, para el análisis de las mismas; así como establecer la influencia de la concentración de ácido sobre las señales analíticas y la interacción entre los elementos a determinar.

II.1.4.1.1.- Comparación de las características reológicas de muestras en suspensión y patrones acuosos.

Se han determinado los caudales de alimentación de muestras en suspensión y de patrones acuosos, conteniendo una acidez equivalente a la de las muestras, en una misma sesión de trabajo, para poder cuantificar los errores que podría implicar el uso de patrones sin carga.

Los datos obtenidos se resumen en la tabla II.6 y en ella se observa que el valor medio de la relación de caudales no excede en ningún caso el 5% para proporciones de ácido inferiores al 40% y con una cantidad de sólido comprendida entre 0.2 y a 10 mg/mL.

Sin embargo, para una proporción de ácido del 40% y un contenido en sólidos de 20 mg/mL el caudal de aspiración de las muestras puede llegar a ser un 10% inferior al de los patrones acuosos. De ello se deduce que la presencia de una suspensión de la matriz parcialmente digerida no afecta excesivamente a las condiciones de transporte de las muestras y, habida cuenta de que el tratamiento previo tiene como objeto asegurar la puesta en disolución de los elementos a determinar, cabe pensar que el empleo de patrones acuosos es adecuado para la realización de este tipo de análisis.

TABLA II.6: Relación entre los caudales de aspiración de muestras en suspensión y patrones acuosos con distintos grados de acidez.

acidez (%)	mg/mL	Qs/Qa	n
0,4	0,212 ± 0,011	1,00 ± 0,02	38
4	2,13 ± 0,14	1,01 ± 0,03	13
8	4,17 ± 0,17	0,97 ± 0,04	39
20	10,5 ± 0,5	0,97 ± 0,04	43
40	20,6 ± 0,7	0,91 ± 0,07	12

mg/mL: Cantidad de sólidos en suspensión.

Qs/Qa: Cociente de los caudales de aspiración de muestras en suspensión y patrones acuosos.

(valor medio ± desviación típica).

n: número de medidas.

II.1.4.1.2.- Estudio del efecto de la concentración de ácido.

Se prepararon patrones multielementales con distintas proporciones de ácido, siendo el objetivo estudiar la variación de la absorbancia en función de la cantidad de HNO_3 . En la tabla II.7 se indican los resultados obtenidos.

TABLA II.7: Efecto de la concentración de ácido sobre la absorbancia de los elementos estudiados.

Elemento	Absorbancia media			
	Acidez			
	0.4 %	1.0 %	8.0 %	20.0 %
Cd(1)	0.147±0.002	0.148±0.002	0.148±0.001	0.146±0.002
Cu(2)	0.128±0.001	0.128±0.001	0.129±0.001	0.126±0.002
Fe(2)	0.079±0.001	0.079±0.002	0.081±0.001	0.080±0.002
Mn(1)	0.097±0.001	0.096±0.001	0.098±0.001	0.096±0.001
Pb(5)	0.093±0.001	0.094±0.001	0.095±0.002	0.095±0.001
Zn(0.5)	0.096±0.001	0.097±0.001	0.094±0.002	0.088±0.001

(n): concentración en ppm.

De esta tabla se concluye que en la mayoría de los casos la concentración de ácido no influye sobre el valor de absorbancia.

Para el Zn la absorbancia disminuye en los patrones conteniendo un 20% de HNO_3 , por lo que para este elemento habría que mantener la acidez de las muestras por debajo de este valor. En realidad, dada la elevada sensibilidad de la determinación del Zn por absorción atómica y su concentración en las muestras, en ningún caso se debe trabajar con muestras conteniendo por encima de un 8% en ácido.

II.1.4.1.3.- Estudio de los efectos interelementales.

Se ha comparado la absorbancia de cada elemento en los patrones multielementales con la correspondiente a patrones monoelementales con un mismo grado de acidez observando el efecto de los demás elementos sobre la absorbancia del elemento medido. En la tabla II.8 se resumen los datos obtenidos para un nivel de concentración del orden de los empleados en el análisis de muestras reales.

Observando los datos de la tabla se deduce que hay una buena concordancia entre las absorbancias de los patrones monoelementales y multielementales para el Fe, Mn, Pb y Zn. Por otro lado los valores para el Cu y Cd están dentro del intervalo de variación de estas medidas.

TABLA II.8: Efectos interelementales entre los elementos estudiados.

Elemento	Absorbancia Media	
	Patrón monoelemental	Patrón multielemental
Cd (20%) (1 ppm)	0.13 ± 0.04	0.146 ± 0.002
Cu (8%) (2 ppm)	0.12 ± 0.02	0.129 ± 0.001
Fe (0.4%) (2 ppm)	0.08 ± 0.01	0.079 ± 0.001
Mn (8%) (1 ppm)	0.09 ± 0.04	0.098 ± 0.001
Mn (20%) (1 ppm)	0.09 ± 0.02	0.096 ± 0.001
Pb (20%) (5 ppm)	0.10 ± 0.03	0.095 ± 0.001
Zn (0.4%) (0.5 ppm)	0.09 ± 0.03	0.096 ± 0.001

Entre paréntesis se indica la acidez en tanto por ciento de HNO₃ y la concentración de los elementos estudiados.

Hay que indicar que la diferencia en el valor de la desviación típica para los patrones mono y multielementales es debida a que los datos de los patrones multielementales se tomaron en una única sesión mientras que los de los patrones monoelementales se tomaron de distintas experiencias que tenían en común la proporción de ácido y la concentración del elemento.

No obstante y puesto que en las muestras se encuentran todos los elementos a la vez, se estimó la conveniencia de utilizar patrones multielementales.

Como resumen de estas experiencias se pueden destacar tres aspectos:

La utilidad del empleo de patrones acuosos para la determinación de los elementos estudiados en muestras en suspensión; cuando los elementos a determinar se encuentran en la fase acuosa.

La independencia de los valores de absorbancia respecto de la acidez de las disoluciones.

La equivalencia entre los valores de absorbancia de patrones monoelementales y multielementales.

II.1.4.2.- Estudio de las variables de digestión.

Siguiendo el procedimiento general, antes expuesto, se ha estudiado el efecto de las variables de digestión en horno de microondas sobre la recuperación de los elementos estudiados en una muestra de lodo procedente de la depuradora de Pinedo (Valencia).

II.1.4.2.1.- Efecto del tiempo de digestión.

En las tablas II.9 a II.14 y en las figuras II.1 a II.6 se indican los resultados obtenidos para varios ensayos independientes realizados para cada tiempo de digestión. En las tablas se indican los resultados obtenidos con reactores de diferente volumen, y en las gráficas, puesto que el volumen del reactor no parece afectar decisivamente al análisis, se agrupan todos los datos obtenidos con un mismo tiempo de digestión.

Los patrones utilizados fueron disoluciones monoelementales de cada elemento con un contenido en ácido igual al de las muestras una vez digeridas y diluidas.

Tabla II.9: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Cd.

tiempo (min)	concentración (ppm) ^a	
	50 mL ^b	100 mL ^b
1	9,4	8,8
2	7,9	9,0
2,5	11,8	12,4
3	9,1	7,1
5	10,7	10,8
6	9,9	9,8
7	8,8	5,5

a: media de 2 valores.
 b: volumen del reactor.

Figura II.1: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Cd.

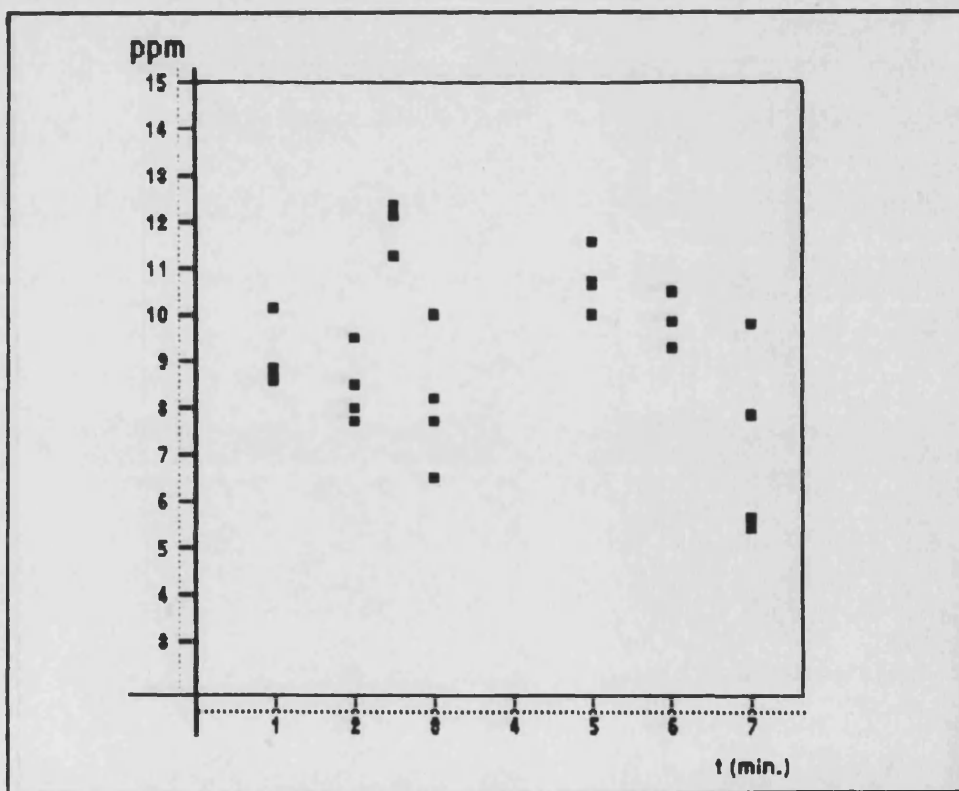


Tabla II.10: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Cu.

tiempo (min)	concentración (ppm) ^a	
	50 mL ^b	100 mL ^b
1	830	880
2	882	870
2,5	883	876
3	865	857
5	883	854
6	848	868
7	900	870

a: media de 2 valores.

b: volumen del reactor.

Figura II.2: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Cu

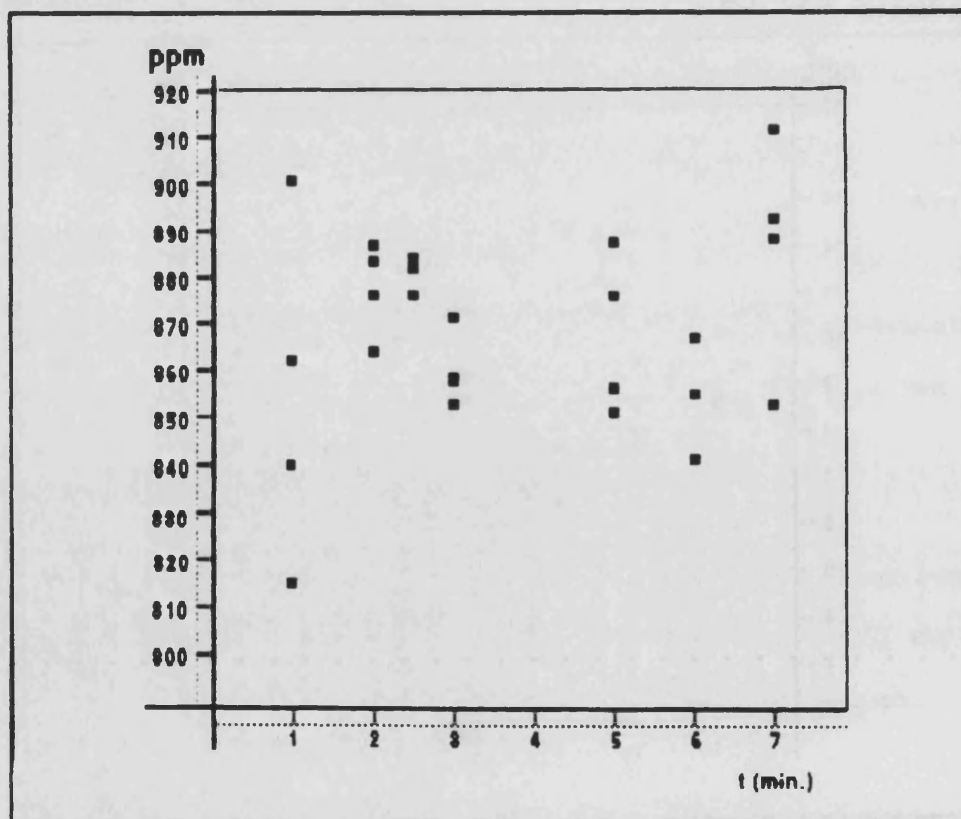


Tabla II.11: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Fe.

tiempo (min)	concentración (ppm)-	
	50 mL ^b	100 mL ^b
1	7300	6830
2	8900	7300
2,5	8500	7400
3	7200	7900
5	8000	8000
6	9000	6600
7	8200	7800

a: media de 2 valores.
 b: volumen del reactor.

Figura II.3: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Fe.

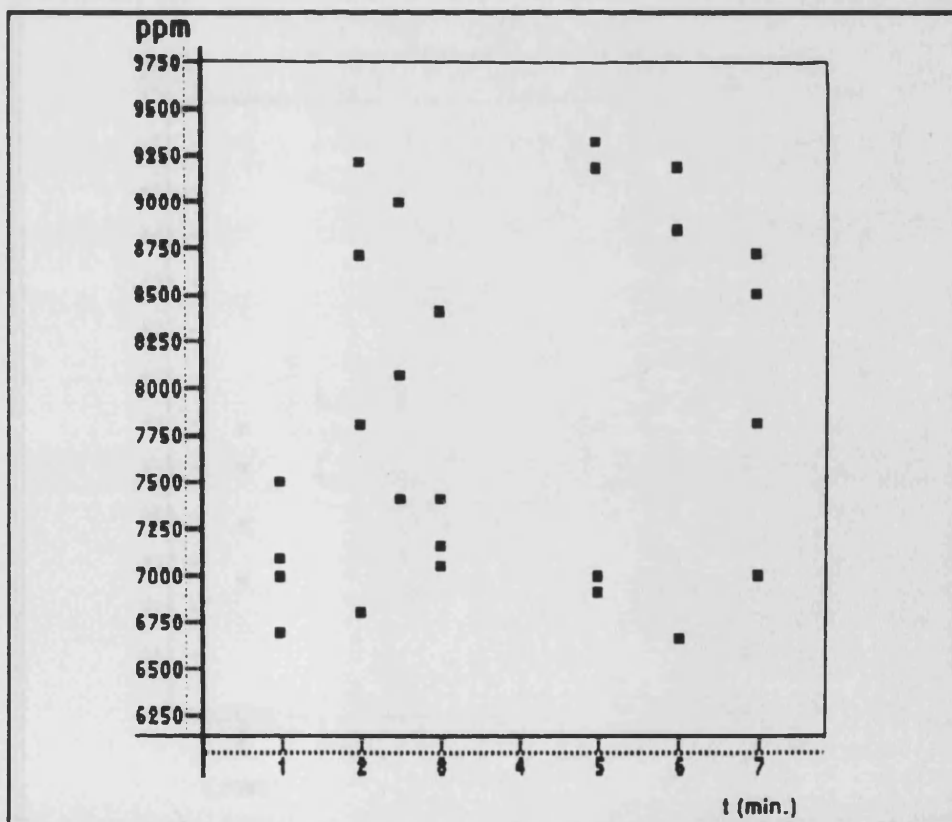


Tabla II.12: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Mn.

tiempo (min)	concentración (ppm)-	
	50 mL ^b	100 mL ^b
1	145	137
2	143	142
2,5	165	155
3	162	133
5	152	149
6	158	151
7	153	142

a: media de 2 valores.
b: volumen del reactor.

Figura II.4: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Mn.

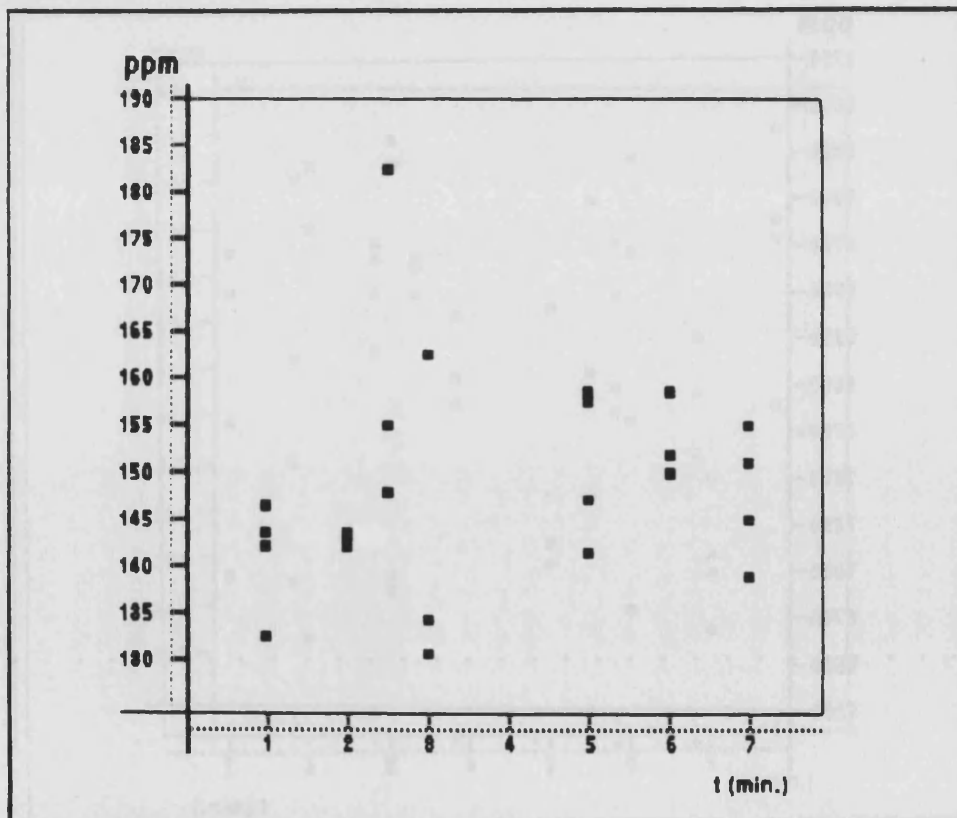


Tabla II.13: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Pb.

tiempo (min)	concentración (ppm) ^a	
	50 mL ^b	100 mL ^b
1	404	410
2	430	430
2,5	406	392
3	399	390
5	420	413
6	420	436
7	380	380

a: media de 2 valores.

b: volumen del reactor.

Figura II.5: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Pb.

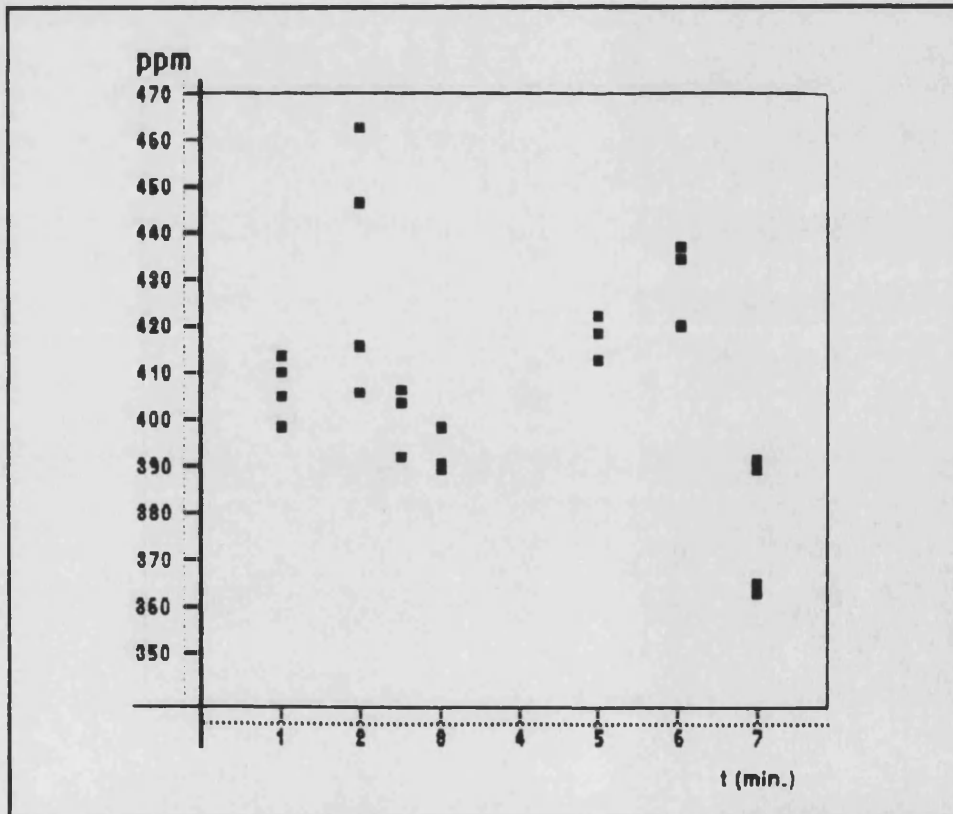


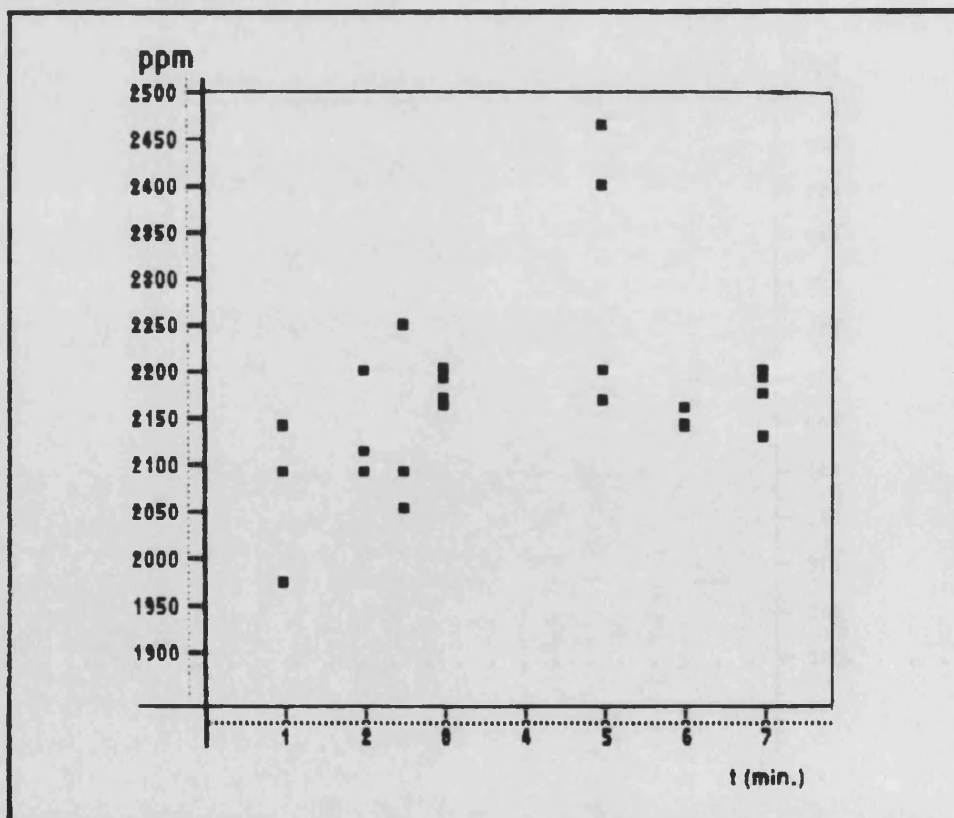
Tabla II.14: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Zn.

tiempo (min)	concentración (ppm) ^a	
	50 mL ^b	100 mL ^b
1	2140	2030
2	2200	2100
2,5	2170	2050
3	2180	2180
5	2300	2300
6	2160	2150
7	2180	2170

a: media de 2 valores.

b: volumen del reactor.

Figura II.6: Efecto del tiempo de digestión sobre la recuperación del Zn.



Los resultados obtenidos presentan una alta dispersión y no resulta fácil identificar una tendencia general de los mismos con el tiempo de digestión, si bien es cierto que entre 3 y 7 minutos se consiguieron las recuperaciones más altas para la mayoría de los elementos. En consecuencia parece que, mientras se mantenga la potencia en un valor suficientemente alto, el tiempo de digestión no es decisivo. Sin embargo, cuando se prolonga excesivamente el tiempo de digestión al máximo de potencia se producen efectos de sobrepresión en los reactores, especialmente en los de 50 mL, que pueden provocar la ruptura de los mismos.

II.1.4.2.2.- Efecto de la potencia de digestión.

En las tablas II.15 a II.20 y en las figuras II.7 a II.12 se indican los resultados obtenidos en ensayos independientes realizados para cada potencia de digestión. De nuevo la información recogida en las tablas permite apreciar el efecto del volumen del reactor y en las gráficas la tendencia de los datos con la potencia aplicada.

Al disminuir la potencia, la concentración obtenida para la mayoría de los elementos metálicos disminuye. Tal es el caso del Cd, Cu, Fe, Mn y Zn. En el caso del Pb, la elevada dispersión obtenida a valores de potencia del 20% y del 100% enmascaran la tendencia de los resultados.

Tabla II.15: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Cd.

Potencia (%)	concentración (ppm)-	
	50 mL ^b	100 mL ^b
20	9,4 ± 0,6	8 ± 1
40	9,1 ± 0,6	8,7 ± 0,5
60	10,2 ± 0,3	11,3 ± 0,7
80	11,3 ± 0,5	10,1 ± 0,7
100	11,3 ± 0,3	12 ± 1

a: media ± desviación típica, n = 3.

b: volumen del reactor.

Figura II.7: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Cd.

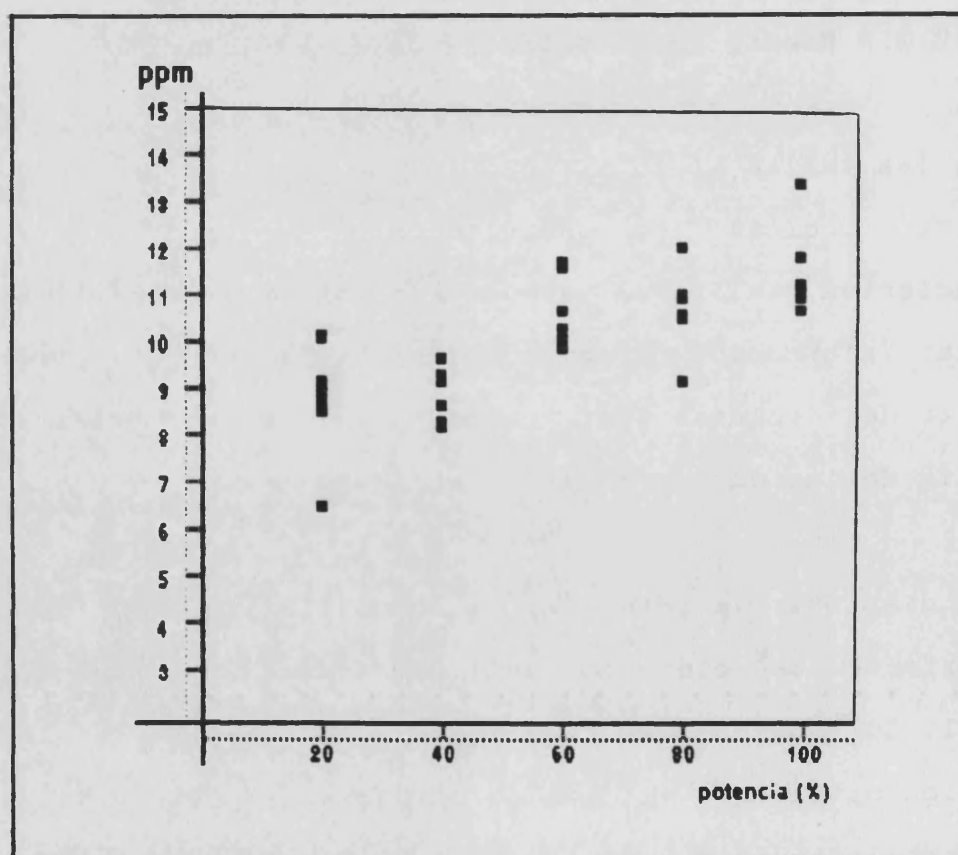


Tabla II.16: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Cu.

Potencia (%)	concentración (ppm)-	
	50 mL ^b	100 mL ^b
20	816 ± 7	821 ± 6
40	829 ± 2	823 ± 4
60	844 ± 5	847 ± 5
80	870 ± 20	845 ± 8
100	861 ± 6	877 ± 13

a: media ± desviación típica, n = 3.

b: volumen del reactor.

Figura II.8: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Cu.

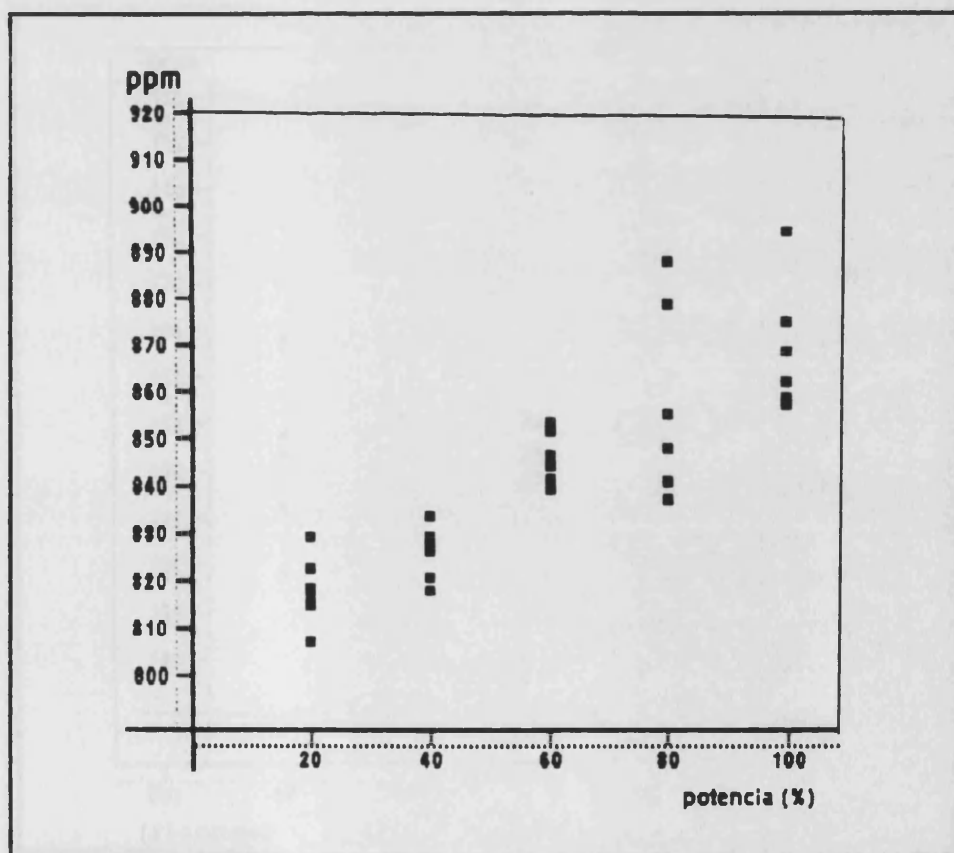


Tabla II.17: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Fe.

Potencia (%)	concentración (ppm) ^a	
	50 mL ^b	100 mL ^b
20	6420 ± 50	6410 ± 90
40	6630 ± 80	6620 ± 80
60	7910 ± 80	7820 ± 90
80	7600 ± 500	7900 ± 250
100	8900 ± 700	9300 ± 200

a: media ± desviación típica, n = 3.

b: volumen del reactor.

Figura II.9: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Fe.

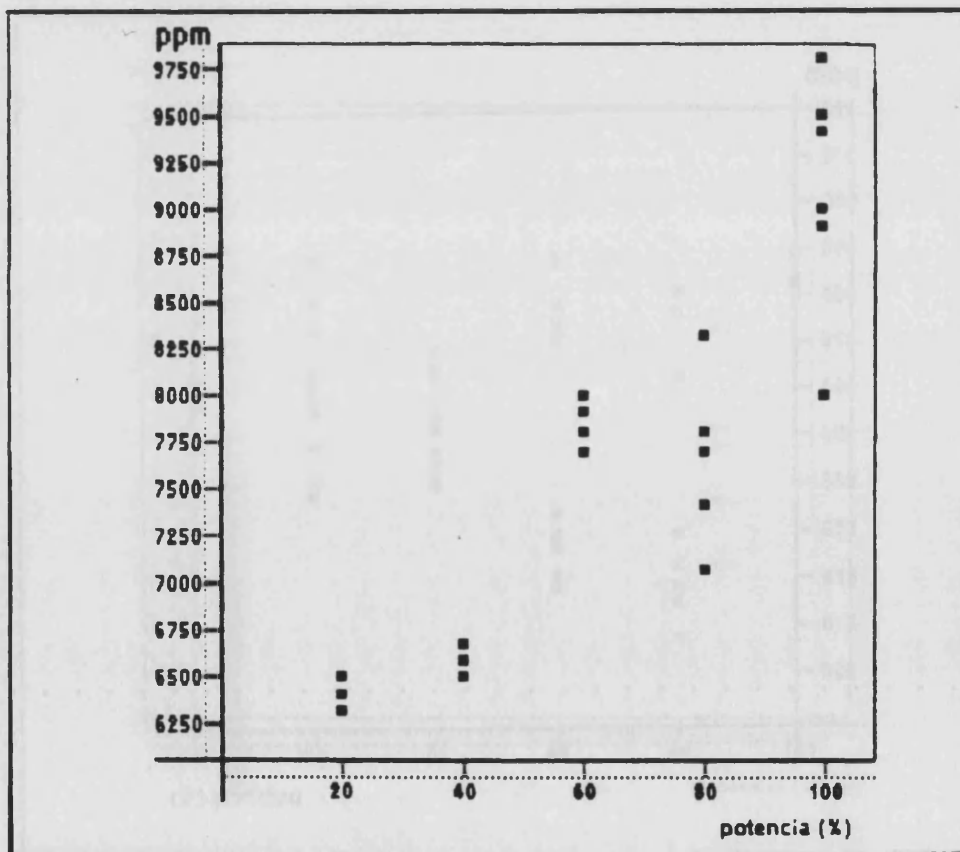


Tabla II.18: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Mn.

Potencia (%)	concentración (ppm) ^a	
	50 mL ^b	100 mL ^b
20	141 ± 1	138 ± 1
40	139 ± 1	138 ± 2
60	157 ± 2	154 ± 2
80	164 ± 1	161 ± 1
100	152 ± 4	151 ± 2

a: media ± desviación típica, n = 3.

b: volumen del reactor.

Figura II.10: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Mn.

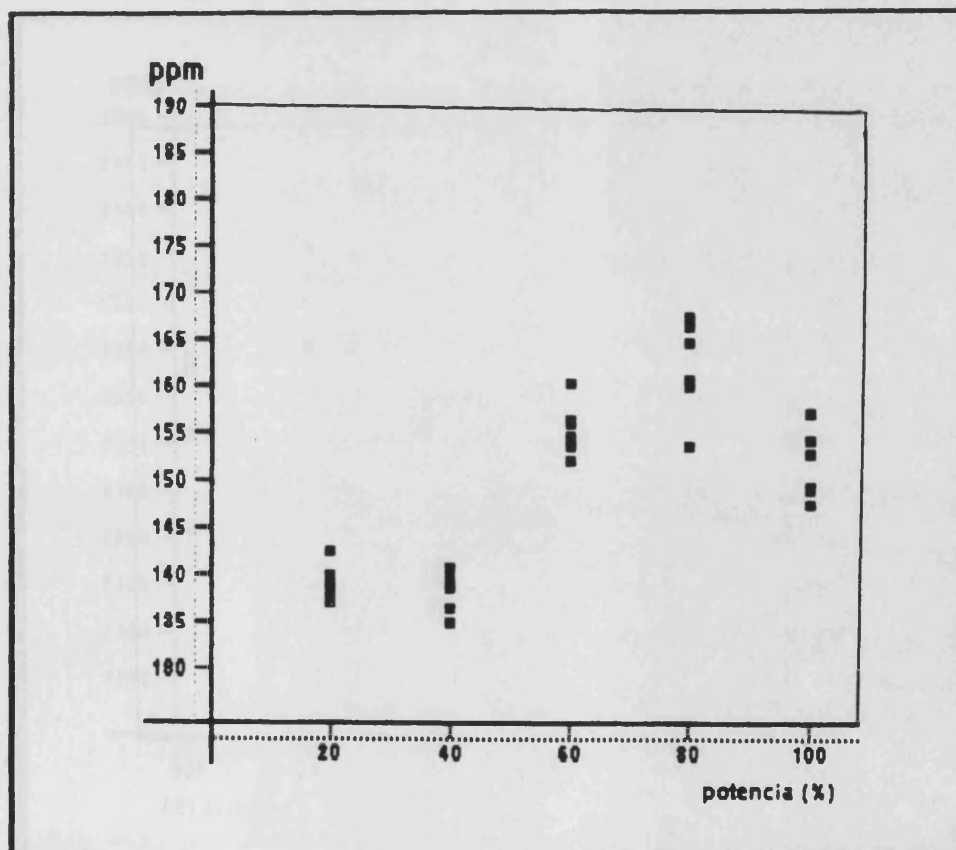


Tabla II.19: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Pb.

Potencia (%)	concentración (ppm) ^a	
	50 mL ^b	100 mL ^b
20	432 ± 7	379 ± 9
40	405 ± 4	390 ± 20
60	414 ± 9	406 ± 3
80	427 ± 7	436 ± 4
100	410 ± 20	413 ± 7

a: media ± desviación típica, n = 3.

b: volumen del reactor.

Figura II.11: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Pb.

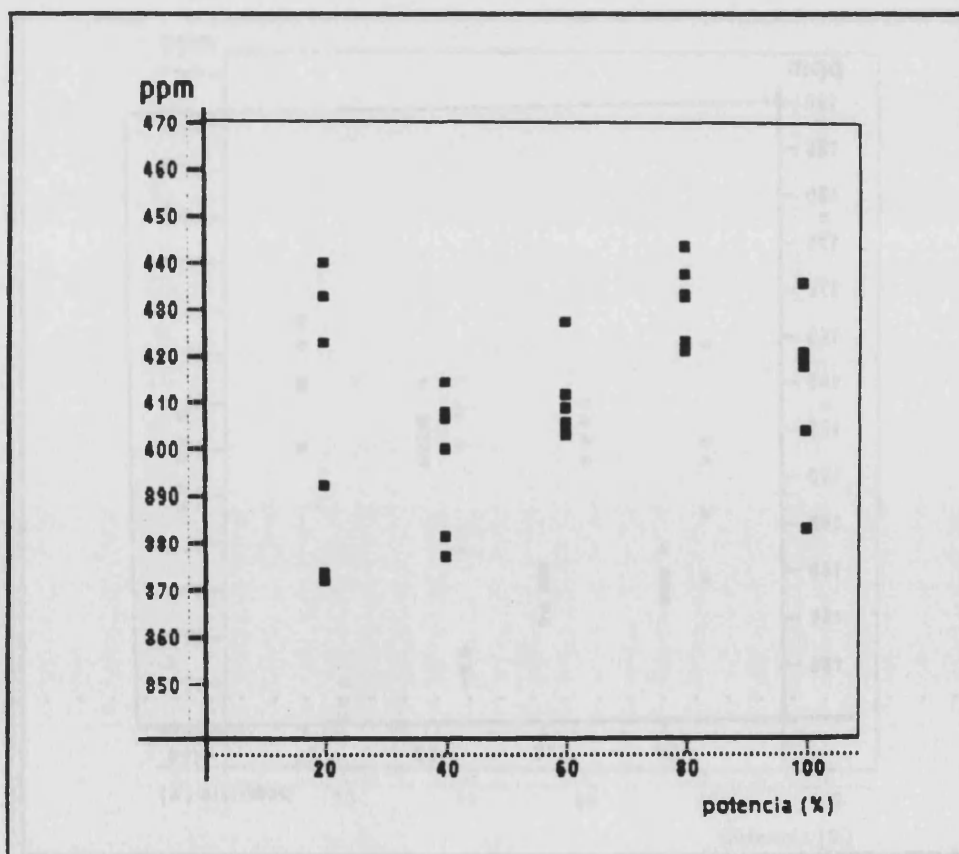


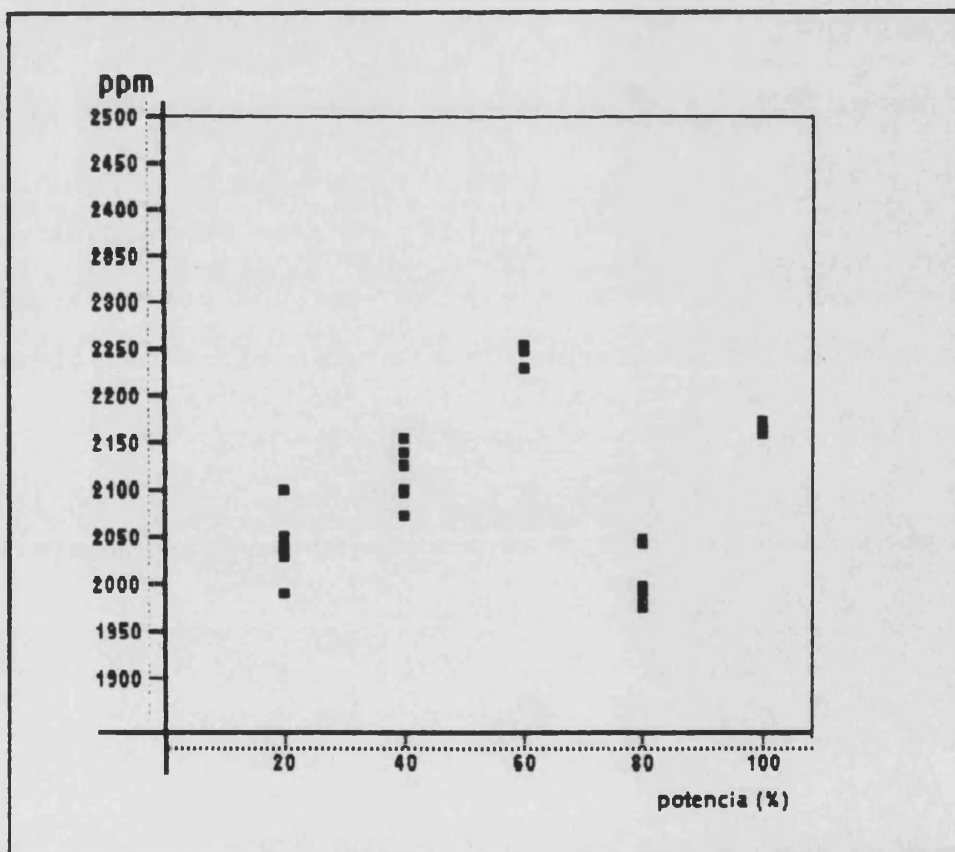
Tabla II.20: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Zn.

Potencia (%)	concentración (ppm) ^a	
	50 mL ^b	100 mL ^b
20	2060 ± 30	2020 ± 30
40	2100 ± 30	2130 ± 30
60	2190 ± 80	2290 ± 70
80	2020 ± 20	2100 ± 20
100	2130 ± 30	2180 ± 20

a: media ± desviación típica, n = 3.

b: volumen del reactor.

Figura II.12: Efecto de la potencia sobre la recuperación del Zn.



Por otra parte, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos utilizando reactores de 50 y 100 mL.

En general, se puede afirmar que una potencia del 80% es adecuada para obtener una máxima recuperación de todos los elementos, consiguiéndose valores medios más altos a la potencia del 100% para Cd, Cu y Fe; si bien las poblaciones de datos para una potencia del 80% y del 100% se solapan.

Tan solo para el Zn se obtuvieron resultados anormalmente bajos para este valor de potencia. A pesar de ello, en experiencias posteriores se confirmó que una potencia del 80% era adecuada (ver datos de la tabla II.21).

En definitiva, y al margen de errores de medida en una determinada sesión, se puede afirmar que una potencia del 80% es suficiente para lograr la recuperación de todos los elementos estudiados.

Además, en las condiciones anteriores de potencia no se produce la rotura de los reactores.

II.1.4.2.3.- Efecto de la cantidad de muestra y del volumen de ácido.

En la tabla II.21 y figuras II.13a a II.18a se indican los resultados de experiencias independientes realizadas para tomas de ensayo comprendidas entre 100 y 500 mg.

Se puede afirmar, en general, que la dispersión de los valores obtenidos en el análisis de cada elemento disminuye con el aumento de la toma de ensayo, si bien en el caso de Pb la dispersión mínima se obtuvo para 100 mg de muestra.

Tabla II.21: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación de los elementos estudiados.

Elemento	Concentración (ppm)				
	Toma de ensayo				
	100 mg	200 mg	300 mg	400 mg	500 mg
Cd	9,2±0,6	9,3±0,4	8,6±0,5	7,9±0,4	8,8±0,4
Cu	817± 9	790± 20	800± 10	791±8	790± 10
Fe	10500±900	8500±700	8000±800	8100±600	7300±300
Mn	169± 2	155± 5	153± 5	152± 3	144± 1
Pb	437± 8	470± 20	480± 20	480± 16	450± 25
Zn	2500±100	2080± 25	1920± 60	1520± 30	1543± 7

(valor medio ± desviación típica, n = 6).

Por otra parte, se observa una disminución en la recuperación de los elementos con el aumento de la toma de ensayo a excepción del Pb, para el que, debido a la gran dispersión de los resultados, no se puede apreciar ninguna tendencia. La disminución en la recuperación de los elementos podría deberse a que al aumentar la cantidad de muestra, el volumen de ácido añadido resulta insuficiente para proporcionar la completa disolución de los elementos metálicos.

Para comprobar este aspecto se diseñó una nueva experiencia en la que manteniendo la toma de ensayo en el valor más alto, se aumentó la cantidad de ácido HNO₃.

Los resultados obtenidos para ensayos independientes realizados para cada volumen de ácido se indican en la tabla II.22 y en las figuras II.13b a II.18b.

Tabla II.22: Efecto del volumen de ácido sobre la recuperación de los elementos estudiados.

Elemento	Concentración (ppm)		
	Volumen de ácido		
	2 mL	3 mL	5 mL
Cd	9,2 ± 0,4	10,2 ± 0,4	10,6 ± 0,1
Cu	800 ± 10	782 ± 3	792 ± 3
Fe	7300 ± 600	7150 ± 400	7600 ± 250
Mn	146 ± 2	176 ± 4	181 ± 3
Pb	521 ± 14	462 ± 6	460 ± 5
Zn	1543 ± 7	2200 ± 30	2250 ± 25

(valor medio ± desviación típica, n = 6).

Los patrones utilizados fueron disoluciones multielementales al 1% en HNO_3 siendo el tiempo y la potencia de digestión de 3 minutos y del 80% respectivamente.

Las muestras digeridas se diluyen por adición de un volumen determinado de agua destilada; pero, debido a que el aumento del contenido en sólidos en la suspensión provoca problemas de obturación en la aspiración de las muestras, se estudió la posibilidad de introducir en el aparato de absorción atómica únicamente el sobrenadante de la suspensión, sin necesidad de filtrar el sólido. El sólido, al dejar reposar la suspensión, quedaba en el fondo y no era aspirado por el capilar.

Al aumentar el volumen de ácido añadido se observa una mayor recuperación para los elementos Cd, Mn y Zn, llegándose a igualar e incluso a superar (Cd y Mn) la recuperación máxima conseguida en la experiencia de la toma de ensayo.

Por otra parte, tanto para el Cu como para el Fe y debido a la dispersión de los datos no se observa una tendencia clara de su recuperación con el volumen de ácido añadido.

En el caso del Pb la tendencia observada es contraria a la tendencia general, pues al aumentar el volumen de ácido añadido disminuye la recuperación. Sin embargo, en las condiciones de tiempo de digestión 3 minutos, potencia 80%, tomando 500mg de muestra y digiriéndolas con 5 mL de ácido nítrico se obtienen resultados exactos también para este elemento.

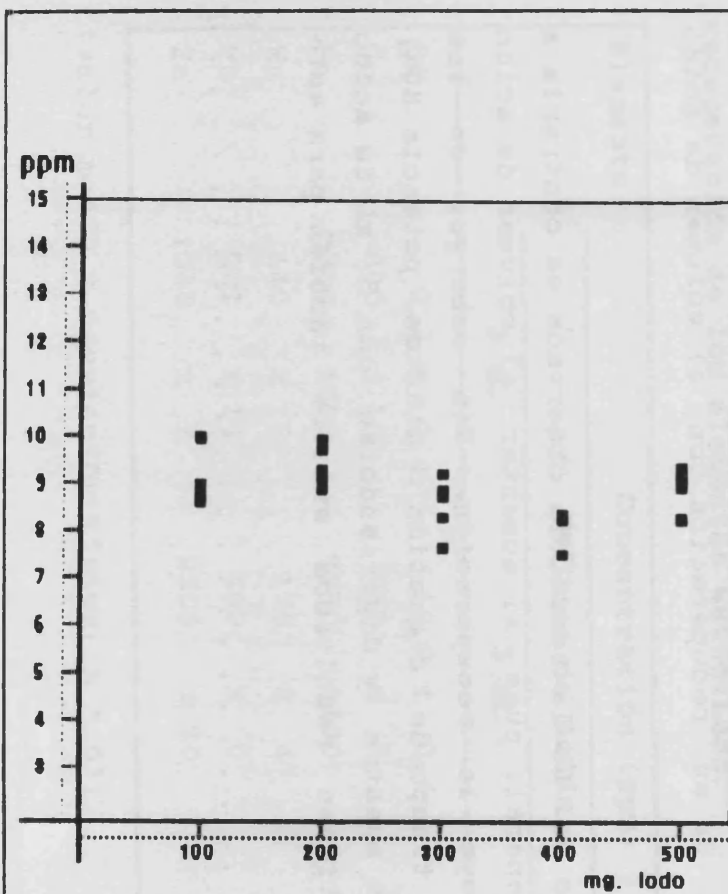
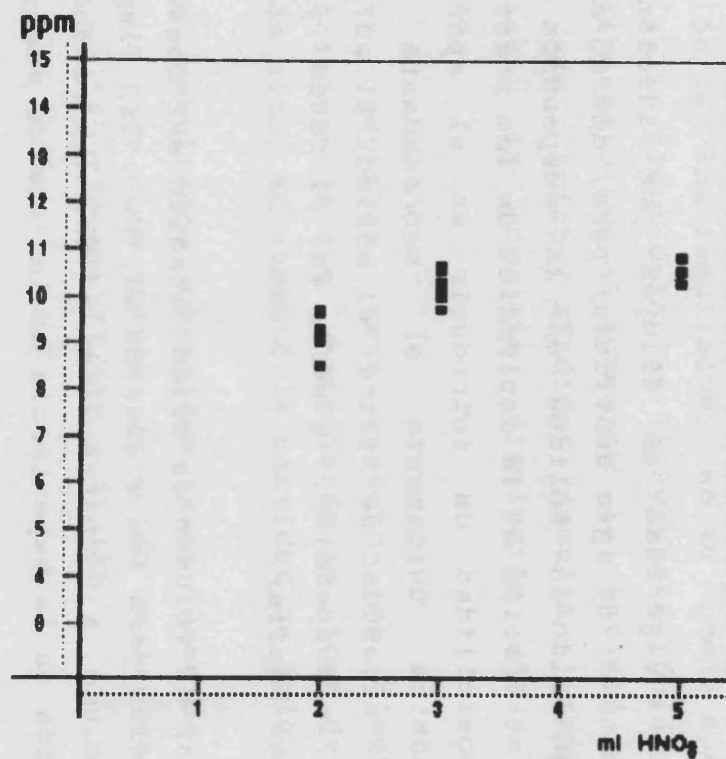


Figura II.13a: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación de Cd.



II.13b: Efecto del volumen de ácido sobre la recuperación de Cd.

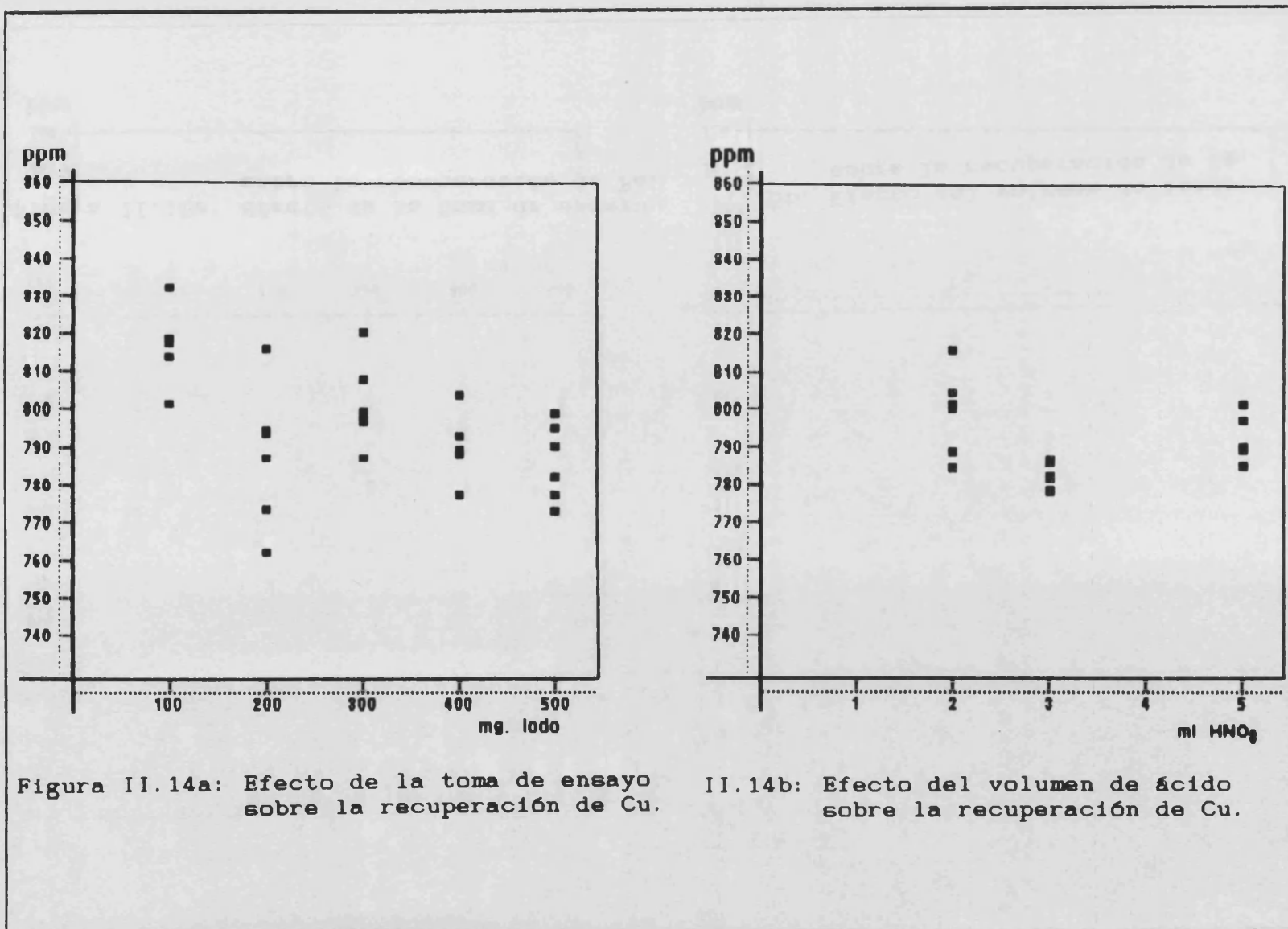


Figura II.14a: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación de Cu.

II.14b: Efecto del volumen de ácido sobre la recuperación de Cu.

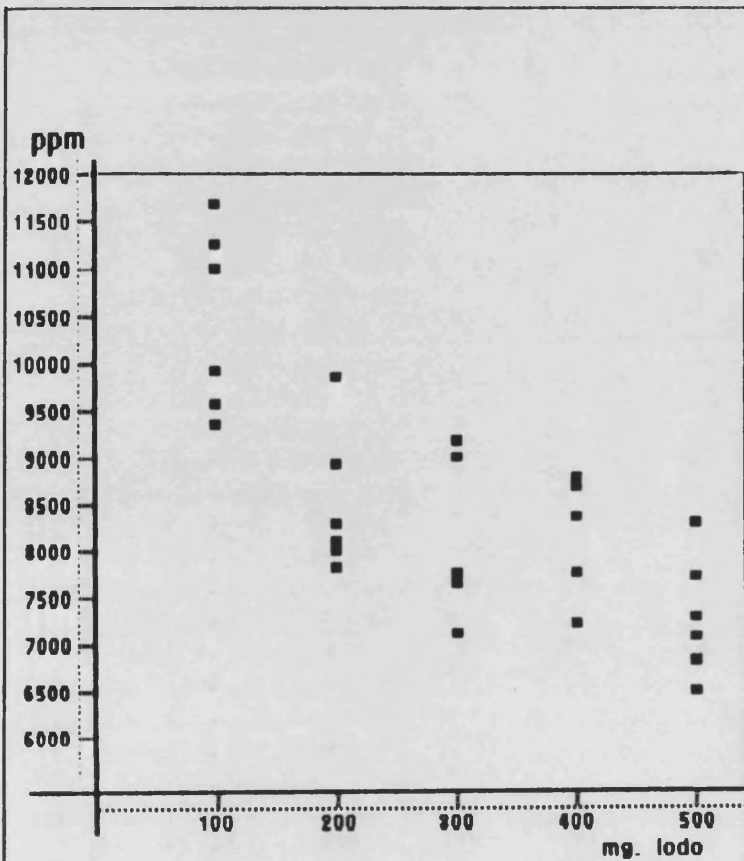
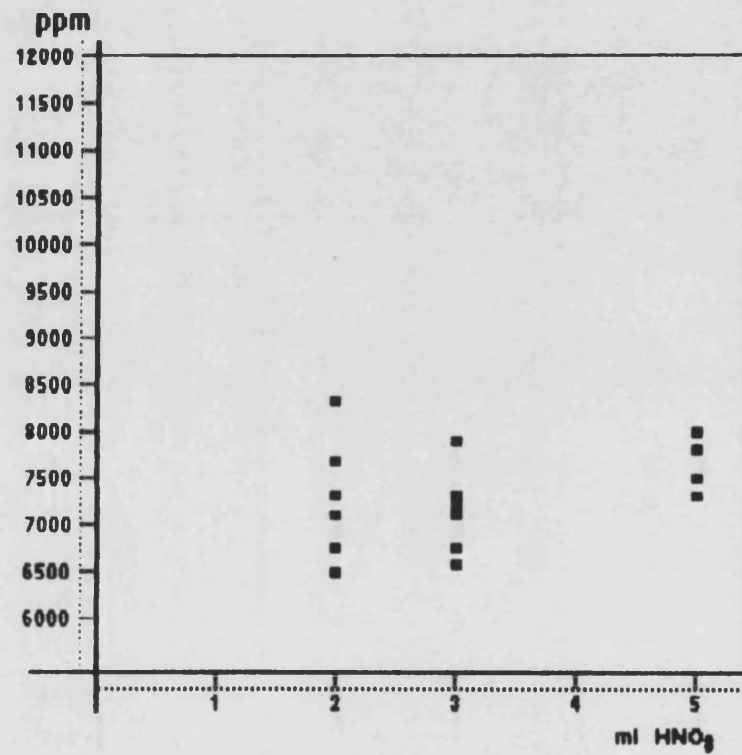


Figura II.15a: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación de Fe.



II.15b: Efecto del volumen de ácido sobre la recuperación de Fe.

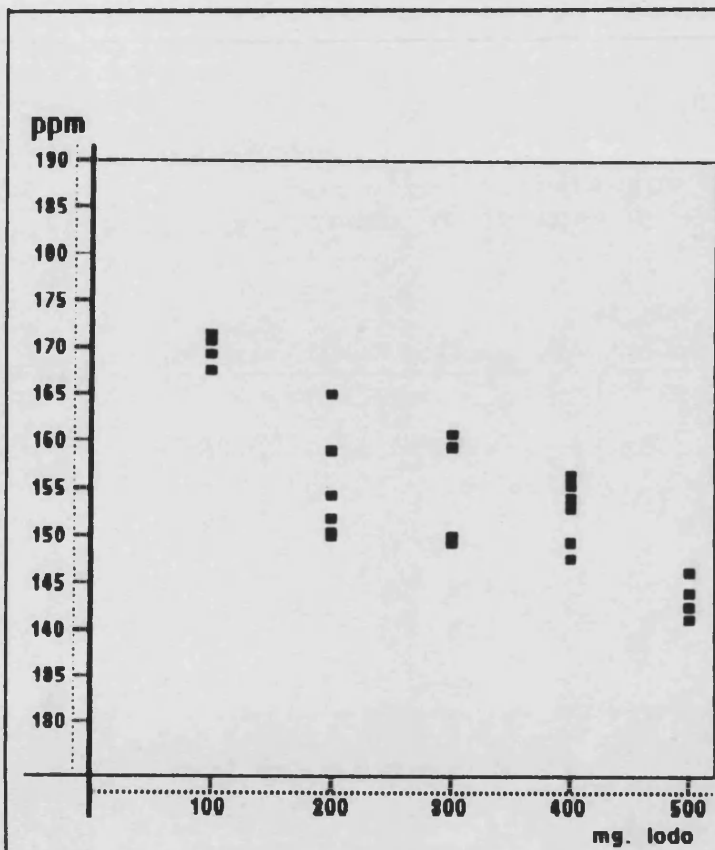
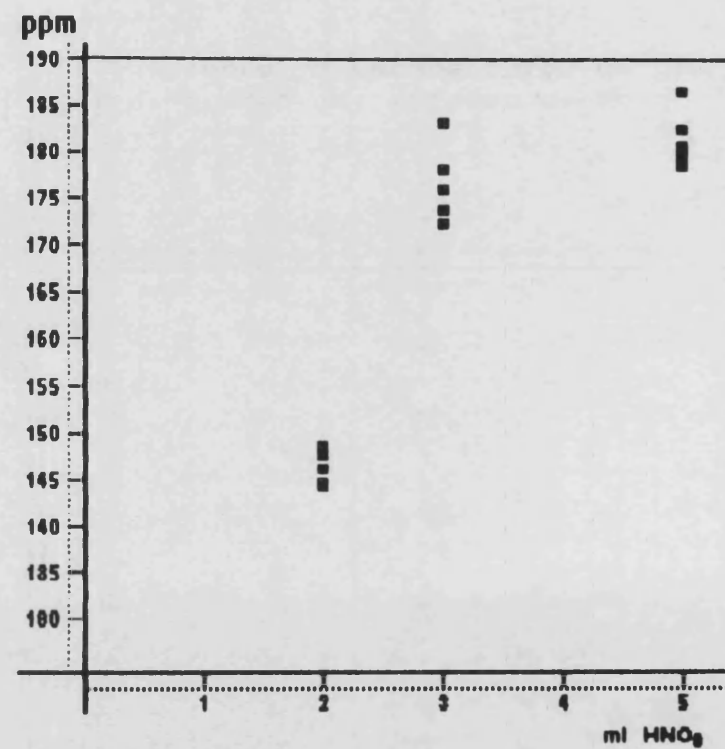
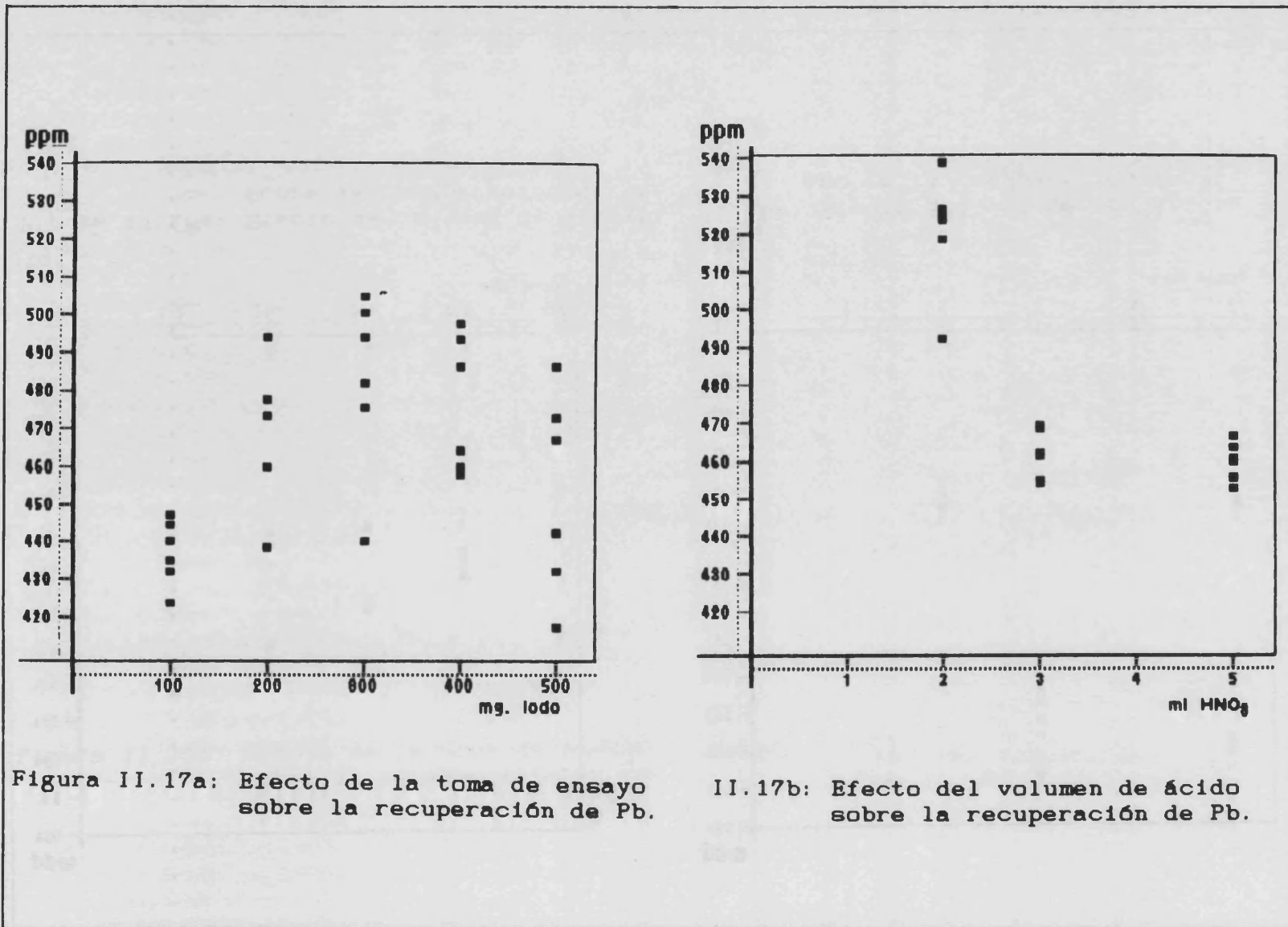


Figura II.16a: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación de Mn.



II.16b: Efecto del volumen de ácido sobre la recuperación de Mn.



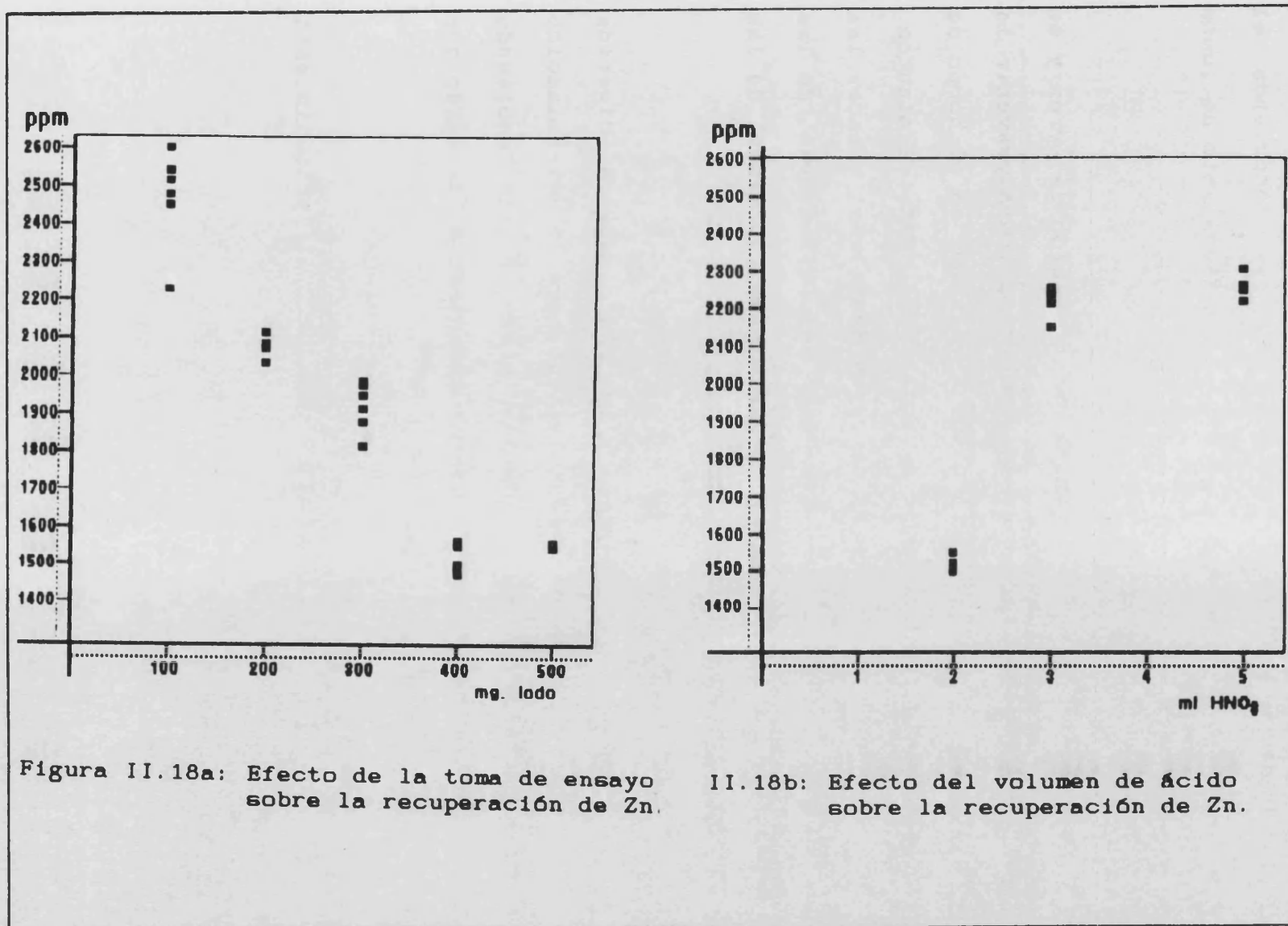


Figura II.18a: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación de Zn.

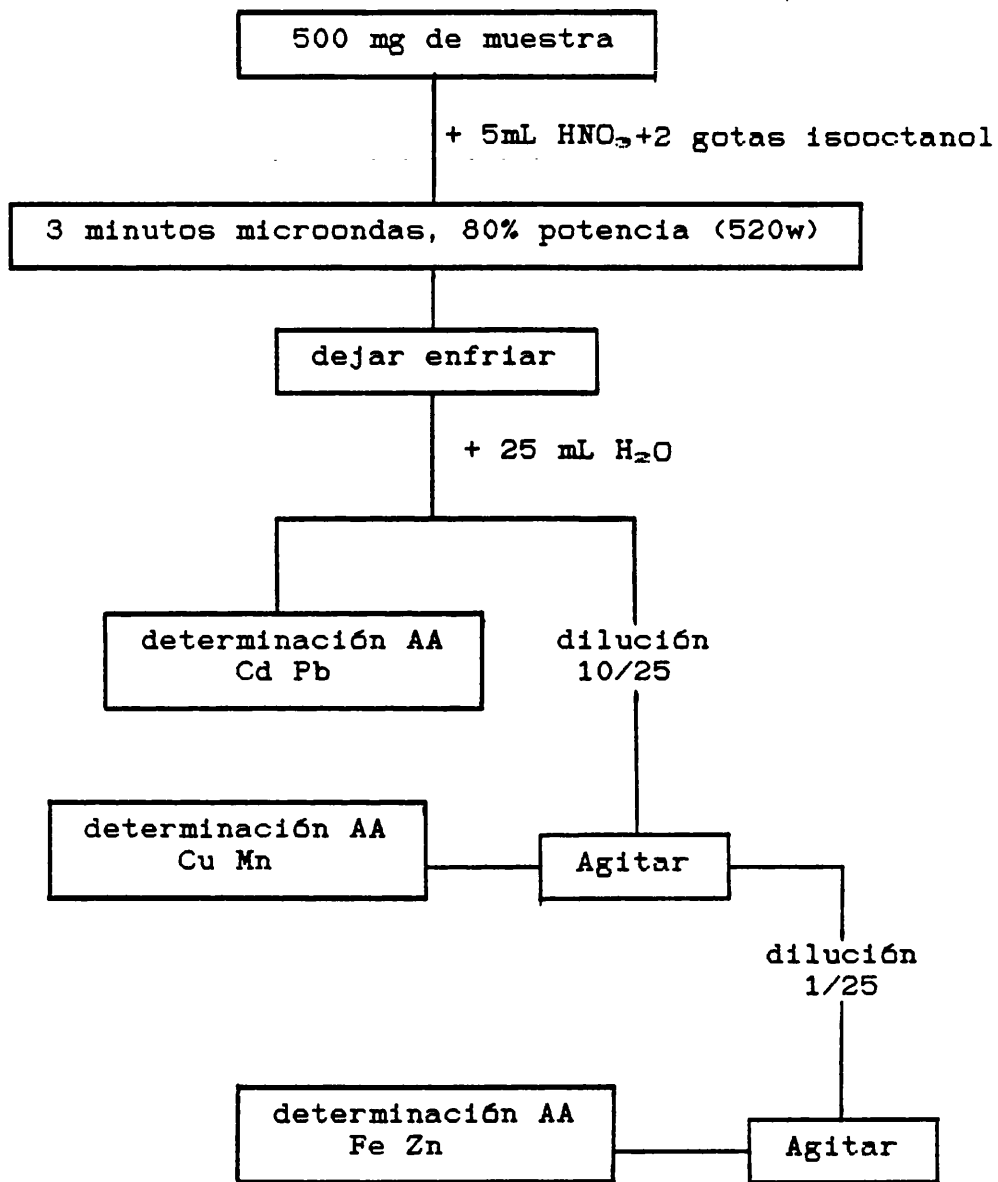
II.18b: Efecto del volumen de ácido sobre la recuperación de Zn.

De los estudios llevados a cabo se recomienda el siguiente procedimiento para la digestión y análisis de lodos de depuradora:

Se pesan 500 mg de muestra en un reactor de pyrex y se añaden 5 mL de HNO₃ y 2 gotas de isooctanol (para prevenir la formación de espuma). Se introduce el reactor en el horno de microondas y se trata a 520 w de potencia durante 3 minutos. Dejar enfriar. Añadir 25 mL de agua destilada y hacer las diluciones apropiadas para que las concentraciones de las muestras se encuentren dentro del intervalo lineal de las medidas de absorbancia para cada elemento.

Se alimenta la suspensión de la muestra digerida directamente en la llama aire-acetileno para la determinación de cadmio, cobre, hierro, manganeso, plomo y cinc, empleando disoluciones acuosas con la misma concentración de ácido que en las muestras como patrones.

En el esquema adjunto se resume el procedimiento empleado:



II.1.4.3.- Características analíticas del método propuesto.

Para determinar los parámetros analíticos del método se procedió a medir la absorbancia de una serie de disoluciones patrón multielementales al 1% en ácido nítrico; determinando a partir de ellas la sensibilidad y el límite de detección.

En la tabla II.23 se indican las ecuaciones de los calibrados, así como su linealidad (evaluada mediante el coeficiente de correlación).

Por otro lado, en la tabla II.24 se exponen los parámetros analíticos siguientes:

- Sensibilidad: establecida a partir de la pendiente de calibrado (unidades de absorbancia/ppm).
- Límite de detección (ppb): obtenido como tres veces la desviación típica de las lecturas de absorbancia del blanco dividido por la pendiente del calibrado.
- Límite de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$): calculado en función de la cantidad de muestra pesada y de las diluciones efectuadas.

TABLA II.23: Ecuaciones de calibrado representativas de las obtenidas para la determinación de elementos metálicos en lodos de depuradora por AA con llama.

Elemento	Ecuación	r
Cd	$A = -0.001 + 0.204 \cdot C$	0.9998
Cu	$A = 0.021 + 0.074 \cdot C$	0.9992
Fe	$A = 0.005 + 0.042 \cdot C$	0.9996
Mn	$A = 0.012 + 0.106 \cdot C$	0.9995
Pb	$A = 0.000 + 0.010 \cdot C$	0.9998
Zn	$A = 0.004 + 0.198 \cdot C$	0.9997

TABLA II.24: Sensibilidad y Límite de detección del método propuesto.

Elemento	Sensibilidad	L.D. (ppb)	L.D. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Cd	0.204	7	0.35
Cu	0.074	20	2.5
Fe	0.042	40	250
Mn	0.106	10	1.25
Pb	0.010	90	4.5
Zn	0.198	2	12.5

L.D.: Límite de detección.

μg : microgramos del elemento.

kg : Kg de muestra seca.

Tanto los valores de sensibilidad como los límites de detección obtenidos son normales en espectrometría de absorción atómica con llama, y son adecuados para el nivel de concentración en que se encuentran estos elementos en las muestras reales.

Por otra parte para determinar la precisión y exactitud del método propuesto se realizaron varios análisis independientes de muestras certificadas de lodo. Los valores experimentales de estos parámetros analíticos se deducen a partir de los resultados reseñados en el apartado siguiente.

II.1.4.4.- Análisis de muestras certificadas de lodo.

Para determinar la exactitud del método se han utilizado dos muestras certificadas de lodo de la Community Bureau of Reference (Comission of the European Communities):

- Lodo de origen doméstico (CRM Nº 144).
- Lodo de origen industrial (CRM Nº 146).

Estos materiales consisten en un polvo homogéneo de tamaño de partícula inferior a 90 μm .

Antes de pesar las muestras se introdujeron en una estufa a 60°C durante tres horas. Una vez secas, se realizaron tomas de ensayo independientes de 500 mg y se

introdujeron en reactores a presión de 100 mL. Se adicionaron 5 mL de ácido nítrico concentrado y se ajustó la potencia y el tiempo de digestión al 80% y a 3 minutos respectivamente. Para evitar la formación de espuma se añadieron 2 gotas de 2-octanol.

Las muestras, una vez digeridas, todavía contenían un volumen elevado de espuma, por lo que se procedió a añadir 2 gotas de etanol para hacerla desaparecer.

Para determinar los elementos metálicos las muestras se diluyeron enrasando a volúmenes adecuados con agua destilada, si la proporción en ácido nítrico en la disolución final era inferior al 20%, y diluyendo por adición de un volumen adecuado de agua destilada si el porcentaje en nítrico de la dilución final era superior al 20%. Estas nuevas disoluciones se agitaron y dejaron reposar para que los sólidos se depositaran en el fondo. El sobrenadante se alimentó en el aparato de absorción atómica.

Los patrones utilizados fueron disoluciones multielementales al 1% en ácido nítrico preparados por enrase para las muestras que contenían una acidez igual o inferior al 20%, y para las muestras con una acidez superior al 20% los patrones fueron disoluciones multielementales preparados por adición de volúmenes y con la misma proporción de HNO_3 que las disoluciones finales de la muestra.

En las tablas II.25 y II.26 se indican los resultados obtenidos y las diferencias relativas entre éstos y los valores certificados. En ellas se observa que al aumentar la concentración del elemento en la muestra aumenta la precisión de su determinación, característica que se repite en todos los elementos estudiados.

Por lo que respecta a la exactitud, tan solo se obtiene un error significativo en la determinación de Fe en la muestra de lodo industrial; si bien es cierto que el contenido indicado en la misma no estaba certificado, por lo que las diferencias entre el valor hallado y éste no debe atribuirse a una falta de exactitud del procedimiento empleado. Para los demás elementos, los valores hallados y los certificados coinciden dentro del margen de error del valor certificado y del método propuesto.

En cuanto a la precisión, hay que destacar que el coeficiente de variación de 6 a 12 determinaciones de cada elemento en cada muestra, se encuentra entre un 0.3% y un 4%; habiéndose obtenido tan solo en la determinación del Cd, en la muestra de lodo doméstico, un coeficiente de variación del 9%. Este valor tan elevado, posiblemente se debe a la baja concentración de dicho elemento en la muestra.

TABLA II.25: Análisis de una muestra de lodo de origen doméstico (CRM N^o 144).

Elemento	N	CV%	Er %	Concentración	
				obtenida	NBS
Cd	7	9	-12	3.0 ± 0.6	3.41 ± 0.25
Cu	8	1	-0.7	708 ± 20	713 ± 26
Fe	8	3	2.9	45601 ± 3000	* 44300
Mn	8	2	0.7	452 ± 20	449 ± 13
Pb	8	3	0.6	498 ± 30	495 ± 19
Zn	7	2	-6.7	2931 ± 140	3143 ± 103

TABLA II.26: Análisis de una muestra de lodo de origen industrial (CRM N^o 146).

Elemento	N	CV%	Er%	Concentración	
				obtenida	NBS
Cd	12	2	-6.0	73.0 ± 2.5	77.7 ± 2.6
Cu	12	0.3	2.1	954 ± 5	934 ± 24
Fe	6	4	-33.6	12284 ± 1100	* 18500
Mn	12	0.9	-4.9	559 ± 12	588 ± 24
Pb	12	0.6	7.1	1360 ± 20	1270 ± 28
Zn	6	0.6	-3.2	3929 ± 50	4059 ± 90

N: Número de determinaciones.

CV%: Coeficiente de variación

Er%: Error relativo (%).

obtenida: Valor obtenido (ppm).

NBS: Valor certificado.

*: Valor no certificado (ppm).

Las diferencias en cuanto a la exactitud obtenida en el análisis de ambas muestras, habría que atribuir las a los efectos de la matriz sobre el proceso de digestión y a la existencia de diferentes formas químicas de los elementos a determinar, que podrían ser más resistentes a la extracción ácida. Sin embargo, de los resultados obtenidos, se deduce que el método propuesto es exacto y preciso para el análisis de este tipo de matrices.

II.1.4.5.- Mecanismo de atomización de las suspensiones.

Los valores obtenidos mediante introducción de suspensiones de las muestras de lodos digeridas son comparables a las encontradas mediante introducción del sobrenadante (dejando decantar) (tabla II.27). Esto indica que durante la digestión en horno de microondas se produce la extracción de los elementos metálicos desde la fase sólida a la disolución ácida, por lo que los elementos se atomizan estando en la disolución y no en la matriz. El empleo de suspensiones evita la necesidad de la filtración, que siempre es tediosa y que además podría introducir errores debido a la oclusión o absorción, de los elementos solubilizados, en la fase sólida.

TABLA II.27: Comparación de las concentraciones obtenidas en el análisis de una muestra de lodo de depuradora tras digestión en horno de microondas introduciendo la suspensión y el sobrenadante a la llama (n=6).

Elemento	Concentración (ppm)			
	Suspensión		Sobrenadante	
Cd	8,8	± 0,4	9,2	± 0,4
Cu	790	± 10	800	± 10
Fe	7300	± 600	7300	± 600
Mn	144	± 1	146	± 2
Pb	450	± 30	520	± 15
Zn	1544	± 7	1544	± 7

Cuando se introduce directamente en la llama una suspensión ácida de una muestra de lodo (sin tratamiento previo), la recuperación de los elementos a determinar depende tanto del tamaño de muestra como de la forma química, como puede verse en los resultados mostrados en la tabla II.28.

TABLA II.28: Comparación de las concentraciones obtenidas en el análisis de las muestras de lodo de depuradora introduciendo una suspensión directa y una suspensión tras digestión en horno de microondas.

Elemento	Concentración (ppm)		
	Procedimiento recomendado	Introducción directa de la suspensión	Diferencia(%)
CRM 144-			
Cd	3	-	-
Cu	708	711	+0,4
Fe	45601	38828	-14,9
Mn	452	424	-6,2
Pb	498	507	+1,8
Zn	2931	2835	-3,3
CRM 145-			
Cd	73	77,2	+5,8
Cu	954	877	-8
Fe	12284	7926	-35,5
Mn	559	432	-22,7
Pb	1360	1245	-8,5
Zn	3929	3807	-3,1
Muestra real-			
Cd	10,6	6	-43,4
Cu	792	859	+8,4
Fe	7600	3965	-47,8
Mn	181	152,3	-15,9
Pb	460	478	+3,9
Zn	2250	1496	-33,5

Las diferencias entre los valores obtenidos con y sin digestión en microondas son mayores en el caso de la muestra real (cuyo tamaño de partícula es mayor que el de las muestras certificadas) para Cd, Fe, Mn y Zn, y en las certificadas para Fe y Mn. El hecho de que la introducción directa de la suspensión proporcione resultados mejores, en algunos casos, puede explicarse por la heterogeneidad de las muestras.

El procedimiento recomendado implica un paso de digestión. Sin embargo, la digestión solamente requiere de 3 minutos y no se necesita una agitación enérgica de la muestra para obtener la recuperación completa de los elementos estudiados. Por este motivo, este método es uno de los más simples y rápidos propuestos para llevar a cabo estas determinaciones.

II. 1.5.- Conclusiones.

Como consecuencia de todo lo expuesto se puede concluir que: Para el análisis de muestras en suspensión, previamente digeridas, pueden utilizarse patrones acuosos; ya que las diferencias entre las características reológicas de muestras en suspensión y patrones acuosos son inferiores al 5% cuando se introducen muestras con un contenido en sólidos inferior a 20 mg/mL y un contenido en ácido inferior al 40%. Las suspensiones resultantes de las muestras digeridas, y diluidas adecuadamente, se pueden alimentar directamente en la llama, o bien dejar decantar e introducir el sobrenadante, habiéndose encontrado resultados comparables por ambos métodos. En cuanto a la digestión en horno de microondas se considera adecuada una digestión de 500 mg de muestra con 5 mL de HNO_3 durante 3 minutos aplicando una potencia de 520w, obteniéndose resultados exactos y precisos para este tipo de matrices.

II.2- DIGESTION DE CATALIZADORES.



II.2.1.- Objetivo.

En esta parte se ha tratado de poner a punto un método para la digestión en horno de microondas de muestras de catalizadores, mediante el cual se consiga disolver los elementos metálicos de manera rápida y cuantitativa para su análisis por absorción atómica con llama.

El análisis de catalizadores sólidos, polimetálicos, tiene gran importancia industrial y generalmente presenta dificultades por la complejidad e insolubilidad de estas muestras, razones por las que se ha escogido este tipo de muestras para comprobar la validez del empleo de los hornos de microondas en la digestión de muestras. Los elementos determinados se han escogido en función de cada tipo de muestra estudiada, centrándose en catalizadores empleados en la industria petroquímica.

La exactitud del método se evaluó por comparación de los resultados con los obtenidos mediante digestión convencional.

II.2.2.- Introducción.

Los catalizadores juegan en la actualidad un papel económico muy importante, ya que disminuyen los costes de cualquier proceso químico. La utilidad del empleo de

catalizadores es evidente en todo tipo de actividad industrial; desde la fabricación de vino, pan o queso hasta su utilización en la fabricación de fármacos y la síntesis de productos químicos.

No hay que olvidar que los catalizadores también juegan un papel importante desde el punto de vista de los procesos naturales, entre los que cabe destacar la fijación del nitrógeno, el metabolismo y la fotosíntesis como los más importantes.

Puesto que los catalizadores son sustancias de gran utilidad e importancia vamos a comentar alguna de sus características más importantes.

La definición actual de catalizador sigue siendo la que dió Ostwald en 1894: "Aquella sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química sin consumirse durante dicha reacción". Los catalizadores se han clasificado tradicionalmente en: homogéneos, heterogéneos y enzimáticos.

Los catalizadores homogéneos son los más sencillos y fáciles de estudiar, y tal como indica su nombre son una parte de la fase gaseosa o están disueltos en la fase líquida junto con los reactivos de la reacción. Son ejemplos de esta clase de catalizadores protones, iones, átomos, moléculas, complejos y compuestos organometálicos.

Los catalizadores enzimáticos o enzimas son de origen biológico y poseen un grado de complejidad elevado. Las enzimas son proteínas que se caracterizan tanto por sus estructuras primaria (secuencia de aminoácidos), secundaria (plegamiento en alfa-hélice, beta-hoja), terciaria y cuaternaria (plegamiento tridimensional), como por los coenzimas (generalmente iones metálicos), sin los cuales las enzimas dejan de ser funcionales.

Por último, los catalizadores heterogéneos se encuentran en una fase distinta a la fase donde se encuentran los reactivos, siendo generalmente superficies sólidas o parte de matrices insolubles tales como los polímeros u óxidos metálicos con uno, dos o varios elementos metálicos soportados sobre la matriz. No obstante tienen todos ellos en común que el componente activo catalítico se encuentra en la interfase entre el sólido y la disolución.

Aunque los catalizadores se clasifiquen en distintos grupos desde un punto de vista estructural, los principios básicos de la catálisis son los mismos para los tres tipos.

Los catalizadores heterogéneos son sólidos o se encuentran en la superficie de sólidos, por lo que las reacciones que catalizan ocurrirán en dicha superficie. Como en la cinética va a intervenir dicha superficie y no la masa

del catalizador interesará que el catalizador presente una superficie específica lo más grande posible para que el efecto catalítico sea mayor, además, cuando la reacción ocurre sobre la superficie del catalizador, los reactivos deberán estar adsorbidos sobre ella y el proceso de catálisis constará de cinco etapas:

Difusión macroscópica de los reactivos hasta la superficie del catalizador.

Adsorción de los reactivos sobre la superficie (proceso químico al que le corresponde una energía de adsorción).

Reacción química (controlada por su energía de activación).

Desorción de los productos dejando libres los centros catalíticos (con la correspondiente energía de desorción).

Difusión macroscópica de los productos hacia el seno de la disolución.

II.2.2.1.- Los catalizadores en la industria petrolífera.

Una de las industrias con un mayor volumen de mercado, y donde es obligada la utilización de catalizadores es la industria del petróleo. Prueba de su interés es el que en su refinado, de los cinco procesos más importantes, cuatro utilizan catalizadores heterogéneos:

"Cracking" catalítico: Este proceso convierte la fracción conocida como gas oil en unos productos más ligeros con contenidos elevados en compuestos con cadenas ramificadas e hidrocarburos aromáticos, empleándose como catalizadores zeolitas embebidas en matrices de sílice-alúmina (Pearce and Patterson 1981).

"Reforming": Proceso que se realiza sobre la fracción de nafta, reconstruyendo los hidrocarburos para aumentar el nivel de octanos, conservando el número de carbonos. En este proceso se utilizan Pt, Ir y Rh sobre soportes de óxidos porosos (Sinfett 1981; Dowden 1978).

"Hydrocracking": Por el que se reduce el peso molecular de los hidrocarburos en presencia de hidrógeno, siendo los catalizadores utilizados habitualmente Ni, Co, Mo, W, Pt, Pd, soportados sobre sílico-aluminatos o zeolitas (Ward and Qader 1975).

"Hydrotreating": Comprende la hidrogenólisis de los compuestos nitrogenados y sulfurados antes del craqueo catalítico empleándose sulfuros de Co y Mo, Ni y Mo soportados sobre alúmina (Mitchell 1981; Ledoux 1985).

II.2.2.2.- Métodos de análisis de catalizadores sólidos multimetálicos.

La dificultad en el análisis y caracterización de los catalizadores heterogéneos depende fuertemente de su complejidad y de su insolubilidad.

Los métodos analíticos más utilizados para la determinación de elementos metálicos en los catalizadores son la fluorescencia de rayos-X y la espectrometría de absorción y emisión atómica (Debies y col. 1981; Pedersen 1983). Las técnicas de emisión en arco o chispa y de rayos-X evitan el paso previo de disolución y permiten una caracterización rápida de los catalizadores. Sin embargo, estas técnicas presentan una precisión muy pobre; por lo que, para fines cuantitativos, son más adecuadas la espectrometría de absorción atómica con llama, como en la determinación de Pt en catalizadores (Kallmann y Blumberg 1980; Urbain y Martin 1981), y las técnicas de emisión en plasma (Austermann y col. 1987), preferiblemente el plasma de corriente continua (DCP) y la espectrometría de emisión atómica en plasma de inducción acoplada (ICP).

Los elementos que se determinan en los catalizadores heterogéneos son fáciles de caracterizar por ICP y por absorción con llama pero para el análisis de este tipo de muestras se tienen que resolver dos problemas:

- La solubilidad que presentan los catalizadores es muy pequeña; por lo que se requiere una digestión previa al análisis; empleando, por lo general, grandes cantidades de ácidos minerales fuertes (Fabec y Ruschak 1983; Fabeck y Ruschak 1985), y

- La presencia de interferencias debido al Al y/o Si que es un factor limitante de la exactitud de las determinaciones y requiere en algunos casos una extracción líquida de los elementos a determinar (Carrión y col. 1984).

Hasta ahora no se han encontrado referencias en la bibliografía que traten sobre la digestión de catalizadores heterogéneos en hornos de microondas. No obstante, la casa comercial Prolabo indica que se digieren catalizadores de matriz alúmino-silíceo con HF y HNO₃ durante 20 minutos, y de matriz de Al₂O₃ utilizando HF, HNO₃ y HCl durante 45 minutos, para determinar metales pesados por espectrometría atómica de absorción y de emisión en llama, así como en plasma ICP.

Sin embargo, no existen procedimientos rápidos que permitan digerir en pocos minutos las muestras de catalizadores, ni tampoco se ha realizado un estudio a fondo de la influencia de las variables experimentales en la digestión de catalizadores en hornos de microondas.

II.2.3.- Parte experimental.**II.2.3.1.- Aparatos y reactivos.**

Para las medidas de absorbancia se ha utilizado un espectrómetro de absorción atómica PERKIN-ELMER, modelo 5000, equipado con lámpara de cátodo hueco monoelemental de Mo y lámpara de cátodo hueco multielemental de Fe, Ni y Co. Las condiciones de medida experimentales utilizadas para la determinación de cada elemento son las indicadas en la tabla II.28. En todos los casos se ha utilizado una llama aire-acetileno, bola de impacto, y un tiempo de integración de 0.5s.

Tabla II.28: Parámetros experimentales utilizados para la medida por absorción atómica de los elementos estudiados.

Parámetro	Elemento			
	Co	Fe	Ni	Mo
Longitud de onda (nm)	240.7	248.3	232.0	313.3
Rendija (nm)	0.2	0.2	0.2	0.7
Tipo de llama	O	O	O	R
i. lámpara (mA)	30	30	30	10
Técnica	AA	AA	AA	AA

O: Aire-acetileno oxidante.
 R: Aire-acetileno reductora.
 AA: Absorción Atómica.

Para la caracterización de los catalizadores por fluorescencia de rayos-X se ha utilizado un espectrómetro de fluorescencia de rayos-X Siemens, modelo SRS 200, equipado con cristales analizadores de LiF y PET, un cátodo de cromo y un filtro de aluminio.

Para la digestión de las muestras se ha utilizado, sin ninguna modificación, un horno de microondas doméstico Balay, modelo Bahm-100, con un magnetrón de 2450 MHz de frecuencia y una potencia de salida de 650W. Para llevar a cabo las digestiones a presión de las muestras se emplearon reactores de teflón de 125 mL de capacidad.

Se han utilizado las siguientes disoluciones "stock":

Disolución "stock" de $1000\mu\text{g ml}^{-1} \pm 1\%$ de hierro obtenida disolviendo 1.0000 g de hierro metal en 50 mL de ácido nítrico (1+1) y diluyendo a 1 litro con agua destilada.

Disolución "stock" de $1000\mu\text{g ml}^{-1} \pm 1\%$ de níquel preparada disolviendo 1.0000 g de níquel metal en un volumen mínimo de ácido nítrico (1+1) y diluyendo a 1 litro con ácido nítrico al 1% (v/v).

Disolución "stock" de $1000\mu\text{g ml}^{-1} \pm 1\%$ de cobalto preparada disolviendo 1.0000 g de níquel metal en un volumen mínimo de ácido clorhídrico (1+1) y diluyendo a 1 litro con ácido clorhídrico al 1% (v/v).

Disolución "stock" de $1000\mu\text{g ml}^{-1} \pm 1\%$ de molibdeno obtenida disolviendo 1.8400 g de molibdato amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en un 1 litro de disolución amoniaca al 1% (v/v).

El ácido nítrico es de Baker, el ácido clorhídrico de Panreac, los ácidos fosfórico y sulfúrico y el alcohol isoamílico de Probus. Todos los reactivos empleados fueron R.A.

Los tres tipos de muestras de catalizadores estudiados (ketjen, catal y laterita) fueron facilitadas por INTEVEP (Venezuela).

II.2.3.2.- Procedimiento General.

II.2.3.2.1.- Digestión en horno de microondas.

Los tres tipos de catalizadores, caracterizados previamente por espectrometría de fluorescencia de rayos-X, se tratan con diferentes mezclas de ácidos minerales en un horno de microondas, utilizando diferentes niveles de potencia durante períodos de tiempo fijos. Después de este tratamiento, las muestras se diluyen con agua destilada y se determinan por espectrometría de absorción atómica con llama

el hierro, níquel, cobalto y molibdeno. Los patrones utilizados fueron disoluciones acuosas con la misma concentración de ácido que las muestras.

Las características del método se establecen a partir del análisis de muestras reales, y los resultados obtenidos se comparan con los encontrados después de un tratamiento por vía húmeda de las muestras (Fabec y Ruschack 1983).

II.2.3.2.2.- Método de digestión convencional.

El procedimiento convencional utilizado para la comparación de los resultados consiste en:

Pesar 500 mg de muestra en un erlenmeyer y añadir 25 mL de H₂O, 4 mL H₂SO₄ y 5mL HCl. El contenido del erlenmeyer se evapora durante 3 horas y media a 255 °C en un baño de arena hasta aparición de vapores SO₂ y SO₃, produciéndose en este punto un cambio de color. Después de dejar enfriar, añadir 5 mL de HCl en el erlenmeyer y volver a calentar en el baño de arena, añadir 25 mL de agua, y después de 5 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente. El contenido del erlenmeyer se lleva a 50 mL con agua destilada y se efectúan las diluciones adecuadas para la determinación de los elementos.

II.2.4.- Resultados y discusión.

II.2.4.1.- Caracterización de las muestras.

Los tres catalizadores analizados son compuestos sólidos del tipo heterogéneo multimetálico. Para caracterizar su composición elemental, se han preparado pastillas de cada muestra con un diámetro de 4 cm bajo una presión de 10 psi.

Las muestras se han analizado por espectrometría de fluorescencia de rayos-X y los espectros correspondientes se han registrado utilizando cristales analizadores de LiF y PET; los cuales permitieron identificar la presencia de metales de transición y de algunos metaloides (figuras II.19 A-C).

De los espectros se puede concluir que la muestra ketjen tiene una matriz de óxido de aluminio y como componentes minoritarios cobalto y molibdeno, la muestra catal posee una matriz de sílice y de óxido de aluminio y titanio, y la muestra laterita posee una matriz de sílice y de hierro.

En la muestra ketjen, se encuentran a nivel de trazas Ni y Fe, y como componentes minoritarios Co y Mo. Las muestras catal y laterita no contienen Mo. En la muestra catal Co y Ni están presentes a nivel de trazas y el Fe como componente minoritario. La laterita contiene trazas de Co y como componentes minoritarios Ni y Fe.

Figura II.19A: Espectros de rayos-X para la muestra Ketjen.
(a) LiF; (b) PET.

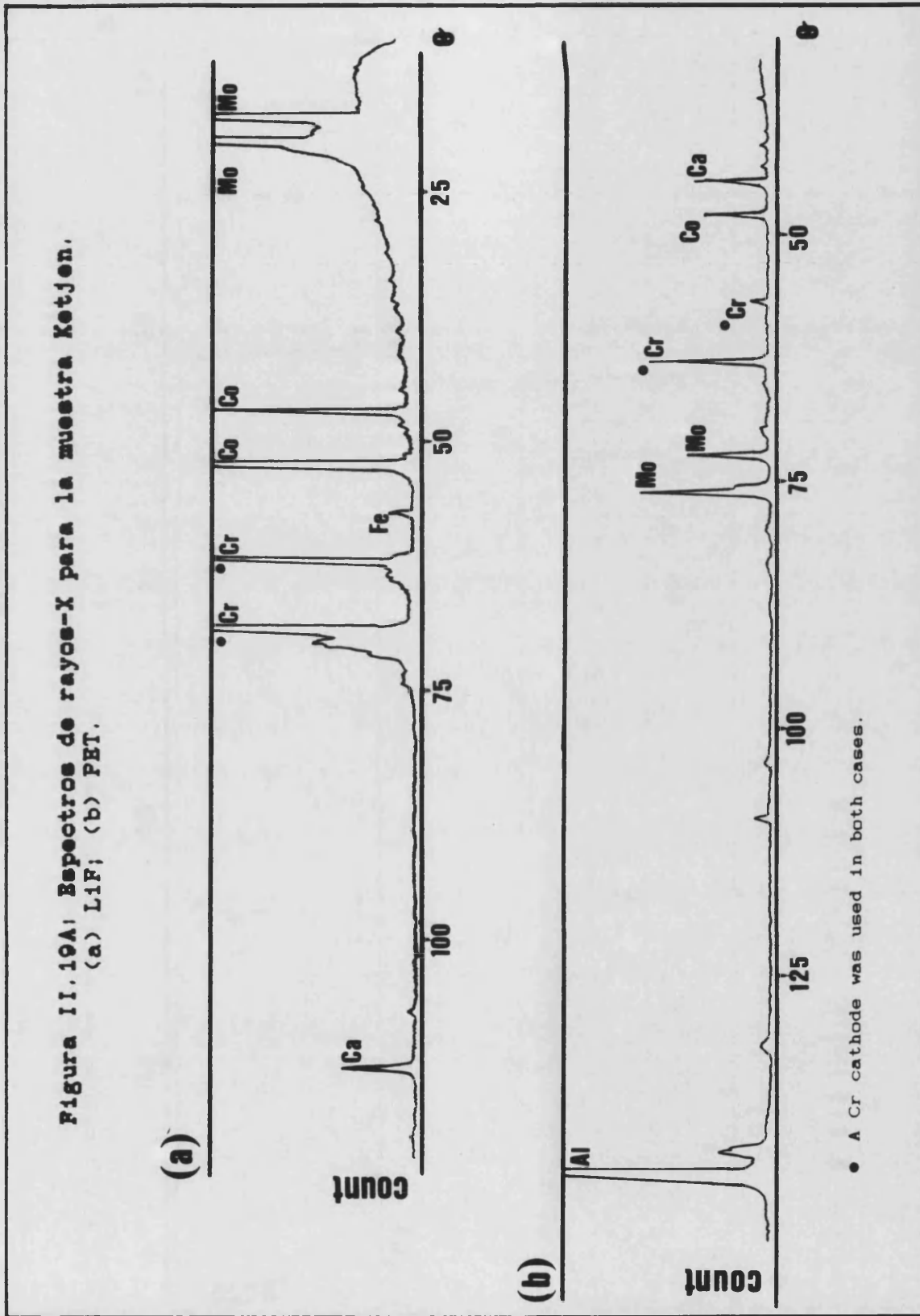


Figura II.19B: Espectros de rayos-X para la muestra Laterita.
 (a) LiF; (b) PET.

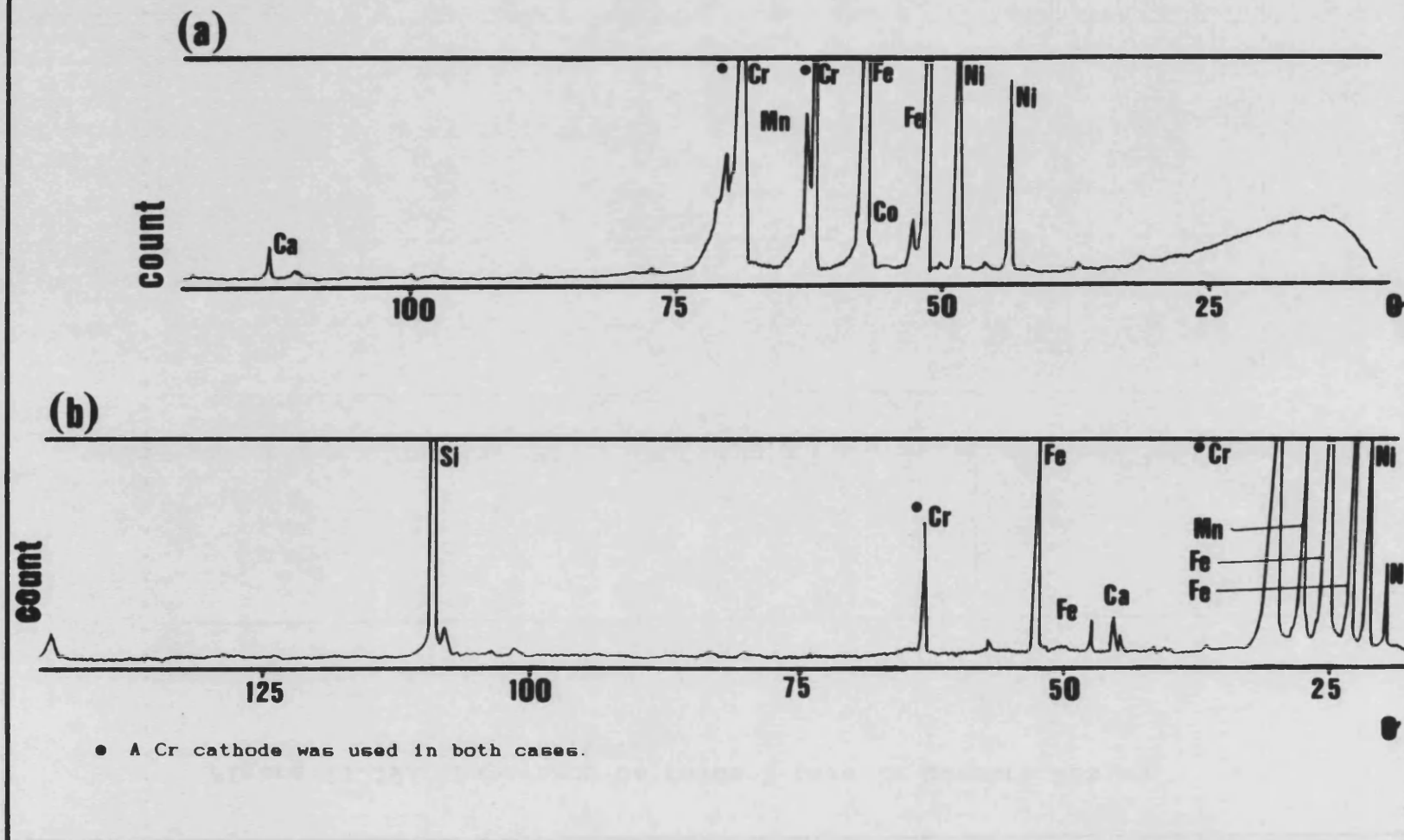
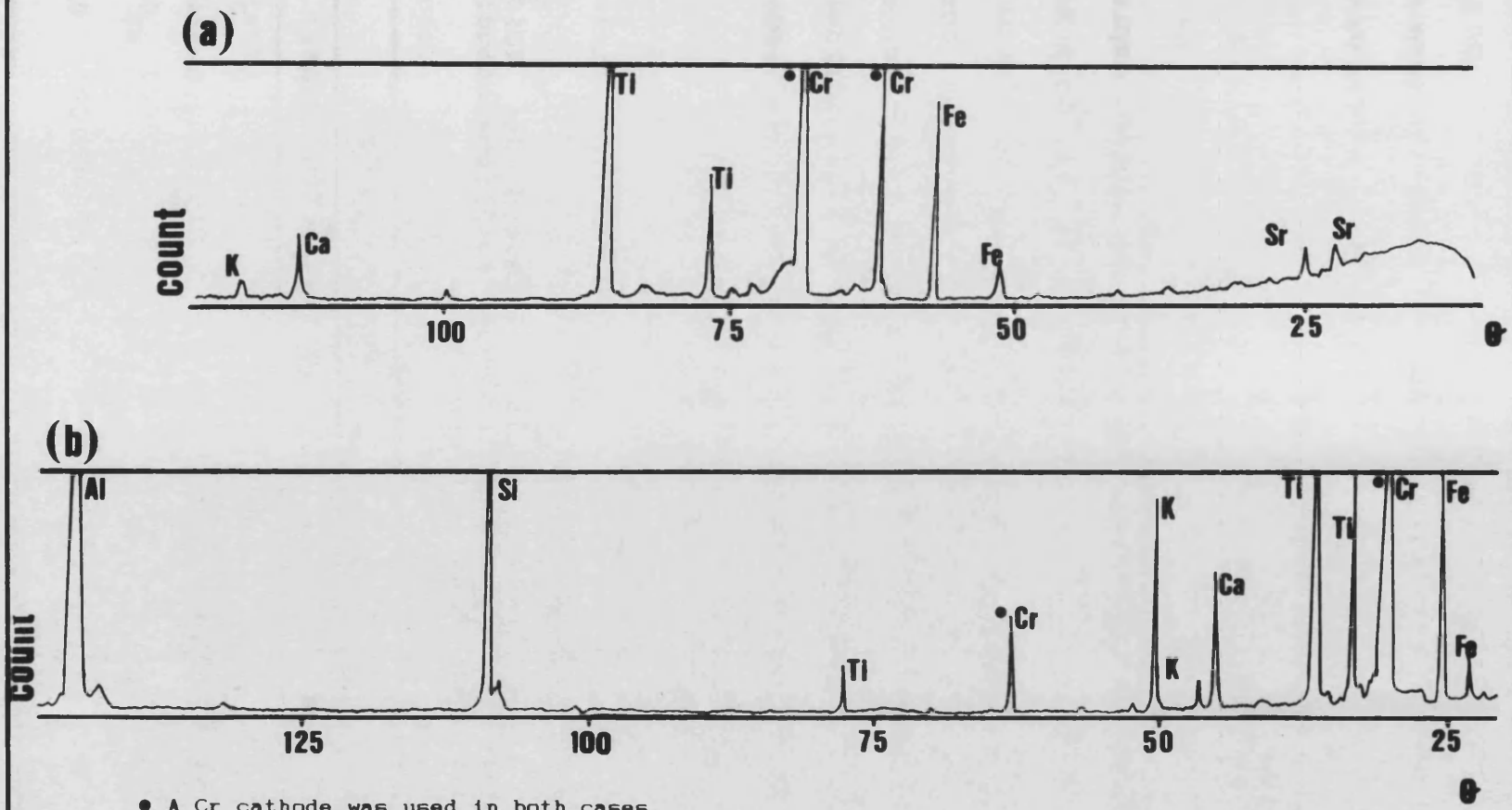


Figura II.19C: Espectros de rayos-X para la muestra Catal.
(a) LiF; (b) PBT.



II.2.4.2.- Estudio de los parámetros de digestión.

Se ha estudiado una muestra de ketjen para comprobar el efecto de los parámetros de digestión sobre la recuperación de los cuatro elementos objeto del estudio.

II.2.4.2.1.- Efecto del tipo de ácido empleado en la digestión sobre la recuperación de Ni, Fe, Co y Mo.

100 mg de muestra se digieren a presión con diferentes ácidos; nítrico, agua regia y ácido fosfórico, en reactores de teflón a una potencia y tiempo de digestión del 80 % y 9 minutos respectivamente. En la tabla II.29 se resumen los resultados obtenidos para cada elemento.

Tabla II.29: Efecto de la naturaleza del ácido sobre la recuperación de los elementos metálicos estudiados previa digestión en horno de microondas.

Acido	Ni	Fe	Co	Mo
	Concentración (ppm)			
2mL HNO ₃	20	-	23900±1200	30000±3000
2mL agua regia	6	210±120	21000±6000	46000±3000
2mL H ₃ PO ₄	120±10	277±1	22000±3000	66000±8000
2mL HNO ₃ +	137±6	345±8	25000±1000	68600±1400
2mL H ₃ PO ₄				

El tratamiento con ácido fosfórico consigue la máxima recuperación de los cuatro elementos considerados, así como el tratamiento con ácido nítrico y fosfórico. Sin embargo, el residuo obtenido si solo se emplea fosfórico se puede adherir al fondo del reactor de teflón. Si la muestra se trata previamente con ácido nítrico y posteriormente con ácido fosfórico, se evita cualquier problema de formación de residuos difíciles de digerir; por lo que esta mezcla de ácidos es la que se escogió para realizar la digestión de los catalizadores en hornos de microondas.

II.2.4.2.2.- Efecto de la variación del volumen de ácido sobre la recuperación de Ni, Fe, Co y Mo.

En las digestiones llevadas a cabo, se varió el volumen de ácido nítrico dejando constante el volumen de ácido fosfórico en 2 mL. En una segunda experiencia, se mantuvo constante el volumen de ácido nítrico (2 mL) y se varió el de ácido fosfórico.

En las tablas II.30 y II.31, y figuras II.20 A-B se indica el efecto de los volúmenes de ácido tanto nítrico como fosfórico, sobre la determinación de hierro, níquel, cobalto y molibdeno en la muestra de ketjen.

Tabla II.30: Efecto del volumen de HNO_3 empleado en la digestión en horno de microondas de la muestra ketjen sobre la concentración de Fe, Ni Co y Mo obtenida por espectrometría de absorción atómica con llama.

Volumen de HNO_3 (mL)	Fe	Ni	Co	Mo
	Concentración (ppm)			
0.5	351±5	185±2	26200±200	69500± 700
1	362±5	187±3	26100±200	70400±1200
2	352±6	189±4	25900±200	69400±1300
3	359±1	194±1	25970± 80	67100± 700

Tabla II.31: Efecto del volumen de H_3PO_4 empleado en la digestión en horno de microondas de la muestra ketjen sobre la concentración de Fe, Ni Co y Mo obtenida por espectrometría de absorción atómica con llama.

Volumen de H_3PO_4 (mL)	Fe	Ni	Co	Mo
	Concentración (ppm)			
0.5	120±60	50±20	25100±200	70000±1000
1	170±60	69±13	25400±200	79000±2000
2	180±50	82±13	25900±300	77800± 900
3	180±60	80±30	25940± 70	80000±3000

Figura II.20: Efecto del volumen de ácido fosfórico para la determinación de Ni y Fe (A); y de Co y Mo (B).

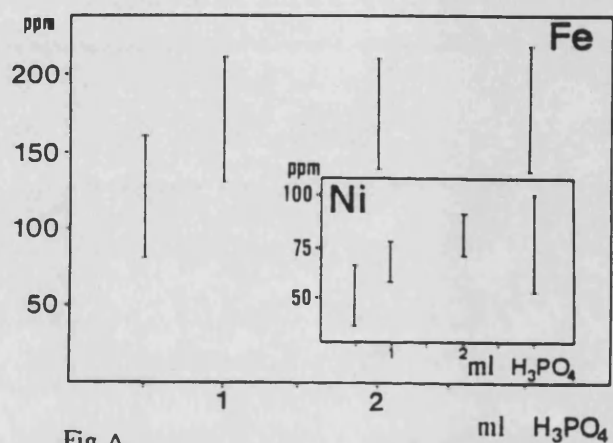


Fig.A

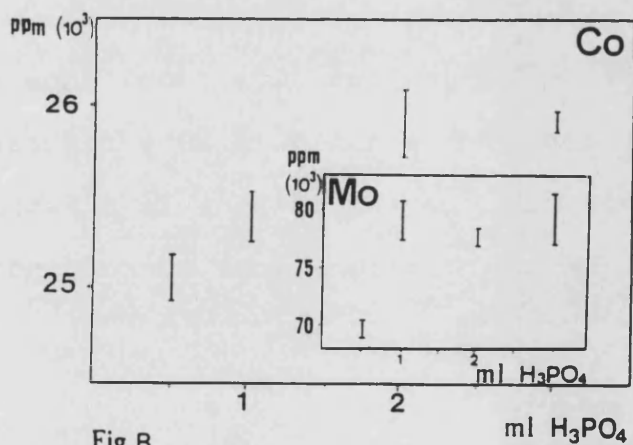


Fig.B

El volumen de ácido nítrico parece no influir sobre los resultados; sin embargo, el volumen de ácido fosfórico debe ser mayor de 2 mL para obtener una buena recuperación.

II.2.4.2.3.- Efecto de la variación del tiempo de digestión sobre la recuperación de Ni, Fe, Co y Mo.

Se adicionan 2 mL de ácido nítrico y 2 gotas de alcohol isoamílico a 100 mg de muestra y se digieren en reactores de teflón a presión en horno de microondas durante 3 minutos al 80% de potencia. Tras esta digestión, y una vez fríos los reactores, se les adicionan 2 mL de ácido fosfórico y se varia el tiempo de digestión a una potencia del 80%, evaluándose los resultados en orden a obtener la máxima concentración de los elementos a determinar.

En la tabla II.32 se indican los resultados encontrados para la muestra ketjen. En la tabla II.33 y figuras II.21 A-C se indican los resultados obtenidos para la muestra catal; y en la tabla II.34 se indican los correspondientes a la muestra laterita.

Para la muestra ketjen, 3 minutos de tratamiento con ácido fosfórico son suficientes para obtener la recuperación máxima, ya que tiempos superiores conducen a concentraciones de los elementos del mismo orden.

Tabla II.32: Efecto del tiempo de digestión en horno de microondas sobre la recuperación de los elementos metálicos estudiados en la muestra ketjen utilizando la mezcla de ácidos nítrico y fosfórico.

t. digestión con H_3PO_4 (min)	Ni	Fe	Co	Mo
Concentración (ppm)				
3	199± 5	310±12	25800±300	67300±1200
6	205± 8	320±14	25100±300	73800± 50
9	220±12	322± 6	25360± 70	72000±7000
12	180±30	320±30	26200±600	72000±2000
15	151± 9	371± 2	25600±200	76000±7000
18	170± 3	368± 6	25800±500	77000±3000
21	148± 7	319± 2	26700±200	71100±1300

Para la muestra catal (tabla II.33), sin embargo, son necesarios 12 minutos para una estabilización del valor de la concentración de los elementos metálicos como se aprecia en las figuras II.21 A-C.

Tabla II.33: Efecto del tiempo de digestión en horno de microondas sobre la recuperación de los elementos metálicos estudiados en la muestra catal utilizando la mezcla de ácidos nítrico y fosfórico.

t. digestión con H_3PO_4 (min)	Ni	Fe	Co
	Concentración (ppm)		
0	7 ± 2	300 ± 1	4 ± 1
3	110 ± 20	4200 ± 600	22 ± 1
12	127 ± 2	5030 ± 70	24 ± 1
21	126 ± 8	4940 ± 50	29 ± 4
30	127 ± 9	4860 ± 60	27 ± 2
39	130 ± 2	4910 ± 50	26 ± 3

Figura II.21A: Efecto del tiempo de digestión en horno de microondas sobre la recuperación de Fe en la muestra catal utilizando la mezcla de ácidos nítrico y fosfórico.

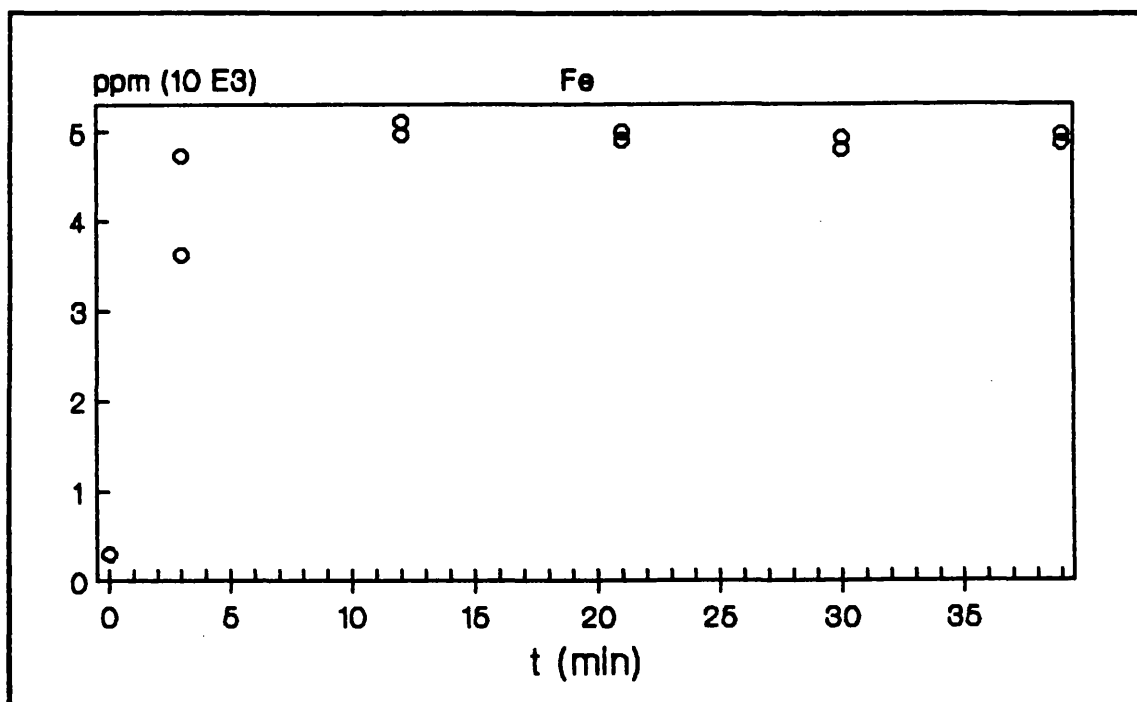


Figura II.21B: Efecto del tiempo de digestión en horno de microondas sobre la recuperación de Ni en la muestra catal utilizando la mezcla de ácidos nítrico y fosfórico.

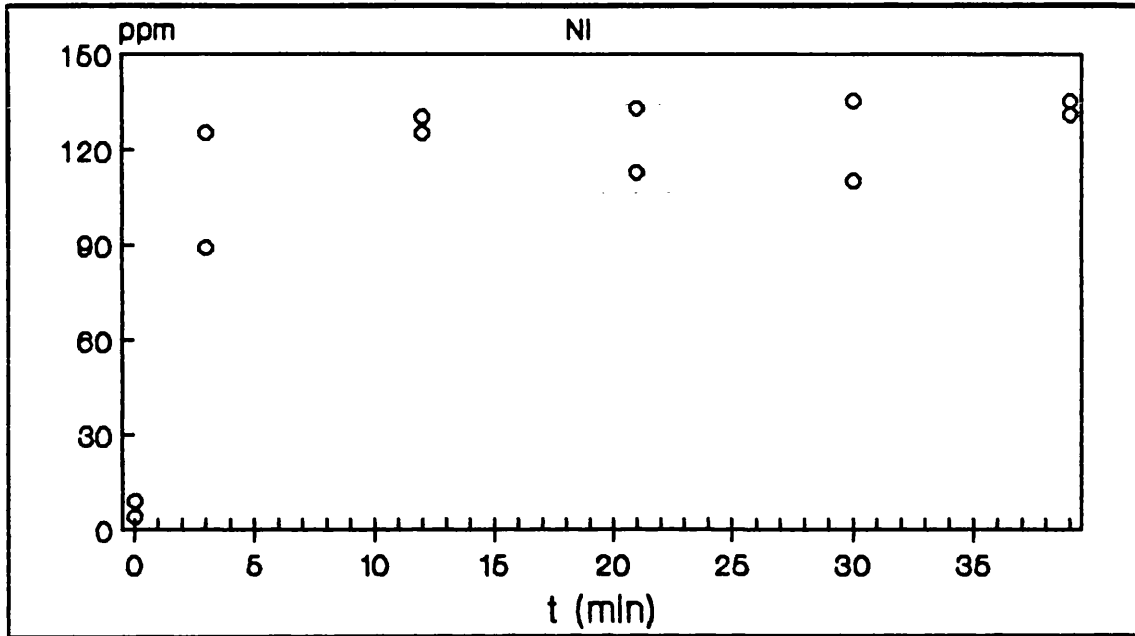
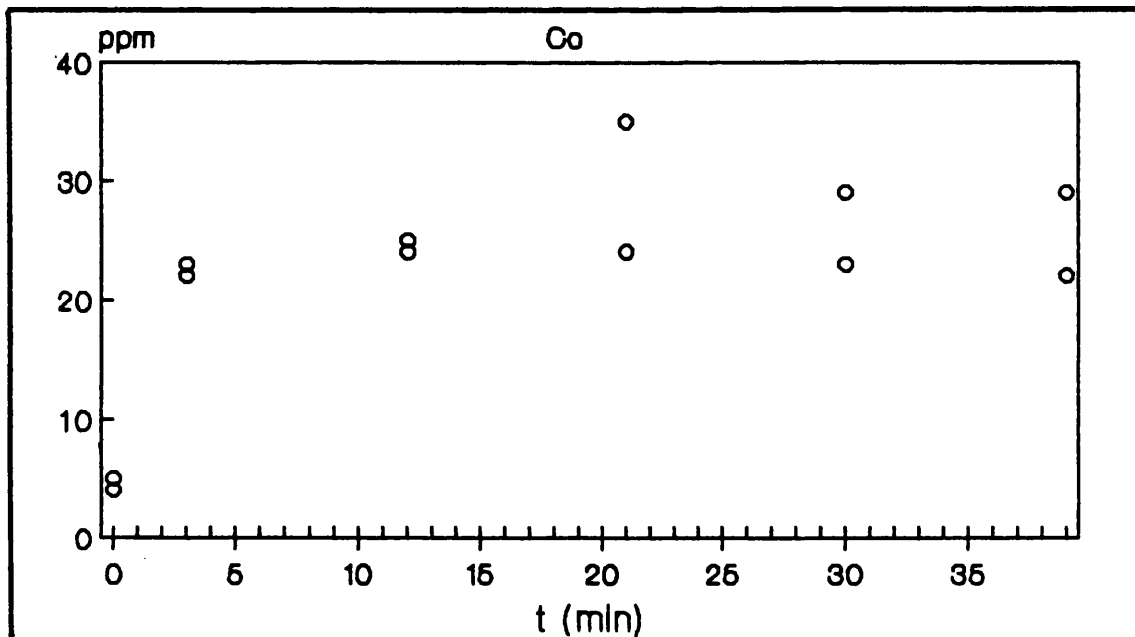


Figura II.21C: Efecto del tiempo de digestión en horno de microondas sobre la recuperación de Co en la muestra catal utilizando la mezcla de ácidos nítrico y fosfórico.



A la vista de los resultados anteriores para la muestra de laterita se ha ensayado un tiempo mínimo de 3 minutos y uno máximo de 12, obteniéndose resultados equivalentes, por lo que se deduce que son suficientes 3 minutos de tratamiento con fosfórico.

Tabla II.34: Efecto del tiempo de digestión en horno de microondas sobre la recuperación de los elementos metálicos estudiados en la muestra laterita utilizando la mezcla de ácidos nítrico y fosfórico.

t. digestión con H_3PO_4 (min)	Ni	Fe	Co
	Concentración (ppm)		
3	15310 ± 50	131000 ± 6000	415 ± 2
12	15390 ± 20	136000 ± 1000	404 ± 4

Entre 6 y 15 minutos totales de exposición a las microondas son suficientes para la extracción total de los elementos metálicos a determinar en las muestras de catalizadores ensayados; ya que tiempos mayores proporcionan los mismos resultados.

El aspecto de cada una de las muestras tras el tratamiento en el horno de microondas es:

- Ketjen: completamente disuelto después de la digestión con microondas.
- Laterita: existencia de un pequeño residuo.
- Catal: residuo rojo.

Por lo que, también en este caso, como en el del análisis de lodos de depuradora, se emplearon las suspensiones como forma de introducción de las muestras en la llama; confirmando que los elementos a determinar o bien se encuentran disueltos o están en suspensión en formas fácilmente atomizables.

II.2.4.2.4.- Efecto de la variación de cantidad de muestra sobre la recuperación de Ni, Fe, Co y Mo.

Variando la toma de ensayo, desde 100 a 500 mg, se adicionan 2 mL de ácido nítrico y dos gotas de alcohol isoamílico. La digestión se realiza en reactores de teflón a presión en horno de microondas durante 3 minutos a un 80% de potencia. Se dejan enfriar los reactores de teflón y se les adicionan 2 mL de ácido fosfórico, repitiéndose la digestión en horno de microondas al 80% de potencia durante 3 minutos. En la tabla II.35 y figuras II.22 A-D se muestran los resultados obtenidos para la muestra ketjen.

Tabla II.35: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación de los elementos estudiados en la muestra ketjen.

Tomas de ensayo (mg)	Ni	Fe Concentración (ppm)	Co	Mo
100	199±5	310±12	25800±300	67300±1200
200	123±3	160±20	21108± 14	66700±1300
300	90±1	133± 1	19920±150	68300± 100
400	77±2	114± 3	20000±200	71000±5000
500	69±1	99± 3	19630± 80	77000± 600

Figura II.22A: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación del Fe en la muestra ketjen.

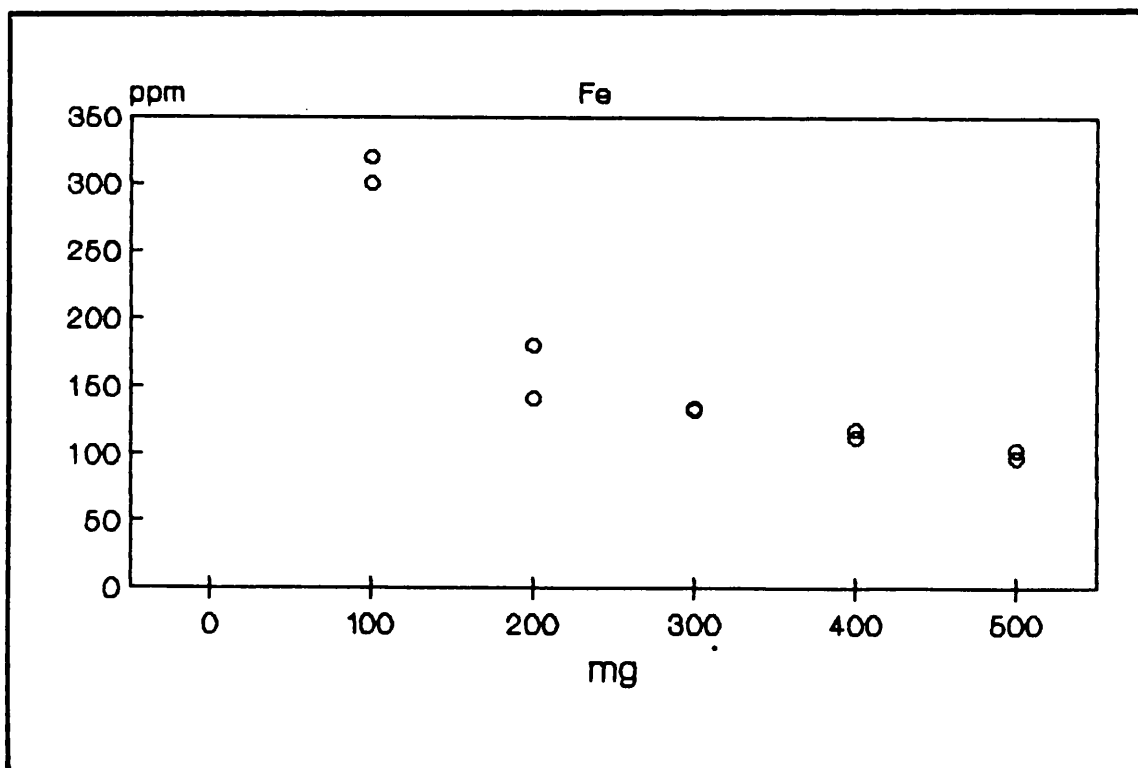


Figura II.22B: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación del Ni en la muestra ketjen.

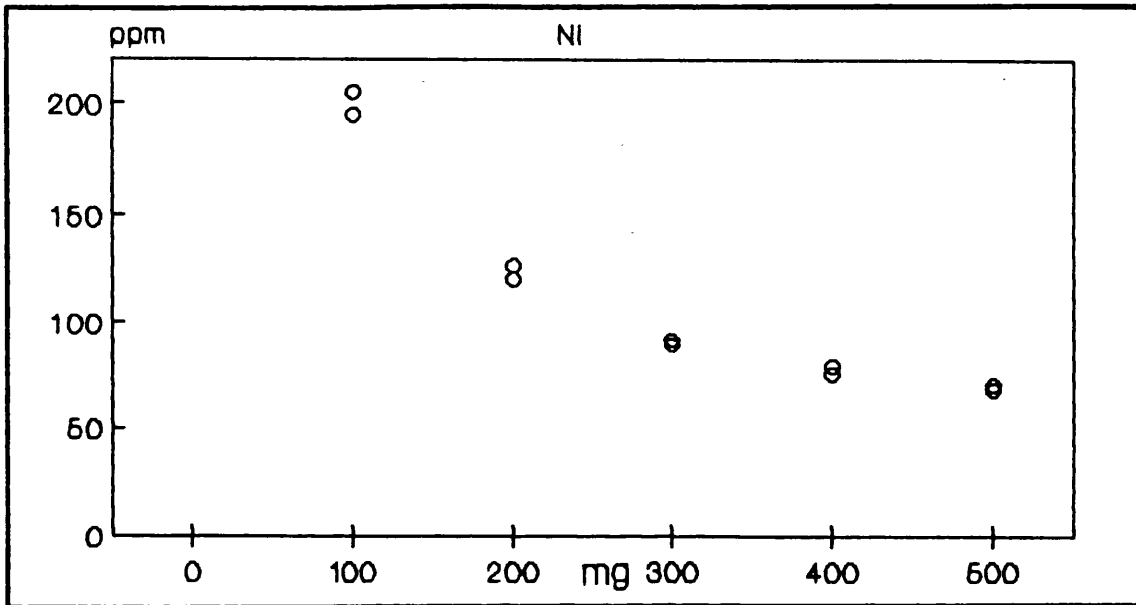


Figura II.22C: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación del Co en la muestra ketjen.

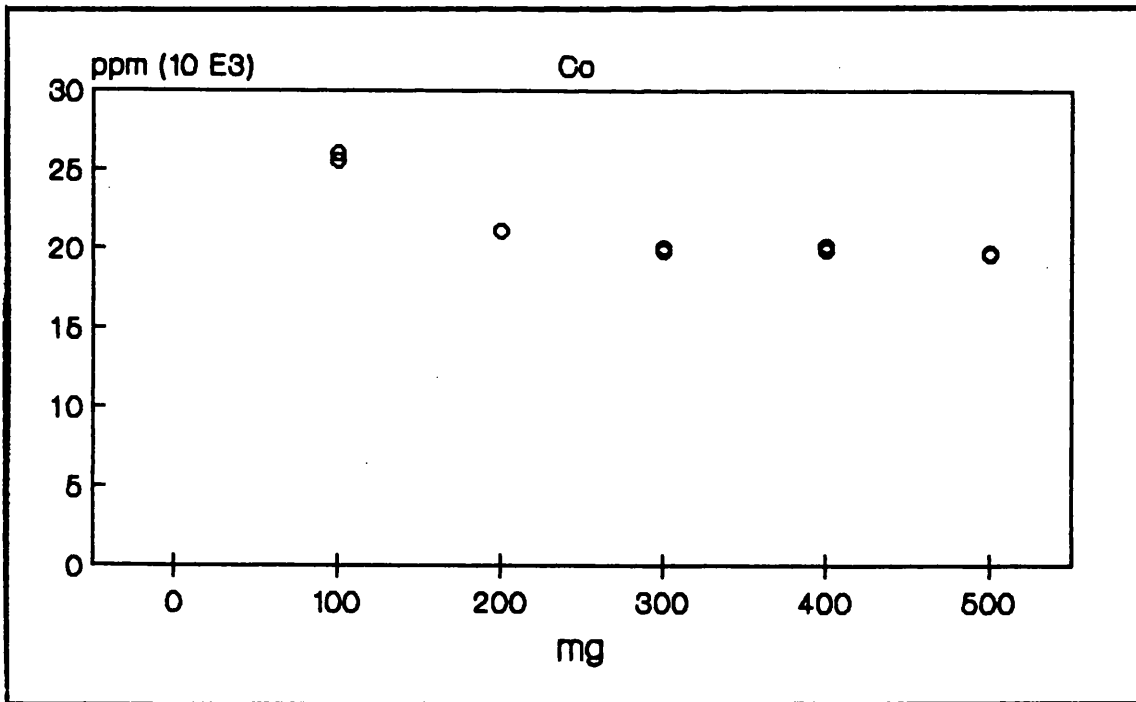
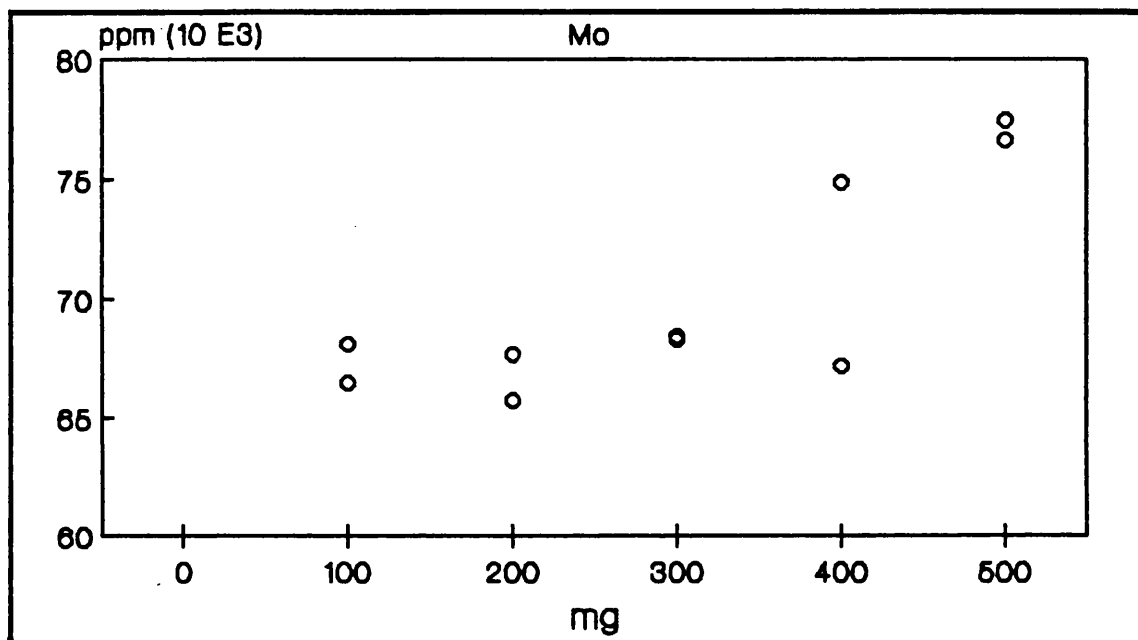


Figura II.22D: Efecto de la toma de ensayo sobre la recuperación del Mo en la muestra ketjan.



La tendencia que se observa para el Ni, Fe y Co, es una disminución de la recuperación al aumentar la cantidad de muestra tomada, lo que es lógico debido a que eso supone una relación menor ácido/muestra disminuyendo la eficiencia de la digestión. Sorprende el hecho de que en el caso del Mo, si bien los primeros valores están dentro de un mismo orden, para 500 mg de muestra se obtiene un alto valor de concentración; lo que puede deberse a una contaminación en la realización de estos análisis.

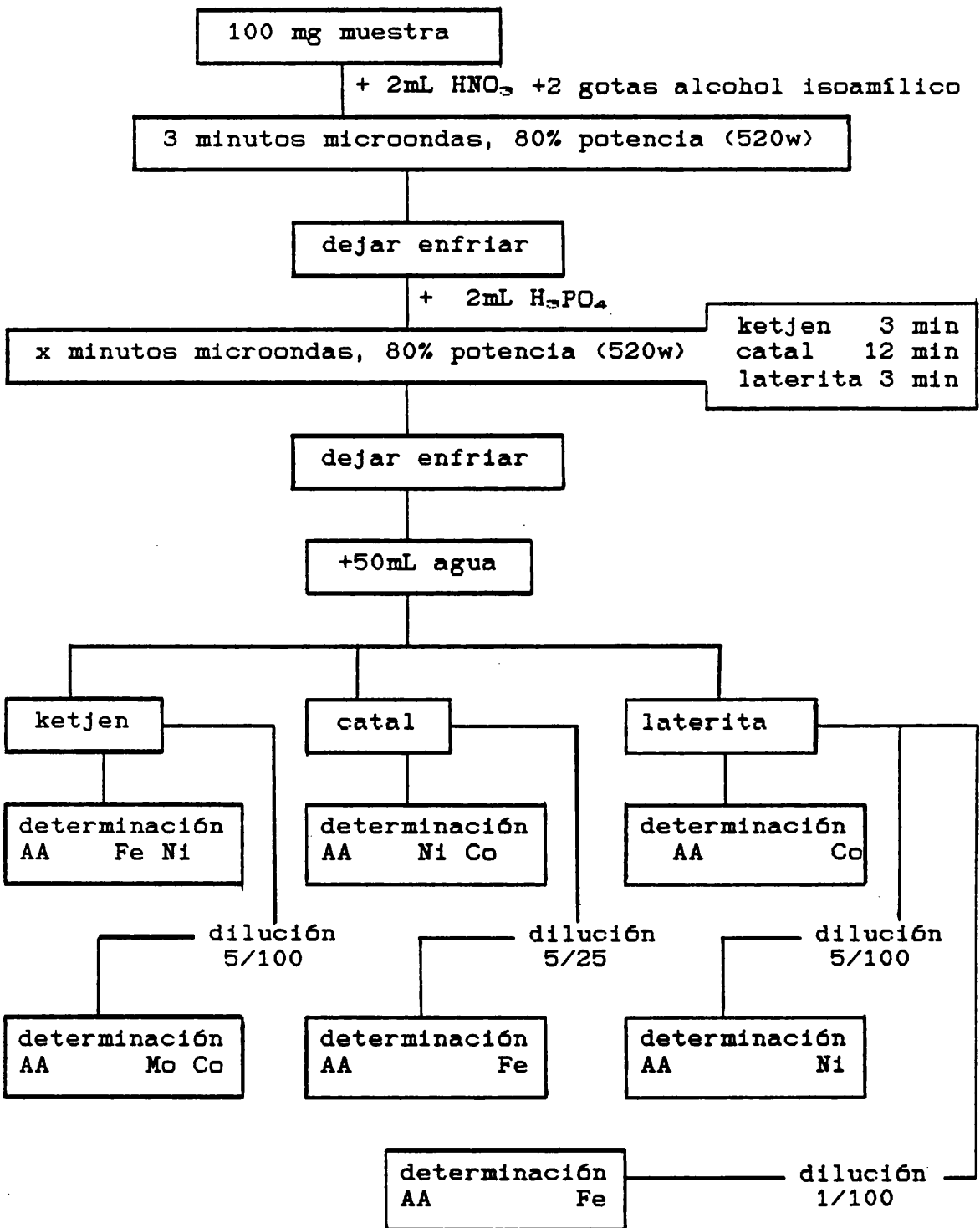
Se ha optado pues por emplear una cantidad de muestra del orden de 100 mg.

De los estudios llevados a cabo, se recomienda el siguiente procedimiento para la digestión y análisis de catalizadores:

Se pesan 100 mg de muestra en un reactor de teflón y se añaden 2 mL de ácido nítrico y 2 gotas de alcohol isoamílico (para prevenir la formación de espuma). Se introduce el reactor en el horno de microondas y se trata a 650W de potencia durante 3 minutos. Dejar enfriar. Se añaden 2 mL de ácido fosfórico y se vuelve a introducir el reactor en el horno de microondas a 650W durante 3-12 minutos (el tiempo requerido es distinto dependiendo del tipo de catalizador), y a continuación se deja enfriar. Añadir 50 mL de agua destilada y hacer las diluciones apropiadas para que las concentraciones de las muestras se encuentren dentro del intervalo lineal de las medidas de absorbancia para cada elemento.

Se alimenta la suspensión de la muestra digerida directamente en la llama aire-acetileno para la determinación de hierro, níquel, cobalto y molibdeno, empleando disoluciones acuosas con la misma concentración de ácido que en las muestras como patrones.

En el esquema adjunto se resume el procedimiento empleado:



II.2.4.3.- Atomización de las muestras.

Cuando se introducen suspensiones directamente en la llama puede haber problemas en la atomización de los componentes de la fase sólida y por ello se ha sugerido que el tamaño de las partículas no debe exceder de unas pocas micras para conseguir análisis exactos utilizando disoluciones acuosas como patrones (Stupar y Ajlec 1982; Carrión y col. 1987; Willians y col. 1987).

En el apartado II.0.2. de esta Tesis y en otros trabajos (Salvador y col. 1988) hemos demostrado que una extracción ácida de los elementos presentes en la muestra asegura su eficiente atomización, independientemente del tamaño de partícula del sólido disperso; además, cuando la extracción ácida puede efectuarse en algunos minutos, es evidente que la metodología desarrollada es más rápida que la molienda de las muestras hasta la obtención de partículas de pequeño tamaño y el análisis directo de la suspensión sin extracción

Para asegurar la buena atomización de los elementos a determinar es necesario garantizar su presencia en la fase ácida, y de esa forma, las ventajas de la introducción de las suspensiones permanecen ya que se evita la filtración de la matriz después de la extracción ácida, y es posible un análisis mas rápido, pero sin los inconvenientes derivados del tamaño de partícula.

En el análisis de las muestras de catalizadores que contienen sílice, la utilización de la introducción de suspensiones, después del tratamiento ácido, permite minimizar su interferencia y evitar los problemas relacionados con la adsorción de los elementos metálicos sobre la superficie de la sílice en estado sólido.

En la tabla II.36 se comparan las concentraciones obtenidas para hierro, cobalto y níquel por introducción directa de la suspensión completa de la muestra digerida del catalizador catal con las obtenidas por introducción del sobrenadante, tras dejar decantar la suspensión.

Tabla II.36: Comparación de las concentraciones obtenidas para Fe, Ni, Co y Mo en el análisis de la muestra del catalizador Catal tras digestión en horno de microondas introduciendo la suspensión y el sobrenadante a la llama.

Elemento	Concentración	
	suspensión (ppm)	sobrenadante (ppm)
Fe	4880 ± 90	4930 ± 90
Ni	122 ± 4	130 ± 4
Co	24 ± 4	27 ± 4

(media de 8 análisis independientes ± su desviación típica)

A la vista de los resultados se concluye que la concentración de los elementos metálicos en la suspensión completa y en el sobrenadante es equivalente, es decir que los elementos metálicos no permanecen en la fase sólida después del tratamiento con microondas sino que son cuantitativamente extraídos.

II.2.4.4.- Características analíticas.

En la tabla II.37 se muestran las curvas de calibrado típicas obtenidas para níquel, hierro, cobalto y molibdeno en los tres tipos de muestras analizadas por absorción atómica previo tratamiento en horno de microondas utilizando el procedimiento recomendado. Los patrones fueron preparados con la misma concentración de ácido que las muestras diluidas.

El límite de detección es bueno para todos los elementos en las muestras analizadas, incluso para el molibdeno a pesar de su baja sensibilidad.

Se ha determinado la recuperación de los elementos estudiados por adición de cantidades conocidas a los tres tipos de catalizadores. La tabla II.38 muestra las recuperaciones obtenidas para cada elemento en cada matriz para una concentración añadida del orden al contenido en las muestras, obteniéndose en todos los casos recuperaciones del orden del 100%.

Tabla II.37: Características analíticas del procedimiento propuesto.

Mtr ^a .	Acid. (%)	Cvas de calib.	Int.conc ^b .	r	LD (ppm)
Determinación de Co					
(1)	0,37	A=0,063 C+0,003	1,0-4,0	0,99995	0,005 (54)
(2)	7,4	A=0,085 C+0,001	0,1-0,4	0,99993	0,004 (2)
(3)	7,4	A=0,061 C+0,005	0,5-4,0	0,9998	0,015 (8)
Determinación de Mo					
(1)	0,37	A=0,008 C+0,000	2,0-10,0	0,9996	0,19 (2052)
Determinación de Ni					
(1)	7,4	A=0,076 C+0,001	0,2-0,8	0,9998	0,004 (2)
(2)	7,4	A=0,076 C+0,001	0,2-0,8	0,99998	0,016 (9)
(3)	0,37	A=0,073 C+0,001	0,5-2,0	0,99987	0,12 (130)
Determinación de Fe					
(1)	7,4	A=0,047 C-0,001	0,2-0,8	0,9996	0,026 (14)
(2)	1,48	A=0,062 C+0,002	1,0-2,5	0,999992	0,014 (378)
(3)	0,074	A=0,055 C+0,004	0,5-3,0	0,9998	0,011 (594)

a: muestra; (1) ketjen, (2) catal, (3) laterita.

b: Intervalo de concentración en ppm.

r: Coeficiente de regresión.

LD: Límite de detección. Los valores entre paréntesis indican el límite de detección expresado en μg de elemento teniendo en cuenta la dilución empleada.

Tabla II.38: Porcentaje de recuperación de la determinación de Fe, Ni, Co y Mo en diferentes muestras de catalizadores por espectrometría de absorción atómica previa digestión en horno de microondas.

Elemento	Porcentaje recuperación		
	KBTJEN	CATAL	LATERITA
Fe	102 ± 5	101 ± 1	105.0 ± 0.7
Ni	104.5 ± 1.2	103 ± 2	100.6 ± 0.9
Co	103 ± 3	102 ± 8	99.6 ± 1.4
Mo	100 ± 3	-	-

Los valores experimentales están indicados en porcentaje \pm el coeficiente de variación de 4 determinaciones independientes de este parámetro para la misma concentración añadida.

Por otro lado, se ha evaluado la exactitud del método propuesto comparando los resultados obtenidos con los encontrados empleando un método de digestión convencional.

Los resultados indicados en la tabla II.39 son comparables teniendo en cuenta la precisión de ambos métodos. La baja precisión obtenida en algunos casos con el método propuesto puede ser debida al bajo peso de muestra empleado en el tratamiento en horno de microondas, lo cual puede afectar a la representatividad de las muestras sólidas.

Tabla II.39: Comparación de los resultados obtenidos en el análisis de catalizadores tras digestión en horno de microondas y tras digestión por vía húmeda.

ELEMENTO		CONCENTRACION MUESTRA / ppm		
		KETJEN	CATAL	LATERITA
Ni	Microondas	72 ±5	126 ±9	15350 ± 60
	Convencional	63.2 ±0.7	141 ±3	17240 ±130
Fe	Microondas	194 ±15	4930 ±90	133000 ±5000
	Convencional	215 ± 8	5260 ±30	140000 ±2000
Co	Microondas	25800 ±600	27 ±4	409 ± 7
	Convencional	26400 ±200	20.5 ±0.7	340 ±13
Mo	Microondas	73000 ±4000		
	Convencional	66500 ±2000		

Se realizaron 14 determinaciones para cada elemento en el análisis de la muestra de Ketjen por el método de microondas, 8 en el análisis de la muestra de Catal y 4 en el análisis de la muestra de Laterita, y 4 determinaciones para cada elemento en la digestión convencional.

II.2.5.- Conclusiones.

De todo lo expuesto se concluye que los catalizadores sólidos pueden digerirse en horno de microondas, empleando un tratamiento con HNO_3 y con H_3PO_4 , durante un tiempo del orden de 6 a 15 minutos según el tipo de catalizador. Añadiendo agua destilada al residuo de la digestión se forma una suspensión que puede alimentarse directamente en el espectrómetro de absorción atómica determinándose cuantitativamente los elementos metálicos que han sido extraídos.

5.- PARTE III:

DISEÑO DE UNA MUFLA DE MICROONDAS Y SU EMPLEO EN LA CALCINACION DE MUESTRAS. DETERMINACION DE ELEMENTOS METALICOS POR ESPECTROMETRIA ATOMICA CON LLAMA MEDIANTE INTRODUCCION DE SUSPENSIONES DE LAS MUESTRAS CALCINADAS.

III.1.- Introducción.

Los recientes avances en la utilización de los hornos de microondas para acelerar la velocidad de los procesos químicos en disolución y para la digestión de las muestras por vía húmeda permiten el desarrollo de metodologías rápidas, tal y como se ha podido comprobar en la PARTE I y II de esta Tesis.

Sin embargo, en el análisis químico algunas veces se requiere, para la digestión completa de las muestras, el empleo de temperaturas elevadas que no son fáciles de obtener en los hornos de microondas convencionales. Por otra parte, cuando las especies a determinar están presentes en la muestra en bajas concentraciones, no es aconsejable diluir las muestras y, en este caso, solo los métodos de digestión por vía seca permiten, tanto la destrucción de la matriz como la preconcentración de los componentes minerales; debido a la gran disminución en el peso de la muestra que tiene lugar en su reducción a cenizas.

Tanto los hornos de microondas domésticos, utilizados corrientemente para el trabajo en el laboratorio, como la mayoría de los sistemas comercializados para su empleo en el laboratorio, no permiten obtener temperaturas mayores de 200 °C y por ello no se han utilizado todavía con fines analíticos en la digestión por vía seca de las muestras. No

obstante, el carburo de silicio absorbe la radiación de microondas fuertemente calentándose hasta ponerse al rojo y alcanzando temperaturas del orden de 1000°C , hecho que puede utilizarse para obtener elevadas temperaturas en un horno de microondas. Estas altas temperaturas se pueden alcanzar por absorción de la radiación de microondas y por la convección térmica a partir del carburo de silicio. Como consecuencia y en base a este principio puede desarrollarse un horno mufla de microondas.

Los trabajos publicados en la bibliografía sobre la utilización de los hornos mufla de microondas se refieren al procesamiento de materiales cerámicos (Komatsu y col. 1987; Sheppard 1988; Sutton 1989), "sintering" (Quemeneur y col. 1985; Ilttil y Maestro 1987; Das y Curlee 1987; Wilson y Kunz 1988; Park y Meek 1990), síntesis de compuestos de estado sólido (Baghrust y Mingos 1988) o soldadura de materiales (Palaith y Silberglitt 1989) y también a la digestión por microondas de muestras geológicas con Na_2O_2 y $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Matthes 1988).

Probablemente no se hayan desarrollado las aplicaciones analíticas porque sólo hay un horno mufla de microondas comercializado para su utilización en el laboratorio (Collins 1985; Collins y Hargett 1986) y este es un sistema compacto de elevado coste, que no puede adaptarse a los microondas domésticos.

III.2.- Objetivo.

Esta parte de la Tesis se ha centrado en el diseño de un accesorio que permite convertir un horno de microondas doméstico en un horno mufla en el que poder llevar a cabo procesos de digestión a altas temperaturas; de tal forma que puedan realizarse calcinaciones más rápidamente que en las muflas convencionales, y con un menor coste energético.

La mufla diseñada se ha utilizado para la calcinación de muestras vegetales, que en mufla convencional necesitan 6 h de tratamiento a 600°C.

Se han determinado Ca, Mg, K, Fe, Mn y Zn por espectrometría atómica con llama introduciendo una suspensión de las cenizas obtenidas por calcinación mediante un sistema FIA que permite la rápida dilución de las muestras y un ahorro de reactivos, cuando los valores de concentración son elevados, y la introducción de la suspensión en "batch" cuando la concentración de los elementos a determinar es baja. Los coeficientes de recuperación se han obtenido por comparación de los resultados obtenidos con los valores certificados o con los obtenidos empleando un tratamiento en mufla convencional.

III.3.- Parte experimental.

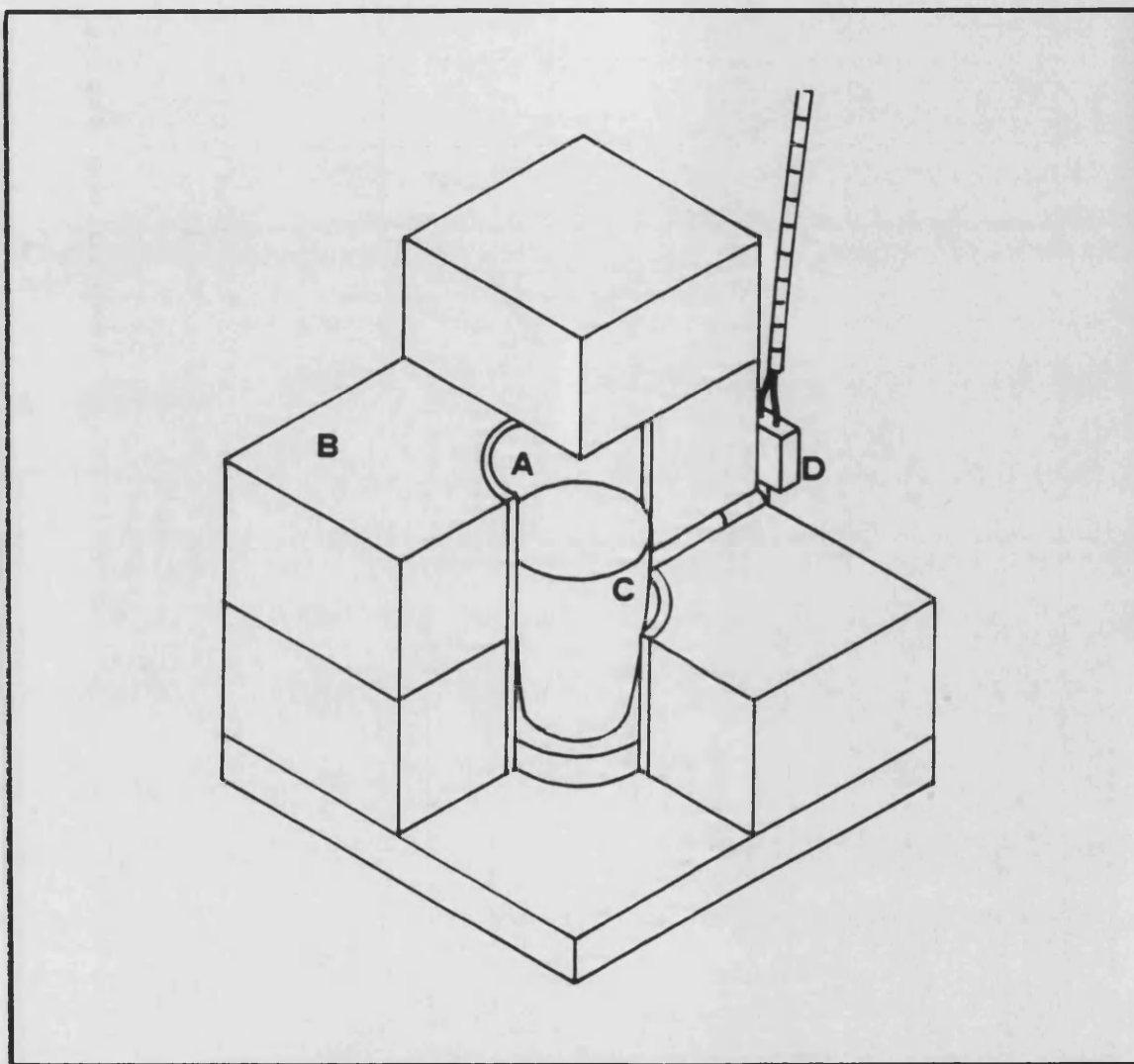
III.3.1.- Aparatos y reactivos.

Para la digestión de las muestras se ha utilizado un horno de microondas doméstico modelo Balay Bahm-100, con un magnetrón de 2450 MHz de frecuencia y una potencia máxima de 650W. Este horno se ha modificado para obtener temperaturas elevadas.

El horno mufla diseñado (figura III.1) se compone de un anillo de carburo de silicio (A) introducido dentro de un bloque de ladrillos refractarios (B). El carburo de silicio actúa como absorbente de la radiación de microondas, alcanzándose por ello en pocos minutos temperaturas elevadas. Un crisol (C), introducido dentro del anillo, se calienta por convección. Se utiliza un pirómetro (D) de Pt/Pt-Rh para controlar la temperatura del crisol, conectado a un regulador de temperatura digital (E) que controla la puesta en marcha del magnetrón.

En la figura III.2 se indica un esquema general de la mufla introducida dentro de un horno de microondas doméstico.

Figura III.1: Detalle de los diferentes componentes de la mufla diseñada.



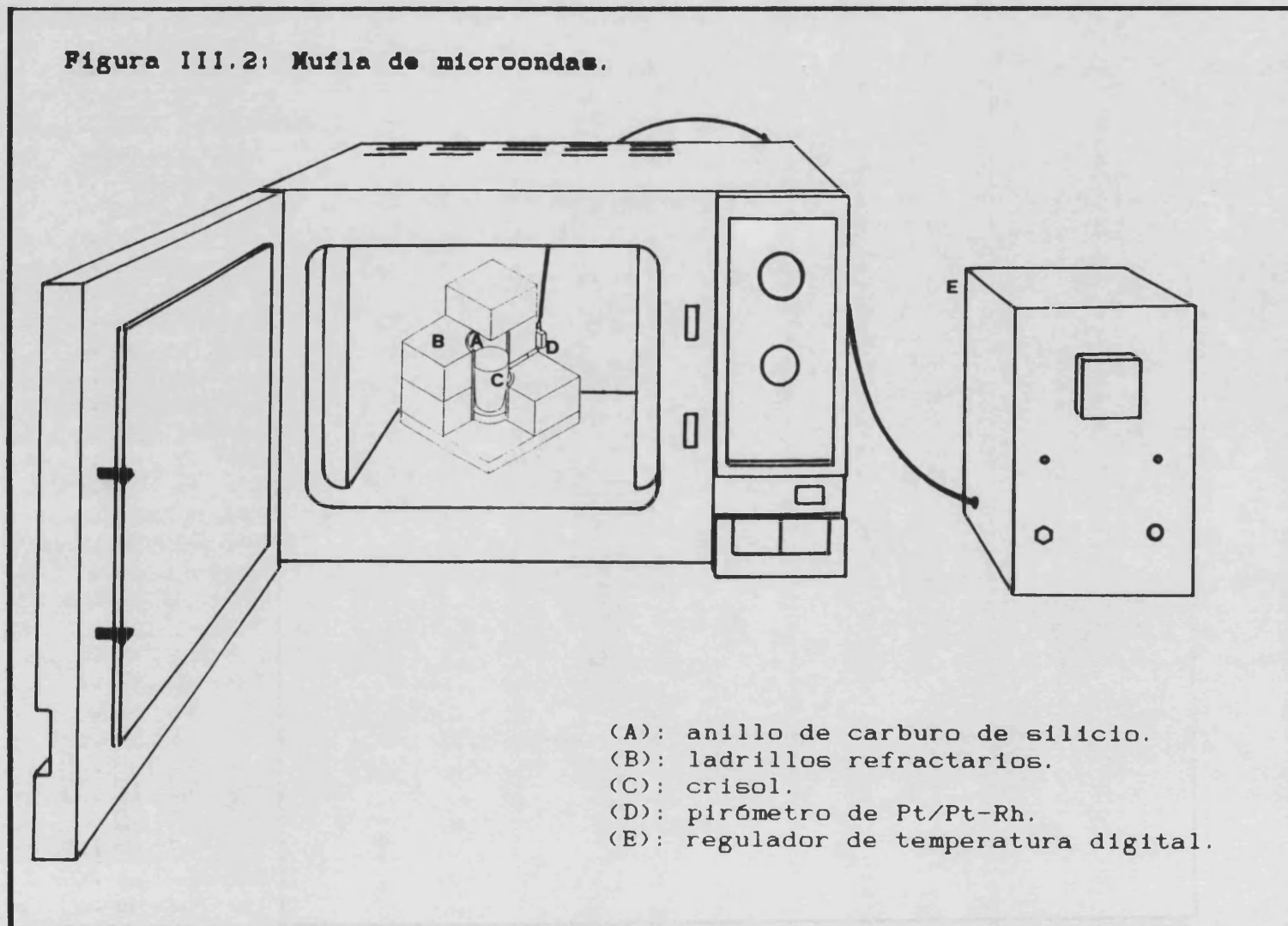
(A): anillo de carburo de silicio.

(B): ladrillos refractarios.

(C): crisol.

(D): pirómetro de Pt/Pt-Rh.

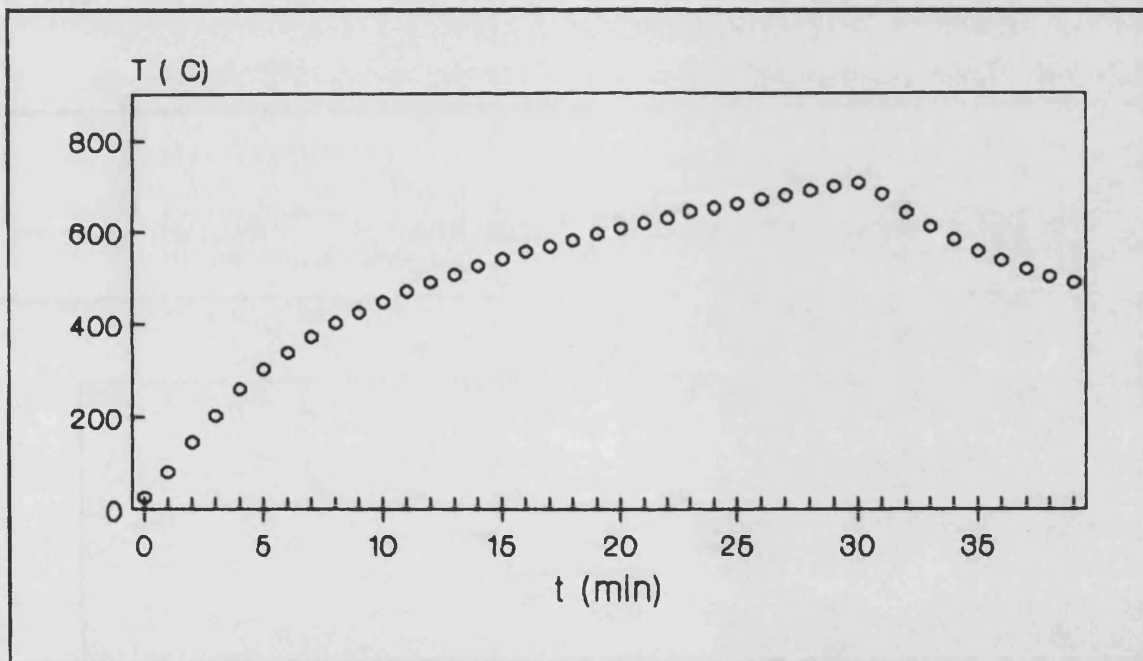
Figura III.2: Mufla de microondas.



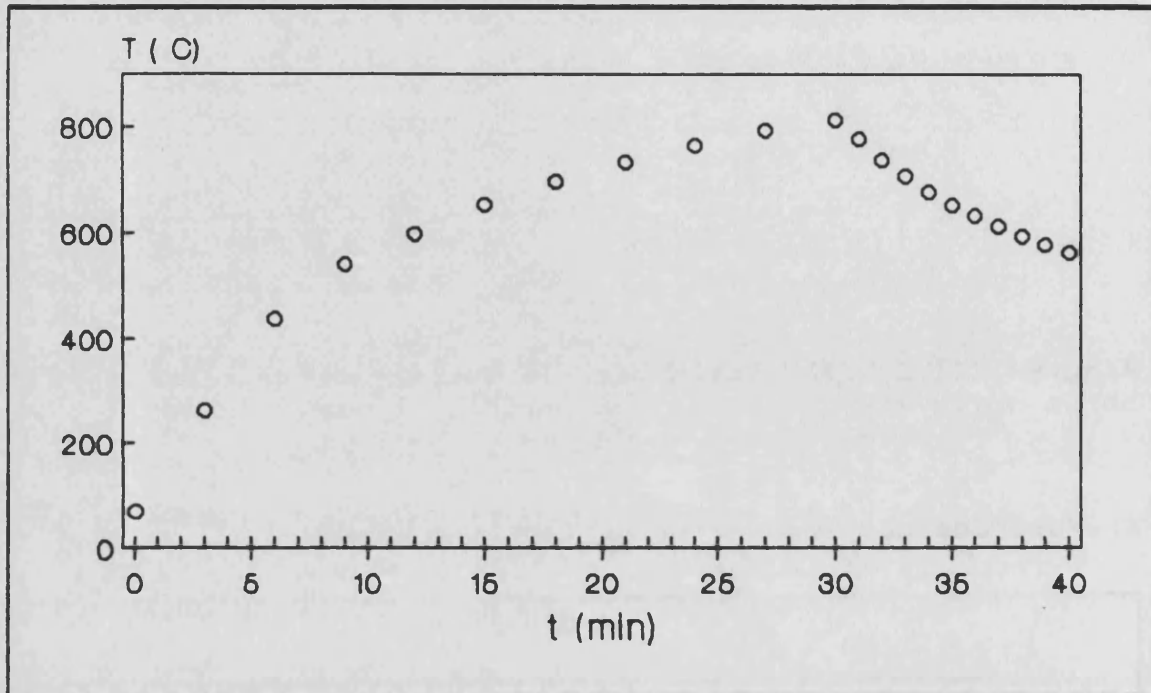
En las figuras III.3 A-D se pueden ver las temperaturas alcanzadas en función del tiempo de irradiación.

Figura III.3: Variación de la temperatura alcanzada en el horno mufla en función de los períodos de irradiación.

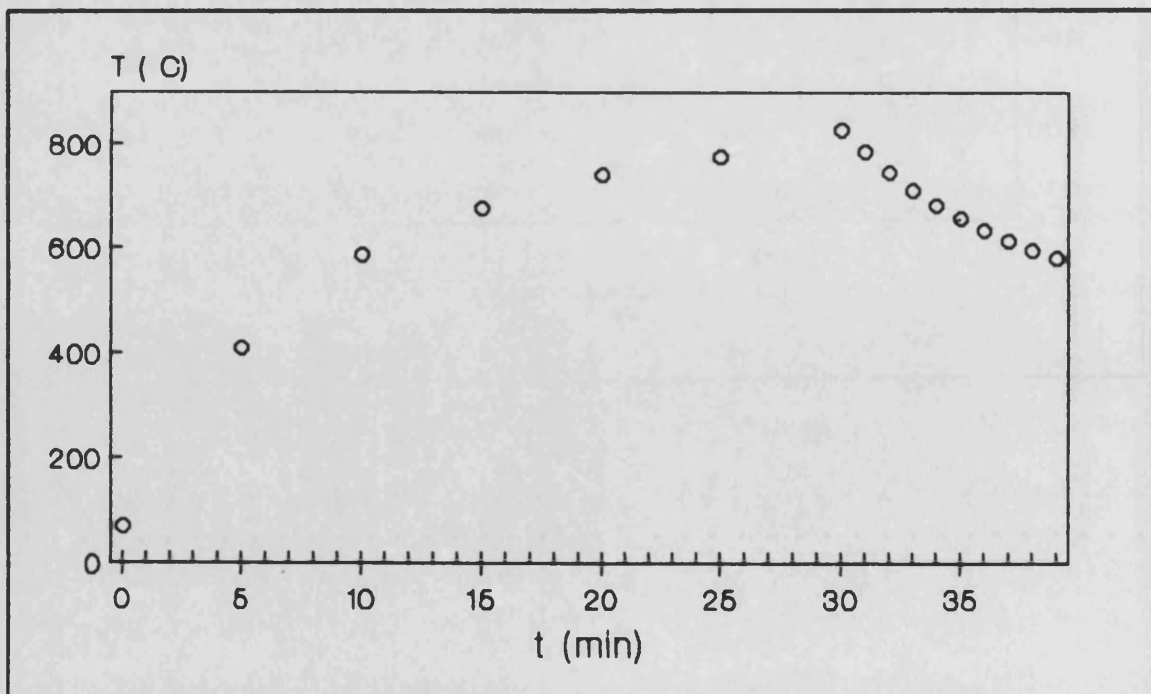
A: Períodos de irradiación de 1 minuto.



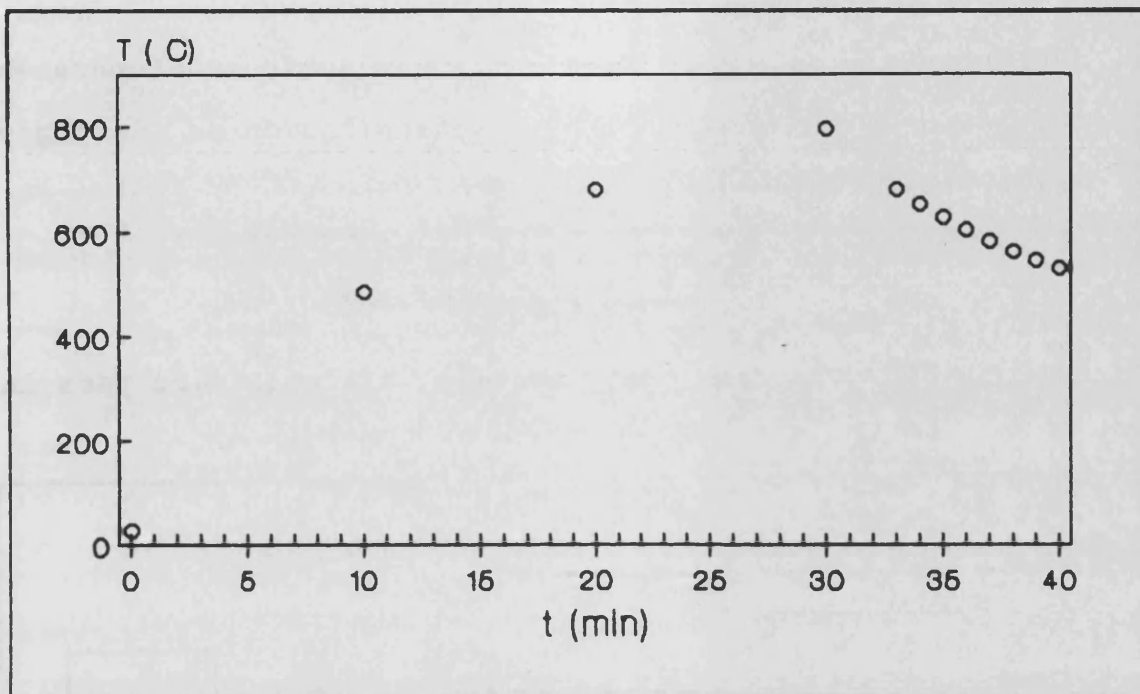
B: Períodos de irradiación de 3 minutos.



C: Períodos de irradiación de 5 minutos.



D: Períodos de irradiación de 10 minutos.



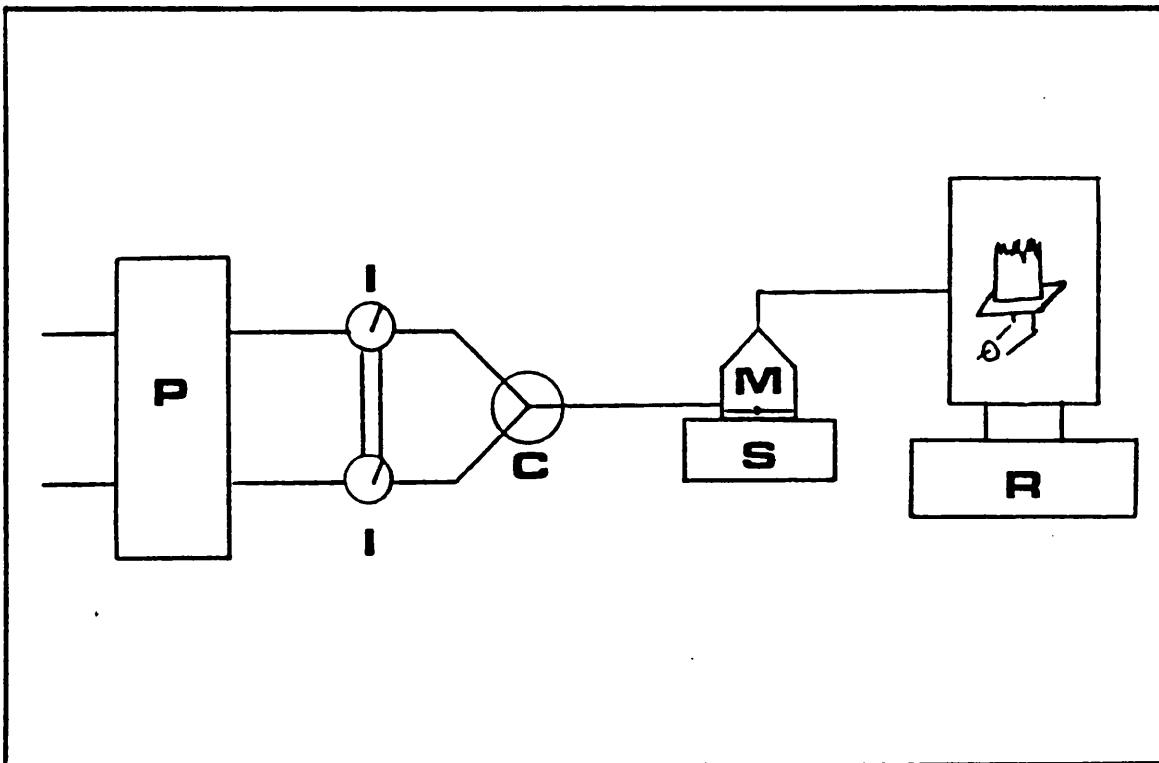
Para la calcinación de las muestras se ha utilizado también un horno mufla convencional Heron, modelo 12-PR/200 serie 8B.

La determinación de K se ha realizado por emisión atómica utilizando un espectrómetro de absorción atómica, Shimadzu modelo AA-660. Ca, Fe, Mn y Zn se han determinado por absorción atómica con llama utilizando un espectrómetro Perkin-Elmer modelo 5000 equipado con lámpara de deuterio

como corrector de fondo lámparas de cátodo hueco monoelementales para la determinación de Ca y Zn, y lámpara multielemental para la determinación de Mn y Fe.

Se ha utilizado un montaje FIA de doble canal para la introducción de las muestras en la determinación de Ca, Mg y K; según se indica en la figura III.4.

Figura III.4: Diagrama del montaje FIA utilizado para la determinación de Ca, Mg y K.



- P: Bomba peristáltica.
- I: Sistema de inyección.
- C: Conector de tres vías.
- M: Cámara de dilución.
- S: Agitador magnético.
- R: Registrador.

Se ha utilizado una bomba peristáltica Gilson minipulse 2 para transportar las muestras. Un doble inyector, construido sincronizando dos válvulas rotatorias Rheodyne-50 permite la inyección simultánea de 100 μL de muestra (o patrón) y de la disolución de lantano (que evita la ionización y la interferencia química de los fosfatos en las determinaciones). Los dos canales del sistema se unen en una zona de convergencia en Y y la dilución se lleva a cabo en una cámara de mezcla de teflón de 2,2 mL desarrollada por nosotros. Se ha utilizado un flujo del caudal portador en cada uno de los dos canales de 5 mL/min.

Las condiciones experimentales utilizadas para el análisis de cada elemento se indican en la tabla III.1. En todos los casos se ha utilizado una llama aire-acetileno, bola de impacto y un tiempo de integración de 0.5s.

Se preparó una disolución "stock" de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Ca disolviendo 1.249 g de carbonato de calcio sptp en 50 mL de agua desionizada y añadiendo gota a gota un volumen mínimo de HCl para la disolución completa del CaCO_3 y diluyendo a 1 L con agua desionizada.

Se preparó una disolución "stock" de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Mg disolviendo 3.916 g cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en 200 mL de agua desionizada y diluyendo a 1L con agua desionizada.

TABLA III.1: Parámetros experimentales utilizados para la determinación de cada elemento por espectrometría de absorción y de emisión atómica.

Parametro	Elemento					
	Ca	Mg	K	Fe	Mn	Zn
Técnica	AA	AA	E	AA	AA	AA-BG
L. de onda/nm	422.7	285.2	766.5	248.3	279.5	213.9
Rendija/nm	0.7	0.7	0.5	0.2	0.2	0.7
I. corriente/mA	8	3	-	11	11	8
altura mechero/cm	1.5	1.5	1.0	1.5	1.5	1.5
caudal C ₂ H ₂ (L min ⁻¹)	1	1	4	1	1	1
caudal Aire (L min ⁻¹)	11.5	11.5	8	11.5	11.5	11.5
Angulo mechero (°)	180	90	180	180	180	180

Todas las medidas fueron realizadas por un instrumento Perkin-Elmer a excepción del K que se utilizó un instrumento Shimadzu.

AA: Absorción atómica.

BG: Corrector de fondo.

E: Emisión atómica.

Se preparó una disolución "stock" de 1000 µg mL⁻¹ de K disolviendo 1.907 g de cloruro de potasio en 1 L de agua desionizada.

Se preparó una disolución "stock" de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Fe disolviendo 1.000 g de hierro en polvo en 50 mL de ácido nítrico (1+1) y diluyendo a 1 L con agua destilada.

Se preparó una disolución "stock" de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Mn disolviendo 1.000 g de manganeso metal en un volumen mínimo de ácido nítrico (1+1) y diluyendo a 1 L con HCl al 1% (v/v).

Se preparó una disolución "stock" de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Zn disolviendo 0.500 g de Zn metal en un volumen mínimo de HCl (1+1) y diluyendo a 1 L con HCl al 1% (v/v).

Se ha utilizado ácido nítrico Baker (Holland).

III.3.2.- Procedimiento general.

Se han llevado a cabo estudios para establecer las mejores condiciones de calcinación de las muestras en la mufla de microondas.

En general se pesa 1.0000 g de muestra vegetal en un crisol de porcelana y se calienta en un mechero Bunsen hasta obtención de unas cenizas oscuras (alrededor de 5 minutos). Después se introduce el crisol en un horno mufla de microondas y se irradia a la máxima potencia (650 w) y ensayando distintos tiempos de irradiación y de permanencia

en el horno. Se añade 1 mL de ácido nítrico concentrado sobre las cenizas obtenidas después del tratamiento y la suspensión resultante se diluye a 50 mL con agua destilada. Para obtener las medidas de las muestras dentro del intervalo lineal de cada uno de los elementos a determinar se llevan a cabo las diluciones adecuadas.

La determinación de Fe, Mn y Zn por espectrometría de absorción atómica se lleva a cabo introduciendo la suspensión directamente en la llama aire-acetileno. Para la determinación de Ca y Mg por absorción atómica y la determinación de K por emisión con llama, como ya se ha indicado, se utilizó el montaje FIA descrito.

III.4.- Resultados y discusión.

III.4.1.- Efecto de las condiciones de carbonización.

En la tabla III.2 se indican las concentraciones de Fe, Mn y Zn en una muestra vegetal, obtenidas por análisis en absorción atómica previo calentamiento directo en el horno mufla de microondas, empleando diferentes condiciones.

En una serie de experiencias, las muestras se irradiaron entre 15 y 30 minutos y se sacaron del horno mufla. En otra serie, las muestras no se sacaron inmediatamente después del

período de irradiación, sino que se dejaron en reposo durante 10 minutos dentro de la mufla después de desconectar el magnetrón. Los resultados obtenidos en el último caso fueron mejores que los obtenidos en el primero, sin embargo la recuperación de los elementos fué excesivamente baja.

TABLA III.2: Determinación de Fe, Mn y Zn en vegetales tras calcinación en horno mufla de microondas utilizando diferentes condiciones.

Condiciones de calcinación		Fe		Mn		Zn	
tiempo de irradiación (min)	tiempo adicional (min)	µg/g	R%	µg/g	R%	µg/g	R%
15	-	42	74	12	84	23	82
20	-	33	58	10	70	16	57
25	-	33	58	13	91	19	68
30	-	46	81	13	91	23	82
5	10	19	33	9	63	25	90
10	10	37	65	11	77	24	86
15	10	73	128	12	84	24	86
20	10	45	95	13	91	23	82

Concentration real: 57 ± 2 14.3 ± 0.4 27.9 ± 1.4

R: porcentaje de recuperación (%).

Por este motivo se empleó una metodología mixta. Las muestras se calentaron directamente en un mechero Bunsen hasta carbonización (alrededor de 5 minutos) y entonces se introdujeron en la mufla de microondas. Así, se obtienen recuperaciones del orden del 90% utilizando tiempos de irradiación del orden de 20 minutos y 10 minutos adicionales dentro de horno sin irradiación, tal como se muestra en la tabla III.3.

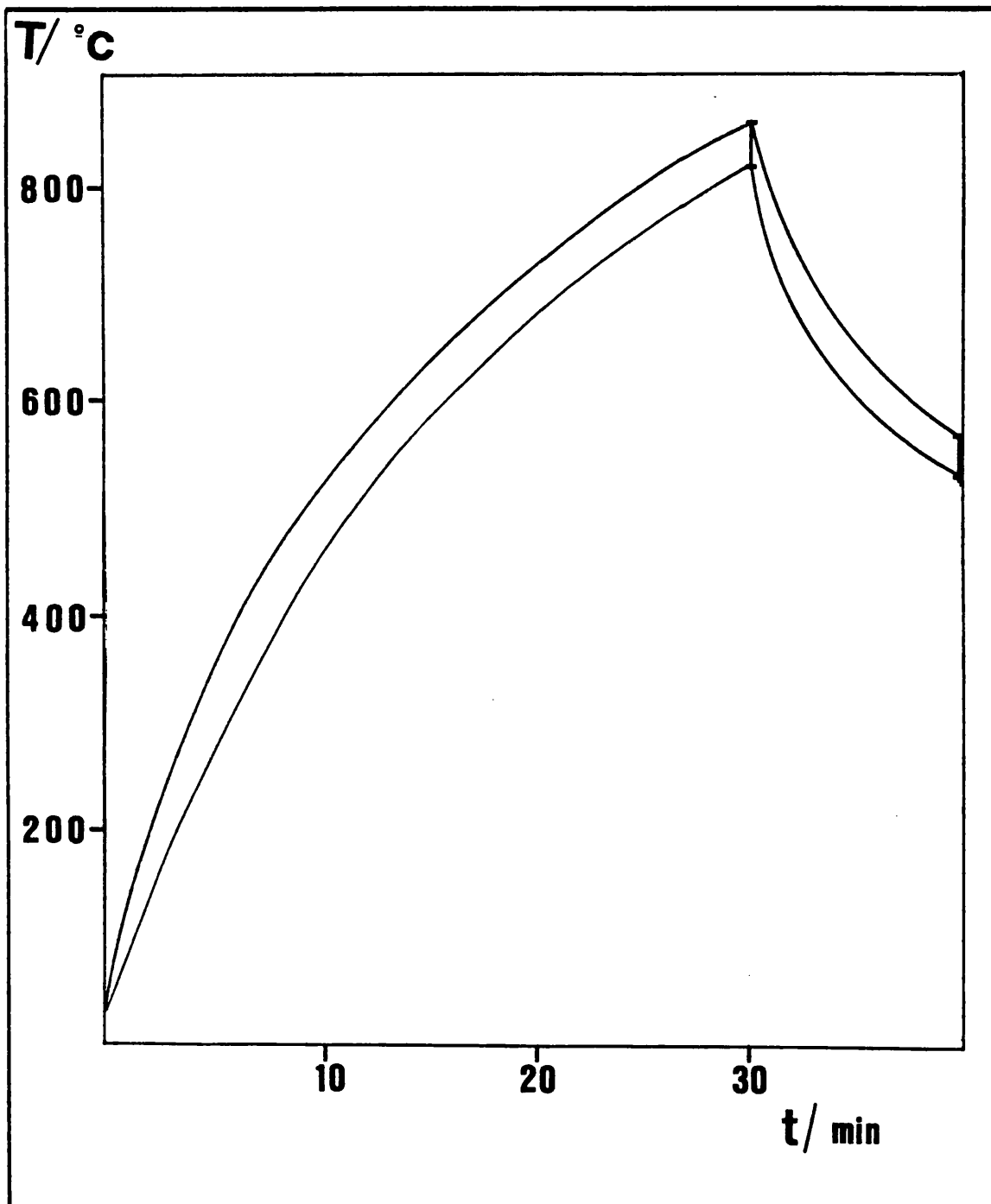
TABLA III.3: Recuperación de Fe, Mn y Zn en matrices vegetales tras calcinación en horno mufla de microondas previa carbonización de las muestras en mechero bunsen.

Condiciones de calcinación		Fe		Mn		Zn	
Tiempo de irradiación (min)	tiempo adicional (min)	µg/g	R%	µg/g	R%	µg/g	R%
10	10	46	81	12	84	27	97
15	10	39	68	12	84	28	100
20	10	50	88	13	91	27	97
30	10	55	96	12	84	27	97

Concentración real: 57 ± 2 14.3 ± 0.4 27.9 ± 1.4

En la figura III.5 se muestran las curvas de calentamiento y enfriamiento en las mejores condiciones de calcinación encontradas.

Figura III.5: Curvas de calentamiento y enfriamiento en las condiciones de trabajo.



III.4.2.- Análisis de muestras vegetales.

Para verificar la exactitud del método, se han analizado tres muestras vegetales determinándose los contenidos de Ca, Mg, K, Fe, Mn y Zn. Dos de ellas son muestras certificadas (Citrus Leaves SRM-1572, y Tomato Leaves SRM-1573) del National Bureau of Standards; y la otra es una muestra real (hojas de alcachofa), que se analizó previamente por un procedimiento de referencia (calcinación convencional de las muestras y determinación de los elementos considerados por absorción atómica o emisión en llama).

En la tabla III.4 se muestran los resultados obtenidos, y como puede apreciarse, los valores son comparables para los seis elementos analizados en las tres muestras, excepto en la determinación del Fe en la muestra "Tomato Leaves", lo que podría estar relacionado con la presencia de diferentes formas químicas del Fe no solubles en ácido nítrico. Por otro lado puede observarse que, en todos los casos, el procedimiento desarrollado proporciona resultados más precisos para todos los elementos determinados.

TABLA III.4: Análisis de muestras vegetales reales por espectrometría atómica tras calcinación de las muestras con el horno mufla de microondas.

Muestra	El.	Concentración certificada	Concentración obtenida	€%
Citrus Leaves	Ca	3.1 ± 0.1%	3.09 ± 0.02%	0.3
	Mg	0.58 ± 0.03%	0.59 ± 0.02%	1.7
	K	1.82 ± 0.06%	1.80 ± 0.02%	1.1
SRM-1572	Fe	90 ± 10 ppm	89 ± 2 ppm	1.1
	Mn	23 ± 2 ppm	24.3 ± 0.6 ppm	5.6
	Zn	29 ± 2 ppm	29.1 ± 0.3 ppm	0.3
Tomato Leaves	Ca	3.00 ± 0.03%	3.01 ± 0.01%	0.3
	Mg	0.70	0.650 ± 0.007%	7.1
	K	4.46 ± 0.03%	4.49 ± 0.02%	0.7
SRM-1573	Fe	690 ± 25 ppm	470 ± 20 ppm	32
	Mn	238 ± 7 ppm	220.7 ± 0.8 ppm	7.3
	Zn	62 ± 6 ppm	60.9 ± 0.6 ppm	1.8
Hojas de alcachofa (*)	Ca	1.79 ± 0.03%	1.79 ± 0.02%	0
	Mg	0.296 ± 0.009%	0.292 ± 0.005%	1.3
	K	5.9 ± 0.2%	6.22 ± 0.03%	5.4
	Fe	1490 ± 50 ppm	1360 ± 20 ppm	8.7
	Mn	54 ± 1 ppm	54.1 ± 0.5 ppm	0.2
	Zn	43 ± 1 ppm	42.5 ± 0.3 ppm	1.1

* Los datos de esta muestra no son certificados y se han obtenido a partir de una calcinación en un horno mufla convencional.

€%: Error relativo en porcentaje.

Las medias y las desviaciones típicas se han obtenido a partir de 3 análisis independientes para cada elemento en las muestras de Citrus and Tomato Leaves, y 5 análisis independientes para cada elemento en la muestra de hojas de alcachofa.

En la tabla III.5 se muestra que el peso de las muestras se reduce entre el 80 y el 90%. Esta preconcentración de las muestras, debido a la destrucción de la materia orgánica, hace que el proceso de suspensión sea más sencillo y, por otra parte, compensa la dilución de las muestras. Esto supone una ventaja sobre las elevadas diluciones que se producen en los procesos de digestión por vía húmeda.

TABLA III.5: Pérdida de peso de las muestras vegetales durante la calcinación en mufla de microondas.

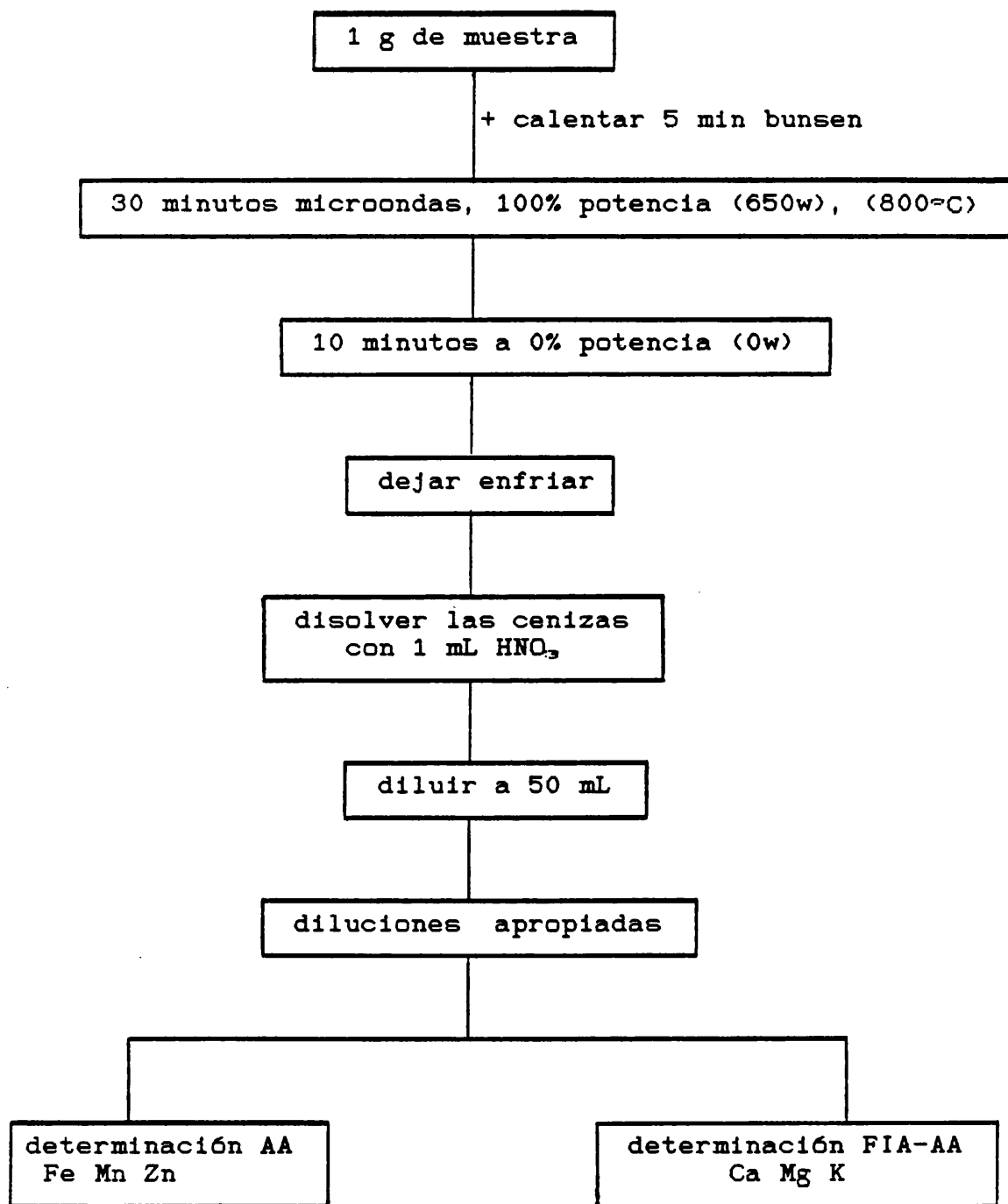
Muestra	Pérdida de peso en el proceso de carbonización + calcinación por microondas
Citrus Leaves	90.0 ± 0.4 %
Tomato Leaves	82.5 ± 0.2 %
Hojas de alcachofa	80.9 ± 0.5 %

De los estudios llevados a cabo se recomienda el siguiente procedimiento para la calcinación y análisis de muestras vegetales:

Se pesa 1 g de muestra en un crisol de porcelana y se calienta durante 5 minutos en un mechero bunsen hasta obtención de cenizas oscuras. A continuación se introduce el crisol en el horno mufla de microondas y se irradia a la potencia máxima (650w) durante 30 minutos. El crisol se deja dentro de la mufla durante un tiempo adicional de 10 minutos sin recibir irradiación y se deja enfriar a temperatura ambiente. Añadir 1 mL de HNO_3 sobre las cenizas procedentes de la calcinación, llevar a 50 mL con agua destilada y hacer las diluciones apropiadas para que las concentraciones de las muestras se encuentren dentro del intervalo lineal de las medidas de absorbancia para cada elemento.

Se alimenta la suspensión de la muestra calcinada, directamente en la llama aire-acetileno para la determinación de Fe, Mn y Zn, y mediante un montaje FIA para la determinación de Ca, Mg y K; empleando en ambos casos disoluciones acuosas con la misma concentración de ácido tanto en muestras como patrones.

En el esquema adjunto se resume el procedimiento empleado.



III.4.3.- Parámetros analíticos del procedimiento desarrollado.

Los parámetros analíticos del procedimiento recomendado se indican en la tabla III.6 para cada uno de los elementos considerados.

La sensibilidad, como en los casos anteriores, se ha tomado a partir de un valor representativo de la pendiente de la recta de calibrado para cada elemento, en unidades de absorbancia por ppm.

El límite de detección se ha expresado como la concentración que corresponde a tres veces (nivel de probabilidad del 95%) la desviación típica de las lecturas de absorbancia del blanco (para 10 medidas) dividido por la pendiente de la recta de calibrado, teniendo en cuenta el nivel de dilución de las muestras. Para el análisis de Ca, Mg y K, el empleo de una dilución en línea de las muestras (necesaria para la determinación de estos elementos en los niveles normales de las muestras vegetales) proporciona elevados límites de detección, que podrían reducirse para muestras con niveles de concentración menores, sin más que modificar la de dilución de las muestras.

TABLA III.6: Parámetros analíticos del procedimiento optimizado.

Elemento	Sensibilidad u.a./ppm	LD	CV/%
Ca	$1.92 \cdot 10^{-3}$	0.1 %	0.06 - 1
Mg	$2.21 \cdot 10^{-3}$	0.005 %	1 - 3
K*	$6.01 \cdot 10^{-3}$	0.20 %	0.4 - 1
Fe	$6.10 \cdot 10^{-2}$	0.9 $\mu\text{g/g}$	1 - 4
Mn	$1.44 \cdot 10^{-1}$	0.42 $\mu\text{g/g}$	0.4 - 2
Zn	$3.12 \cdot 10^{-1}$	0.24 $\mu\text{g/g}$	0.7 - 1

u.a.: Unidades arbitrarias de absorbancia.

*: Para el K la sensibilidad se expresa en unidades arbitrarias de emisión por ppm.

Los coeficientes de variación obtenidos a partir de tres análisis independientes de una serie de muestras reales se expresan en porcentaje y muestran la precisión de la metodología desarrollada.

Los tres parámetros establecidos son del mismo orden que los obtenidos habitualmente en la determinación de estos elementos por absorción atómica.

III.4.4.- Mecanismo de atomización de la muestra.

La rápida calcinación de las muestras vegetales en la mufla de microondas no proporciona la descomposición total de la matriz y, por otra parte, el tratamiento ácido de las cenizas proporciona una suspensión en la que en la fase sólida hay una cantidad apreciable de SiO_2 y otros materiales no digeridos.

La introducción directa de la dispersión sólida de las muestras en la llama se ha llevado a cabo para diferentes tipos de muestras, como ya se ha indicado en la PARTE II, y se ha demostrado que, previa digestión de las muestras, los resultados encontrados son independientes del tamaño de las partículas dispersadas, tanto mediante introducción convencional de las muestras como mediante inyección en flujo continuo.

Para determinar el mecanismo de atomización de las muestras en suspensión después del procedimiento desarrollado, se han analizado tanto la suspensión como la disolución sobrenadante.

En la tabla III.7 se indican los resultados obtenidos en el análisis de la disolución sobrenadante y de la suspensión. También se indican los resultados obtenidos previo tratamiento de las muestras en el horno mufla convencional durante 6 horas a 600°C .

TABLA III.7: Comparación de los resultados obtenidos en el análisis de las muestras vegetales mediante la introducción directa de la suspensión de las cenizas y la introducción de la fase sobrenadante.

Concentración					
El.	Horno mufla de microondas Suspensión		mufla de microondas Sobrenadante		Mufla convencional
Ca	1.79	±0.02 %	1.79	±0.02%	1.79 ±0.03 %
Mg	0.292	±0.005%	0.287	±0.03%	0.296 ±0.009%
K	6.22	±0.03 %	6.22	±0.03%	5.9 ±0.2 %
Fe	1360	±20 ppm	1370	±40 ppm	1490 ±50 ppm
Mn	54.1	±0.5 ppm	53.9	±0.6 ppm	54 ± 1 ppm
Zn	42.5	±0.3 ppm	42.0	±0.3 ppm	43 ± 1 ppm

Los resultados encontrados para la atomización de la suspensión son similares a los obtenidos para la disolución sobrenadante, por ello es evidente que los elementos determinados se han extraído cuantitativamente en la fase líquida al igual que se observó en los procesos de digestión ácida a presión. Además, las partículas en suspensión no afectan a la atomización de los elementos determinados, lo cual indica que el procedimiento desarrollado es independiente del tamaño de las partículas.

III.5.- Conclusiones.

El procedimiento desarrollado demuestra que el horno mufla de microondas diseñado es un accesorio interesante que puede utilizarse para obtener elevadas temperaturas en un horno de microondas doméstico y proporcionar una rápida calcinación de las muestras para la determinación de los elementos minerales por espectrometría atómica. Este mismo diseño puede utilizarse para llevar a cabo otros procesos térmicos que requieren altas temperaturas, Por otra parte, el diseño inicial puede mejorarse para dar cabida a un mayor número de crisoles.

En particular es de destacar que en todas las experiencias llevadas a cabo se partió de la temperatura ambiente; con lo que el tiempo requerido para obtener la temperatura de calcinación de las muestras en la mufla es mayor del que habitualmente puede obtenerse si se realizan varias calcinaciones sucesivas.

6.- CONCLUSIONES.

Los estudios llevados a cabo a lo largo del desarrollo de la presente Tesis Doctoral han supuesto una contribución al empleo de los hornos de microondas en la Química Analítica, de la que desearía destacar:

La aceleración de reacciones, empleadas como etapa previa para el análisis de compuestos orgánicos, tales como benzodiazepinas, y para la determinación de aminoácidos en proteínas. En este sentido se ha logrado reducir drásticamente los tiempos de hidrólisis convencional a la vez que se han aportado datos significativos sobre la influencia de los parámetros de digestión.

La digestión, tanto de muestras ricas en materia orgánica (lodos de depuradora), como de muestras difícilmente solubles (catalizadores) desarrollando una metodología muy rápida (entre 3 y 15 minutos) basada en la selección de los ácidos, el empleo de digestores a presión y la alimentación en los sistemas de medida de suspensiones de las muestras previamente digeridas, demostrando que el empleo de suspensiones en espectrometría atómica puede proporcionar métodos de análisis rápidos y que no se vean afectados por el tamaño de las partículas dispersas cuando se emplea un procedimiento previo de extracción ácida de los elementos a determinar

El desarrollo de una instrumentación adecuada para la obtención de temperaturas elevadas en un horno de microondas doméstico, que abre nuevas posibilidades para llevar a cabo, con rapidez y una sensible reducción del consumo energético, procesos de calcinación en un horno de microondas.

Los trabajos realizados durante la presente Tesis han sido llevados a cabo bajo la subvención de:

- DGCYT Proyecto nº PB88-0351.
- _ BECA F.P.I. nº LC89-22544511.

Han dado lugar a los siguientes artículos, comunicaciones a congresos y patentes.

PARTE I:

- "Hydrolysis of Benzodiazepines in a Microwave Oven and Ultraviolet Derivative Analysis of Their Benzophenones".

A. Morales-Rubio, J.V. de Julián-Ortiz, A. Salvador y M. de la Guardia.

XXVII Colloquium Spectroscopicum Internationale, June 9-14 1991, Grieg Hall, Bergen, Norway.

- "Hydrolysis of Benzodiazepines in a Microwave Oven and Ultraviolet Derivative Analysis of Their Benzophenones".

A. Morales-Rubio, J.V. de Julián-Ortiz, A. Salvador y M. de la Guardia.

Canadian Journal of Chemistry (pendiente aceptación).

- "Determinación de aminoácidos en proteínas previa hidrólisis ácida en horno de microondas".

A. Morales-Rubio, J. Cerezo, A. Salvador y M. de la Guardia.

V Jornadas de Análisis Instrumental JAI, XII Reunión Nacional de Espectroscopía, XIX Reunión Anual del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines GCTA, Barcelona 7-9 noviembre 1991.

- "Rapid Acid Hydrolysis of Albumin in a Microwave Oven".

A. Morales-Rubio, J. Cerezo, A. Salvador y M. de la Guardia.

The Analyst (pendiente aceptación).

PARTE II:

- "Determinación de Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en lodos de depuradora previa extracción ácida en horno de microondas".

A. Morales, F. Pomares, A. Salvador y M. de la Guardia.

II Reunión del Grupo de Espectroscopía Atómica de la Sociedad Española de Química Analítica, Oviedo 11 noviembre 1988.

- "Determination of Cadmium, Copper, Iron, Manganese, Lead and Zinc in Sewage Sludges With Prior Acid Digestion in a Microwave Oven and Slurry Introduction".

A. Morales, F. Pomares, A. Salvador y M. de la Guardia.

Journal of Analytical Atomic Spectrometry, (1989), 4, 329.

- "Digestión en horno de microondas de muestras de catalizadores para el análisis de Fe, Ni, Co y Mo por espectrometría de absorción atómica".

A. Morales-Rubio, A. Salvador y M. de la Guardia.

Reunión Nacional Conjunta de los Grupos de Espectroscopía Analítica (Métodos Atómicos y Moleculares), Madrid 15 febrero 1990.

- "Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Iron, Nickel, Cobalt and Molybdenum in Petroleum Industry Catalysts After Microwave Oven Digestion".

A. Morales-Rubio, A. Salvador y M. de la Guardia.

Analytica Chimica Acta, (1990), 235, 405.

PARTE III:

- "Microwave Muffle Assisted Decomposition of Vegetal Samples for Flame Atomic Spectrometric Determination of Ca, Mg, K, Fe, Mn and Zn".

A. Morales-Rubio, A. Salvador y M. de la Guardia.

XXVII Colloquium Spectroscopicum Internationale, June 9-14 1991, Grieg Hall, Bergen, Norway.

- "Microwave Muffle Assisted Decomposition of Vegetal Samples for Flame Atomic Spectrometric Determination of Ca, Mg, K, Fe, Mn and Zn".

A. Morales-Rubio, A. Salvador y M. de la Guardia.

Fresenius Z Analytische Chemie (pendiente aceptación).

- "Mufla de microondas adaptable a hornos de microondas domésticos".

A. Morales-Rubio, A. Salvador y M. de la Guardia.

Patente (en trámite).

- "Mufla de microondas adaptable a hornos de microondas domésticos".

A. Morales-Rubio, A. Salvador y M. de la Guardia.

Feria de la tecnología VINCI-90, Valencia 24-27 octubre 1990.

7.- BIBLIOGRAFIA.



Abu-Samra A., Steven Morris J. y Koirtyohann S.R., (1975a), *Anal. Chem.*, 47, 8, 1475.

Abu-Samra A., Steven Morris J. y Koirtyohann S.R., (1975b), *Trace Subs. Environ. Health.*, 9, 297.

Ali M., Bond S.P., Mbogo S.A., McWhinnie W.R. y Watts P.M., (1989), *J. Organomet. Chem.*, 371 (1), 11.

Alvarado J., Alvarez M., Cristiano A.R. y Marco L.M., (1990), *Fuel*, 69 (1), 128.

Alvarado J., León L.E., López F. y Lima C., (1988a), *J. Anal. At. Spectrom.*, 3, 135.

Alvarado J., Márquez M. y León L.E., (1988b), *Anal. Lett.*, 21 (3), 357.

Allen S., (1984), *Anal. Biochem.*, 138, 346.

Amano M. y Nakagawa K., (1987), *Polymer*, 28, 2, 263.

Andoh K., Takatani A., Tazuya Y., Motoki C., Yamaji Y., Saitoh Y., Takahashi F., Tsunajima K., Yasuoka K. y Matsuoka C., (1982), *Tokushima Bunri Daigaku Kenkyu Kiyo*, 25, 113.

Andrews J. y Atkinson G.F., (1984), *J. Chem. Educ.*, 61, 177.

Austermman R.L., Denley D.R., Hart D.W., Himerlfarb P.B., Irwin R.M., Narayama H., Szentirmay R., Tang S.C. y Yeast R.C., (1987), *Anal. Chem.*, 59, 68R.

Austin E.P. y Abson J.W., (1980), *Brit* 1 569.926.

Aysola P., Anderson P. y Langford C.H., (1987), *Anal. Chem.*, 59, 11, 1582.

Aysola P., Anderson P. y Langford C.H., (1988), *Anal. Lett.*, 21 (11), 2003.

Baghrust D.R., Cooper S.R., Greene D.L., Mingos D.M.P. y Reynolds S.M., (1990), *Polyhedron*, 9 (6), 893.

Baghrust D.R. y Mingos D.M.P., (1988), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 829.

Baghrust D.R. y Mingos D.M.P., (1990), *J. Organomet. Chem.*, 384 (3), C57.

Baghrust D.R., Mingos D.M.P. y Watson M.J., (1989), *J. Organomet. Chem.*, 368 (3), C43.

- Baliut P., Nedelykov M. y Hamori T., (1987), Epitoanyag, 39 (3), 69.
- Barnstey B.P., (1989), Met. Matter, 5 (11), 633.
- Barrett P., Davidowski Jr.L.J., Penaro K.W. y Copeland T.R., (1978), Anal. Chem., 50, 7, 1021.
- Beary E.S., (1988), Anal. Chem., 60, 742.
- Belg Entremont SA, (1981), BE 888.232.
- Ben-Alloum A., Labiad B. y Villemin D., (1989), J. Chem. Soc., Chem. Commun., &, 386.
- Benz C., (1978), Soap, Cosmet., Chem. Spec., 54 (9), 33.
- Berrow M.L. y Stein W.M., (1983), Analyst, 108, 1283, 277.
- Bettinelli M., Baroni U. y Pastorelli N., (1987), J. Anal. At. Spectrom., 2, 485.
- Bettinelli M., Baroni U. y Pastorelli N., (1988), J. Anal. At. Spectrom., 3, 1005.
- Bettinelli M., Baroni U. y Pastorelli N., (1989), Anal. Chim. Acta, 225 (1), 159.
- Bhagwat R.S., (1988), Colourage, 35, 20, 39.
- Bidlinmaier W., (1976), Wasser, Luft Betr., 20 (11), 590.
- Bluhm D.D., Markuzeurski R., Richardson C.K., Fanslow G.E., Durham K.S., y Geen T., (1986), Comunicación ERA8608 presentada en la British National Committee for Electroheat, Heating and Processing Conference, Cambridge U.K.
- Blust R., Van der Linden A. y Declair W., (1985), At. Spectrosc., 6, 6, 163.
- Blust R., Van der Linden A., Verheyen E. y Declair W., (1988), J. Anal. At. Spectrom., 3, 387.
- Bocharov V.A., Rossoshanskaya V.L., Titova N.P. y Morez N.V., (1986), Izv. Vyssh. Vchebn. Zaved. Khim. Tekhnol., 29, 1, 115.
- Boffelli E., (1988), Inquinamento, 30 (5), 96.
- Bopp F., (1849), Ann., 69, 16.
- Bose A.K., Manhas M.S., Ghosh M., Rojo V.S., Tabei K. y Urbanczyk-Lipkowska Z., (1990), Heterocycles, 30, (2), 471.

- Bostiam M.L., Fish D.L., Webb N.B. y Arey J.J., (1985), J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68, 876.
- Bouvier J.L. y Hall G.E.M., (1987), Current Res. Geo. Survey Can., 87 (1A), 485.
- Bowen H.M., (1966), Trace Elements in Biochemistry, Academic Press, London.
- Bozek V., Moundry I. y Novotny M., (1988), Drevo, 43, 1, 2.
- Braconnot H., (1820), Ann. Chim. Phys., 13, 113.
- Bram G., Loupy A., Majdoub M., Gutierrez E. y Ruiz-Hitzky E., (1990), Tetrahedron, 46 (15), 5167.
- Brandt A.C. y Berteand A.J., (1987), Stud. Conserv., 32, 1, 14.
- Brown A.B. y Keyzer H., (1987), Contrib. Geol., 16, 85.
- Brzezinska A., Balicki A. y Van Loon J.C., (1984), Water Air and Soil Pollution, 21, 323.
- Buresch O., Hönle W., Haid U. y Von Schnering H.G., (1987), Fresenius'Z. Anal. Chem., 328, 82.
- Burguera J.L., Burguera M., Rondón C.E., Rivas C., Burguera J.A. y Alarcón O.M., (1987), J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis., 1, 21.
- Burguera J.L. y Rondón C., (1987), Proceedings of the International Conference on the Heavy Metals in the Environment, New Orleans, September, vol. 2, 274-276.
- Burguera M. y Burguera J.L., (1986), Analyst, 111, 171.
- Burguera M., Burguera J.L. y Alarcón O.M., (1986), Anal. Chim. Acta., 179, 351.
- Burguera M., Burguera J.L. y Alarcón O.M., (1988), Anal. Chim. Acta., 214, 421.
- Burguera M., Burguera J.L., Garaboto A.M. y Alarcón O.M., (1987), Quím. Anal., 6Y (2), 227.
- Burguera M. y Rondón C., (1987), Proceedings of the International Conference on the Heavy Metals in the Environment, New Orleans, September, vol. 2, 31.
- Campbell H.W. y Crescuolo P.J., (1982), Environ. Technol. Lett., 3 (7), 289.

- Carbonell V., de la Guardia M., Salvador A., Burguera J.L. y Burguera M., (1990), Anal. Chim. Acta, 238, 417.
- Carni J.J., James W.D., Koirttyohann S.R. y Morris E.R., (1980), Anal. Chem., 52, 216.
- Carrión N., de Benzo Z., Eljuri E.J., Ippolitt F. y Flores A., (1987), J. Anal. At. Spectrom., 2, 813.
- Carrión N., Llanos A., de Benzo Z. y Fraile R., (1984), At. Spectrosc., 5, 142.
- Casas J.M., Rubio R. y Rauret G., (1990), Química Analítica, 9 (2), 163.
- Cereda M.P., (1984), Cienc. Tecnol. Aliment., 4 (2), 139.
- Clark D.E., Iftikhar A. y Chandler G.T., (1989), Eur Pat. Appl. EP 336.306.
- Cliff M.J., (1986), Symp. Pap.-Inst. Chem. Eng., North West. Branch, Paper 4, 12 pp.
- Collier G.L. y Singlenton P., (1956), J. Appl. Chem., 6, 495.
- Collins M.J., (1985), U.S. Patent 4.554.132.
- Collins M.J. Cruse B.W. y Goetchins R.J., (1975), U.S. Patent 3.909.598.
- Collins M.J. Cruse B.W. y Goetchins R.J., (1984), U.S. Patent 4.457.632.
- Collins M.J. y Gilman L.B., (1988), Powder Bulk Eng., 2 (2), 44.
- Collins M.J. y Hargett W.P., (1986), U.S. Patent 4.565.669,
- Cooley T.N., Martin D.F. y Quincel R.H., (1977), J. Environ. Sci. Health, A12, 15.
- Cross S.B. y Parkinson E.C., (1974), At. Abs. Newslett., 13, 107.
- Chabinsky I.J. y Eves E.E., (1985), Ceram. Eng. Sci. Proc., 6 (11-12), 1412.
- Chang T.Y., Hsieh F.J. y Lee Ch., (1990), MRL BU11. Res. Dev., 4 (2), 45.
- Chen S.T., Chiou S.H., Chu Y.H. y Wang K.T., (1987), Int. J. Pept. Protein Res., 30 (4), 572.

- Chen S.T., Chiou S.H., y Wang K.T., (1990), J. Chem. Soc., Chem. Commun., 11, 807.
- Chen S.T., Wu S.H. y Wang K.T., (1989), Int. J. Pept. Protein Res., 33 (1), 73.
- Chiou S.H., (1989), J. Chin. Chem. Soc., 36 (5), 435.
- Chiou S.H. y Wang K.T., (1989), J. Chromatogr., 491, 424.
- Christensen T.H., Pedersen L.R. y Tjell J.C., (1982), Int. J. Environ. Anal. Chem., 12, 1, 41.
- Dahlquist R.I. y Knoll J.W., (1978), Appl. Spectrosc., 32, 1.
- Dall'Aglio G., Gherardi S. y Versitano A., (1976), Ind. Conserve, 51 (4), 282.
- Das S. y Curlee T.R., (1987), Ceramic Bulletin, 66, 1093.
- Datta A.K., (1990), Chem. Eng. Prog., 86 (6), 47.
- Davidson R.A., Harbuck D.D. y Hammargren D.D., (1990), At. Spectrosc., 11 (1), 7.
- Dawson C.S., Marin E.J. y Walls D.D., (1990), Eur. Pat. Appl. EP 360.447.
- de Benzo Z.A., Velosa M., Ceccarelli C., de la Guardia M. y Salvador A., Fresenius Z. Anal. Chem., (in press).
- de Boer J.L.M. y Maessen F.J.M.J., (1983), Spectrochim. Acta., 38B, 739.
- de la Guardia M., Salvador A., Bayarri P. y Farre R., (1986), Analyst, 111, 1375.
- de la Guardia M., Salvador A., Burguera J.L. y Burguera M., (1988), J. Flow Inject. Anal., 5, 121.
- de la Guardia M., Carbonell V., Morales-Rubio A. y Salvador A., (1989a), Fresenius Z. Anal. Chem., 335, 975.
- de la Guardia M., Galdú M.V., Monzó J. y Salvador A., (1989b), Analyst, 114, 509.
- de la Guardia M., Salvador A., Gomez M.J. y de Benzo Z., (1989c), Anal. Chim. Acta, 224, 123.
- de Menzzi G. y Rogate R., (1981), Ind. Aliment., 20 (4), 282.

- de Silva J.A., Schwartz, Stefanovik, Kapla y D'Arconte, (1964), Anal. Chem., 36, 2099.
- Debies T.P., Kibbi C.L., Lester E. y Pedersen L.A., (1981), Anal. Chem., 153, 99R.
- Dehne L., Boegl W. y Grossklaus L., (1983), Fleischwirtschaft, 63 (2), 231.
- DeMenna G.J. y Edison W.J., (1987), ASTM Spec. Tech. Publ., 944 (Chem. Anal. Met), 45.
- Demura R., Tsukada S. y Yamamoto I., (1985), Eisei Kagaku 31, 6, 405.
- Denton J.E., Potter G.D. y Santolucito J.A., (1980), Environ. Res., 23, 264.
- Dostal J., Andreas J., Klepal J. y Jares F., (1986), Czech. CS 231.852.
- Dowden D.A., (1978), "The Reaction of Hydrocarbons on Multimetallic Catalysts", in Catalysis, A Specialist Periodical Report. Bond G.C. and Webb G. (Eds). The Royal Soc. of Chem., London, Vol2, Chap. 1, p 1.
- Du Y., (1989), "Preliminary Evaluation of a Microwave-Assisted Acid Hydrolysis Technique for Peptides on Thin Layer Plates", Poster presentado en 28th Eastern Analytical Symposium, New York, USA.
- Dugan B.B. y Welgemoed J.C., (1977), Ger. Offen. 2 646.953.
- Duhau L., Lafargue P., Levillain P., Galliot M. y Bourdon R., (1989), Analisis, 17 (10), 553.
- Dymond E.G., (1923), Proc. Camb. Phil. Soc., 22, 405.
- Ebdon L. y Wilkinson R., (1987), J. Anal. At. Spectrom., 2, 39.
- Elsmore R. y Hill E.C., (1985), Tribol. Int., 18 (6), 326.
- Erdey L., Paulik F. y Paulik J., (1956), Acta Chim. Hung., 10, 61.
- Ertsgaard E.P., (1977), Res. Discl., 154, 10.
- Ewing G.W., (1966), J. Chem. Educ., 43 (9), A683.
- Fabec J.L. y Ruschak M.L., (1983), Anal. Chem., 55, 2241.
- Fabec J.L. y Ruschak M.L., (1985), At. Spectrosc., 6, 81.

- Fagioli F. y Landi S., (1983), Anal. Lett., 16, 1435.
- Fagioli F., Landi S., Lacatelli C. y Bighi C., (1983), Anal. Lett., 16, 275.
- Fang C.S., Lai P.M.C., Chang B.K.L. y Klaila W.J., (1989), Environ. Prog., 8 (4), 235.
- Fell A.F., (1980), UV Spectrom. Group Bull., 8, 5.
- Fell A.F., Jarvie D.R. y Stewart M.J., (1981), Clin. Chem., 27, 286.
- Fernando L.A., Heavner W.D. y Gabrielli C.C., (1986), Anal. Chem., 58, 511.
- Finch C.R., Pennington H.D., Lyons C.G. y Littau S.E., (1990), Commun. Soil Sci. Plant. Anal., 21 (7-8), 583.
- Fischer L.B., (1986), Anal. Chem., 58, 1, 261.
- Friel J.K., Skinner C.S., Jackson S.E. y Longerich H.P., (1990), Analyst, 115 (3), 269.
- Fujii T., (1986), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 61 60.840.
- Fukushima H., Yamanaka T. y Matsui M., (1990), J. Mater Res., 5 (2), 397.
- Garbagnati G., (1985), ICP, 13 (8), 89.
- Garcia-Sanchez F., Hernandez-Lopez M. y Marquez-Gomez J.C., (1987), Talanta, 34, 639.
- Gedye R., Smith F., Westaway K., Ali H., Baldisera L., Laberga L. y Roussell J., (1986), Tetrahedron Lett., 27, 279.
- Geyde R.N., Smith F.E. y Westaway K.C., (1988), Can. J. Chem., 66, 17.
- Genthner H., Best A. y Lins W., (1988), Proc. Symp. Waste Manage, 88 (1), 313.
- Giesey A.T. y French C.S., (1955), Appl. Spectroscopy, 9, 78.
- Giguere R.J., Bray T.L., Duncan S.M. y Majetich G., (1986), Tetrahedron Lett., 27, 494.
- Giguere R.J., Namen A.M., Lopez B.O., Arepally A., Ramos D.E., Majetich G. y Defauw J., (1987), Tetrahedron Lett., 28 (52), 6553.



- Gilbert P.T. Jr., (1962), Anal. Chem., 34, 1025.
- Gilman L.B. y Woodward C., (1989), "An Evaluation of Microwave Heating for the Vapor Phase Hydrolysis of Proteins". Poster presentado en Third Symposium, The Protein Society, Seattle, WA, USA.
- Gombert D., Priebe S.J. y Berreth J.R., (1982), IEEE Trans. Ind. Appl., IA-18 (6), 755.
- Govindaraju K., (1975), Analisis, 3, 164.
- Govindaraju K., Mevelle G. y Chovard C., (1971), Chem. Geol., 8, 131.
- Gorsuch T.T., (1970) in "The destruction of organic matter", Pergamon Press, Oxford.
- Grabner E., Hegi H.R. y Guggenbuhl, (1980), ISWA-Journal., 30, 1, 15.
- Grillo A.C., (1989), Spectroscopy, 4 (7), 16.
- Haas P.A., (1979), Am. Ceram. Soc. Bull., 58 (9), 873.
- Hachiya I., (1989), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 01 247.039.
- Hammond V.J. y Price W.C., (1953), J. Opt. Soc. Amer., 43, 924.
- Harada K., Shimoyama A. y Mizumoto H., (1986), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 61 218.634.
- Hesek J.A. y Wilson R.C., (1974), Anal. Chem., 46, 8.
- Hill A.D., Patterson K.J., Veillon C. y Morris E.R., (1986), Anal. Chem., 58, 11, 2340.
- Hill N.E. y col., (1969) in "Dielectric Properties and Molecular Behavior", Van Nostrand, Reinhold, Boston.
- Hiraide K., Matsubara Y., Okazaki T. y Ukai M., (1987), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 62 03.757.
- Holland K.M., (1988), PCT Int. Appl. WO 88 08.871.
- Huang J., Goltz D. y Smith F., (1988), Talanta, 35 (11), 907.
- Hudgins R.L. y Wolf N.O., (1989), U.S. US 4 810.375.
- Hult O., (1981), Ind. Aliment., 20 (4), 280.

- Hwang D.R., Moerlein S.M. y Welch M.J., (1987), J. Chem. Soc., Chem. Commun., 23, 1799.
- Ilttil A. y Maestro P., (1987), Fr Demande FR 2.629.464.
- Imbert J.L., (1990), Analisis, 18 (10), 115.
- Ishii Y., (1984), Mukogawa Joshi Daigaku Kiyo, Shokumotsuhen, 32, 1.
- Jacobs I.S., Zavitsanos P.D. y Golden J.A., (1982), J. Appl. Phys., 53 (3-2), 2730.
- Jacobs M.L., (1984), Proc. Conf.-Int. Coal Test. Conf., 4th, 29.
- Jahngen E.G.E., Lentz R.R., Pesheck P.S. y Sackett P.H., (1991), J. Org. Chem., 55 (10), 3406.
- Janghorbani M., Ting B.T.G., Istfan N.W. y Young V.R., (1981), Am. J. Clin. Nutr., 34, 581.
- Jennis S.W., Katz S.A. y Mount T., (1980), Am. Lab., 12, 8, 18.
- Kallmann S. y Blumberg B., (1980), Talanta, 27, 827.
- Kalra Y.P., Maynard D.G. y Radford F.G., (1989), Can. J. For. Res., 19 (8), 981.
- Kammin W.R. y Brandt M.J., (1989), Spectroscopy, 4 (3), 49.
- Katz S.A., Jennis S.W., Mount T, Tout R.D. y Chatt A., (1981), Int. J. Environ. Anal. Chem., 9, 3, 209.
- Kemp A.J. y Brown C.J., (1990), Analyst, 115 (9), 1197.
- Kempton S., (1982), Talanta, 29, 675.
- Kingston H.M. y Jassie L.B., (1986), Anal. Chem., 58, 2534.
- Kingston H.M. y Jassie L.B., (1988), "Monitoring and Predicting Parameters in Microwave Dissolution" en "Introduction to Microwave Sample Preparation. Theory and Practice", American Chemical Society, Washington DC.
- Kirkbride C.G., (1981), US 4 279.722.
- Kobayashi H., Hiraishi N. y Bandai H., (1990), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 02 174.657.
- Koh T.S., (1980), Anal. Chem., 52, 1978.

- Kojima I., Uchida C., Lida C. y Kanaoka S., (1987), Anal. Sci., 3, 235.
- Kojima I., Uchida C. y Lida C., (1988), Anal. Sci., 4, 211.
- Komatsu F., (1985), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 60 150.829.
- Komatsu Ltd. (1983), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 58.165.038.
- Komatsu F., Masaki T., Ashida Y., Seki Y. y Kusumoto S., (1987), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 62 42.734.
- Konczak J., (1974), Ger. Offen. 2 327.956.
- Korschgen B.M., Baldwin R.E. y Snider S., (1976), J. Am. Diet. Assoc., 69 (6), 635.
- Krasowsky J.A. y Copeland T.R., (1979), Anal. Chem., 51, 1843.
- Kratochvil B. y Mamba S., (1990), Can. J. Chem., 68 (2), 360.
- Kreuter J., (1977), U.S. Patent 4 013.552.
- Kubrakova I.V., Avuzveida M., Kudinova T.F., Shemarykinna T.P. y Kuz'min N.M., (1989), Zh. Anal. Khim., 44 (10), 1793.
- Kumar A., (1982), Int. J. Electron, 52,5, 491.
- Kusakabe K., Morooka S. y Aso S., (1988), Fuel Process. Technol., 19, 3, 235.
- Kuz'min N.M., Dement'ev A.V., Kubrakova I.V. y Myasoedova G.V., (1990), Zh. Anal. Khim., 45 (1), 46.
- Lacourt A., Teinturier C. y Isabelle D.B., (1971), Methodes Phys. Anal., 7, 49.
- Lachica M., (1990), Analisis, 18, 331.
- Lafargue P., Meunier J. y Lemontey Y., (1971), J. Chromatogr., 62, 423.
- Lamothe P.J., Fries T.L. y Consul J.J., (1986), Anal. Chem., 58, 8, 1881.
- Langmyhr F.J., (1979), Analyst, 104, 993.
- Langmyhr F.J. y Wibetoe G., (1985), Prog. Analyt. Atom. Spectrom., 8, 193.
- Le Rossignol B., (1987), Rev. Gen. Caoutch. Plast., 674, 93.

- Ledoux M.J., (1985), "Hydrodenitrogenation" in Catalysis A Specialist Periodical Report. Bond G.C. and Webb G. (Eds), The Royal Soc. of Chem, Londonm Vol. 7, Chap. 5, p 125.
- Levillain P. y Pompeydie D., (1986), Analisis, 14 (1), 1.
- Lie K.J., Marcel S.F. y Yan-kit C., (1988), Lipids, 23 (4), 367.
- Linders J.T.M., Kokje J.P., Overhang M., Lie T.S. y Maat L., (1988), Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 107 (6), 449.
- Liu T.Y. y Chang Y.H. (1971), J. Biol. Chem., 246, 2842.
- Macpherson H.T. (1946), Biochem. J., 40, 470.
- Magara K., Azuma J. y Koshijima T., (1989), Wood Res., 76, 1.
- Mahan K.I., Foderaro T.A., Garza T.L., Martinez R.M., Maroney G.A., Trivisonno M.R. y Willging E.M., (1987), Anal. Chem., 59, 938.
- Mannenber M. y Lahm H.W., (1989), "Advances in Amino Acids Analysis". Poster presentado en Third Symposium, The Protein Society, Seattle, WA, USA.
- Maravalhas N., (1970), J. Chromatog., 50, 413-418.
- Marchandise, P.; Olie, J. L. y Legret, M. (1982), Environ. Technol. Lett. 3, 4, 157.
- Mariaud M., Dubois P. y Levillain P., (1988), Analyst, 13, 929.
- Martinez-Avila R., Carbonell V., de la Guardia M. y Salvador A., (1990), J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73, 389.
- Martinez D. y Gimenez M.P., (1981), J. Anal. Toxicol., 5, 10.
- Matsumara S., Karai I., Takise S., Kiyota I., Shinagawa K. y Origuchu S., (1982), Osaka City Med. J., 28, 145.
- Matsumaru K., Oshima H. y Hirayama M., (1982), Fr. Demande FR 2 504.112.
- Matsumoto K., (1985), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 60 140.194.
- Matsumoto T., Hayashi M., Kitagishi N., Sumita A. y Otaki N., (1987), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 62 132.731.
- Matsushita Electric Works Ltd., (1984a), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 59 96.906.

Matsushita Electric Works Ltd., (1984b), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 59 190.809.

Matthes S.A., Farrell R.F. y Mackie A.J., (1983), J. Tech. Prog. Rep. U.S., Bur Mines N° 120.

Matthes S.A., (1988), in Kingston y Jassie (Ed.), "Introduction to Microwave Sample Preparation. Theory and Practice", American Chemical Society, Washington DC, Chap. 2, p. 33.

Matusiewicz H. y Sturgeon R., (1989), Prog. Analyt. Spectrosc., 12, 21.

Matusiewicz H., Sturgeon R. y Berman S.S., (1989), J. Anal. At. Spectrom., 4 (4), 323.

McCallister D.L., (1986), Soil Sci. Soc. Am. J., 50 (3), 807.

Melton J.R. y Hoover W.L., (1981), J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64 (6), 1319.

Millward C.G. y Kluckner P.D., (1989), J. Anal. At. Spectrom., 4 (8), 709.

Minoda M. y Ogawa M., (1977), Ger. Offen. 2.633.316.

Mitchell P.C.M., (1981), "Sulphide Catalysts: Characterization and Reaction. Including Hydrodesulfuration" in Catalysis A Specialist Periodical Report. Bond G.C. and Webb G. (Eds), The Royal Soc. of Chem, London Vol. 4, Chap. 7, p 175.

Mohamed N. y Fry R.C., (1981), Anal. Chem., 53, 450.

Mondino A. y Bongiovanni G. (1970), J. Chromatog., 52,405-413.

Moore S. y Stein W.H., (1963), Methods Enzymol., 6, 819.

Morelli B., (1988), Analyst, 113, 1077.

Morrey J.R., (1968), Anal. Chem., 40, 905.

Morris J.S., Anderson H. y Cordts M., (1980), Trans. Am. Nucl. Soc., 34, 174.

Morrison J.D., (1953), J. Chem. Phys., 21, 1767.

Nadkarni R.A., (1984), Anal. Chem., 56, 2233.

Nakashima S., Sturgeon R.E., Willie S.N. y Berman S.S., (1988), Analyst, 113, 159.

- Neas E.D. y Collins M.J., (1988), "Microwave Heating: Theoretical Concepts and Equipment Desing", in Kingston and Jassie (Ed.). "Introduction to microwave sample preparation", Part a, ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, Washington DC, p.7.
- Nemeth P. y Smith F., (1990), TIZ Int., 114 (718), 501.
- Nichols J.A. y Woodriff R., (1980), J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 500.
- Nieuwenhuize J. y Poley-Vos C.H., (1989), At. Spectrosc., 10 (5), 148.
- Nikdel S. y Temelli C.M., (1987), Microchem. J., 36, 240.
- Nikic D.B., Stevovic Lj.S. y Petrovic Dj. N., (1989), Hrana Isharana, 30 (1), 5.
- Noeltner T., Maisenbacher P. y Puchelt H., (1990), 5 (4), 49.
- Norman P. y Ebdon L., (1987), J. Anal. At. Spectrom., 2, 469.
- Oda S.J., Woods B.G. y Foster J., (1987), Can. Ceram. Q., 56 (4), 70.
- Oelshlegel F.J., Schroeder J.R. y Stahmann M.A. (1970), Anal. Biochem., 34, 331-337.
- Ostwald W., (1894), Z. Physik. Chem., 15, 705.
- Overend J., (1967), Appl. Opt., 6, 457.
- Palaith D. y Silberglitt R., (1989), Ceramic Bulletin, 68, 1601.
- Papp C.S.E. y Fischer L.B., (1987), Analyst, 112, 337.
- Park S.S. y Meek T.T., (1990), Ceram. Eng. Sci. Proc., 11 (9-11), 1395.
- Pearce R. y Patterson W.R. (Eds.), (1981), "Catalysis and Chemical Processes", Wiley NY.
- Pedersen L.A., (1983), Anal. Chem., 55, 263R.
- Pecavar A., Prosek M., Fercej-Temeljotov D. y Marsel J., (1990), Chromatographia, 30 (3-4), 159.
- Peronne S.P. y Mueller T.P., (1965), Anal. Chem., 37, 2.

- Piccione G., Biasiol R., De Luca G. y Fortina R., (1989), Lab.2000, 3 (6-7), 32.
- Pougnat M.A.B. y Wandt M.A.E., (1986), ChemSA, 12, 16.
- Pratt K.W., Kingston H.M., MacCrehan W.A. y Koch W.F., (1988), Anal. Chem., 60 (19), 2024.
- Puscher H., (1986), "Heating with Microwave", Springler Verlag, New York.
- Que-Hee S.S. y Boyle J.R., (1988), Anal. Chem., 60, 1033.
- Quemeneur L., Choisset J., Raveau B., Thiebaut J.M. y Roussy G., (1983), J. Am. Ceram. Soc., 66, 12, 855.
- Quemeneur L., Desgardin G., y Reveau B., (1985), Silic. Ind., 50 (1-2), 7.
- Quezada R.A., Farrell O.P. y Riley K.W., (1987), ICP Inf. Newslett., 13, 38.
- Randez-Gil F., Darós A., Salvador A. y de la Guardia M., J. Pharm. Biomed. Anal., (en prensa).
- Rantala R.T.T. y Loring D.H., (1989), Anal. Chim. Acta, 220 (1), 263.
- Rees M.W., (1946), Biochem. J., 40, 632.
- Roach D. y Gehrke C.W., (1970), J. Chromatog., 52, 393.
- Rosenberg H.C., (1977), U.S. Patent 4 013.558.
- Rosopulo A. y Scholl W., (1978), Landwirtsch. Forchung., 31, 1, 74.
- Roussy G. y Chenot P., (1981), RGE Rev. Gen. Electr., 11, 816.
- Roussy G., Zoulalian A., Charreyre M. y Thiebaut J.M., (1983), J. Chim. Phys. Phys.-Chim.. Biol., 80 (10), 719.
- Roussy G., Zoulalian A., Charreyre M. y Thiebaut J.M., (1984), J. Phys. Chem., 88 (23), 5702.
- Routschka G. y Bauling A., (1990), Keram. Z., 42 (1), 7.
- Roy R., Komarneni S. y Yang L.J., (1985), J. Am. Ceram. Soc., 68 (7), 392.
- Rush W.F. y Onischak M., (1983), Fuel, 62, 4, 459.

- Sakata T., (1986), Shizuoka-ken Kogyo Gijutsu Senta Kenkyu Hokoku, 31, 27.
- Sakukai H., Fujita O. y Sigiyama O., (1987), Mozukai Kogyo, 42, 481, 162.
- Salvador A., de Benzo Z.A. y de la Guardia M., (1990), Microchem. J., 42, 187.
- Salvador A., de la Guardia M. y Mauri A., (1988), At. Spectrosc., 9, 6, 195.
- Sanchez-Rojas F., Bosch-Ojeda C. y Cano-Pavón J.M., (1988), Talanta, 35, 753.
- Savoy C.F., Heinis J.L. y Seals R.G., (1975), Anal. Biochem., 68, 562-571.
- Schelkoph G.W. y Jefferson R.H., (1986), J. Microwave Power, 21, 25.
- Schelkoph G.W. y Milne D.B., (1988), Anal. Chem., 60 (19), 2060.
- Schnitzer G., Pain M., Tescu C. y Chafey C., (1990), 18 (10), 120.
- Schnitzer G., Pellerin C. y Clouet C., (1988), Lab. Pract., 37 (1), 63.
- Schnitzer G., Pellerin C. y Clouet C., (1989), Analisis, 15 (4), IL.
- Schutz H., (1982), "Benzodiazepines", Sprigler, New York.
- Senise J.T., (1989), Ceramica (Sao Paulo), 35 (234), 95.
- Sheppard L.M., (1988), Ceramic Bulletin, 67, 1656.
- Shimamura T., (1985), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 60 231.664.
- Sinfett J.H., (1981), "Catalytic Reforming of Hydrocarbons in Catalysis Science and Technology", Anderson J.R. and Bondart M. (Eds), Springer Verlag, Berlin, Vol 1, p 257.
- Skelly E.M. y DiSteffano F.T., (1988), Appl. Spectrosc., 42, 1302.
- Smith F., Cousins B., Bozic J. y Flora W., (1985), Anal. Chim. Acta, 177, 243.
- Smith M.W. y Gaines T.P., (1980), 15 (5), 614.

- Smith R., (1983), Water S.A., 9, 1, 31.
- Smith R.D., (1984), Elec. Power Res. Inst., EM3645, 2.
- Solchaga M., Montoro R. y de la Guardia M., (1986), J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 5, 874.
- Sommers L.E., (1977), J. Environ. Qual., 6, 225.
- Spencer P.L., (1952), U.S. Patent 2.605.383.
- Spies J.R., (1967), Anal. Chem., 39 (12), 1412-1416.
- Spies J.R. y Chambers D.C., (1949), Anal. Chem., 21 (10), 1249-1266.
- Stephenson M.G. y Gaines T.P., (1975), Tobacco, 19, 51.
- Straathot A.J.J., Van Bekkum H. y Kieboom A.P.G., (1988), Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 107 (11), 647.
- Stripp R.A. y Bogen D.C., (1989), J. Anal. Toxicol., 13 (1), 57.
- Stupar J. y Ajlec R., (1982), Analyst, 107, 144.
- Sugimoto T., Hirose T., Kanazawa S. y Sakuma S., (1975), Japan Kokai 75 31.192.
- Sun W.Ch., Guy P.M., Jahngen J.H., Rossomando E.F., Jahngen E.G.E., (1988), J. Org. Chem., 53 (18), 4414.
- Sutton W.H., (1989), Ceram. Bull., 68 (2), 376.
- Suzuki A., Shiotani Y. y Kadoya M., (1985), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 60 155.583.
- Tadros S.H. y Frazier D.O., (1990), Analyst, 115 (2), 229.
- Takano S., Kijima A., Sugihara T., Sato S. y Ogasawara K., (1989), Chem. Lett., 1, 87.
- Takusagawa A. y Masaki T., (1983), R&D, Res. Dev., 33 (1), 35.
- Tedesko P., (1988), Rubber World, 198 (6), 27.
- Terrel R.L. y Al-Ohaly A., (1987), Asphalt Paving Technol., 56, 454.
- Tinga W.R., (1988), Mater. Res. Soc. Symp. Proc., 124, 33.

- Tsugita A. y Scheffler J.J., (1982), Eur. J. Biochem., 124 (3), 585-588.
- Tsukada S., Demura R. y Yamamoto I., (1985), Eisei Kagaku, 31, 1, 37.
- Uchida H., Nojiri Y., Haraguchi H. y Fuwa K., (1981), Anal. Chim. Acta, 123, 57.
- Uchida T., Mitsumatsu M., Kojima I. y Lida C., (1986), Bunseki Kagaku, 35, 42.
- Urbain H. y Martin N., (1981), At. Spectrosc., 2 (4), 127.
- Van Delft W. y Vos G., (1988), Anal. Chim. Acta, 209, 147.
- Van Loon J.C., (1980), Anal. Chem., 52, 955A.
- Van Loon J.C., (1985) in "Selected methods of trace metal analysis: biological and environmental samples", J. Wiley & Sons, N.Y.
- Van Zante H.J., (1973), "The microwave oven", Houghton mifflin Boston.
- Vanwyck D.B., Shifman R.B., Stivelman J.C., Ruiz J. y Martin D., (1988), Clin. Chem., 34, 1128.
- Vasilakos N.P. y Magalhaes F., (1984), J. Microwave Power, 19, 2, 135.
- Venghiattis A.A., (1967), Spectrochim. Acta, 23B, 67.
- Vermeir G., Vandecasteele C. y Dams R., (1989), Anal. Chim. Acta, 220 (1), 257.
- Villemain D. y Ben-Alloum A., (1990), Synth. Commun., 20 (7), 925.
- Villemain D., Labiad B. y Ouhilal Y., (1989), Chem. Ind. (London), 18, 607.
- Vozzella P.A. y Condit D.A., (1988), Anal. Chem., 60 (22), 2497.
- Walkins K.W., (1983), J. Chem. Educ., 60, 12, 1043.
- Walsh G.E., Ainsworth K.A. y Rigby R., (1979), Biotropica, 11, 22.
- Wan I.K.S. y Kriz J.F., (1985), Can. CA 1.193.574.

- Wan I.K.S., Wolf K. y Heyding R.D., (1984), Stud. Surf. Sci. Catal., 19, 561.
- Wandt M.A.E. y Pougnet M.A.B., (1986), Analyst, 111, 1249.
- Wang D., Zou M., Xie S., Liu L., Zhang H., Wang W. y Jin Q., (1990), Fenxi Huaxue., 18 (5), 482.
- Wang L.K., Barris D., Milne P. y Mulloy M., (1982), Report, LIR/01-82/6; Order No. PB86-124644, 16 pp.
- Wangy Y., Nakagawa J. y Masaki T., (1983), Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 58 08.579.
- Ward A.F., Marchelo F., Carrara J. y Luciano V.J., (1980), Spectrosc. Lett., 13, 803.
- Ward J.W. y Qader S.A., (1975), Hydrocracking and Hydrotreating ACS Symp. Ser., 20.
- Watkins K.W., (1983), J. Chem. Educ., 60, 12, 1043.
- Weber M. y Praxmarer W., (1983), Ger (East) DD 203.398.
- Werink J., Hesse G. y Rueffer H., (1981), Von Wasser, 57, 75.
- Westbrook W.T. y Jefferson R.H., (1986), J. Microwave Power, 21, 25.
- White Jr.R.T. y Douthit G.E., (1985), J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68, 4, 766.
- Wilson J. y Kunz S.M., (1988), J. Am. Ceram. Soc., 71, C40.
- Willians J.G., Gray J.L. Norman P. y Ebdon J.L., (1987), J. Anal. At. Spectrom., 2, 469.
- Willis J.B., (1975), Anal. Chem., 47, 1752.
- Wolf N.O., (1983), Brit. UK Pat. Appl. GB 2 117.370.
- Woodward C., Gilman L.B., Engejhart W.G., (1990), International Laboratory, septiembre, 40.
- Worner H.K. y Standish N., (1989), Analyst, 114 (1), 115.
- Xu L. y Shen W., (1988), Fresenius-Z. Anal. Chem., 332, 45.
- Xu L. y Shen W., (1989), Fresenius-Z. Anal. Chem., 333 (2), 108.
- Xu L., Shen W. y Zhu J., (1989), J. Environ. Sci., 1 (2), 69.

- Xu L., Shen W. y Zhu J., (1990), Fenxi Huaxue, 18 (7), 597.
- Xu L., Zhu J. y Zhang L., (1987), Fenxi Huaxue, 15 (11), 1053.
- Xu L., Zhu J., Zhang L. y Qiu Ch., (1988), Lihua Jianyan, Huaxue, Fence, 24 (5), 278, 306.
- Yamaguchi S., Kono M. y Konishi K., (1977), J. Am. Oil Chem. Soc., 54 (11), 539.
- Yanagawa H., Kojima K., Ito M. y Honda N., (1990), J. Mol. Evol., 31 (3), 430.
- Yang J. y Wu Y., (1987), Fuel, 66, 12, 1745.
- Yu H.M., Chen S.T., Chiou S.H. y Wang K.T., (1988), J. Chromatogr., 456 (2), 357.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. ANGEL ENRIQUE MORALES RUBIO

la calificación de ARTO - CUM LAUDE

Valencia, a 25 de JUNIO de 1991

El Secretario,

El Presidente

Vicente Bnc



