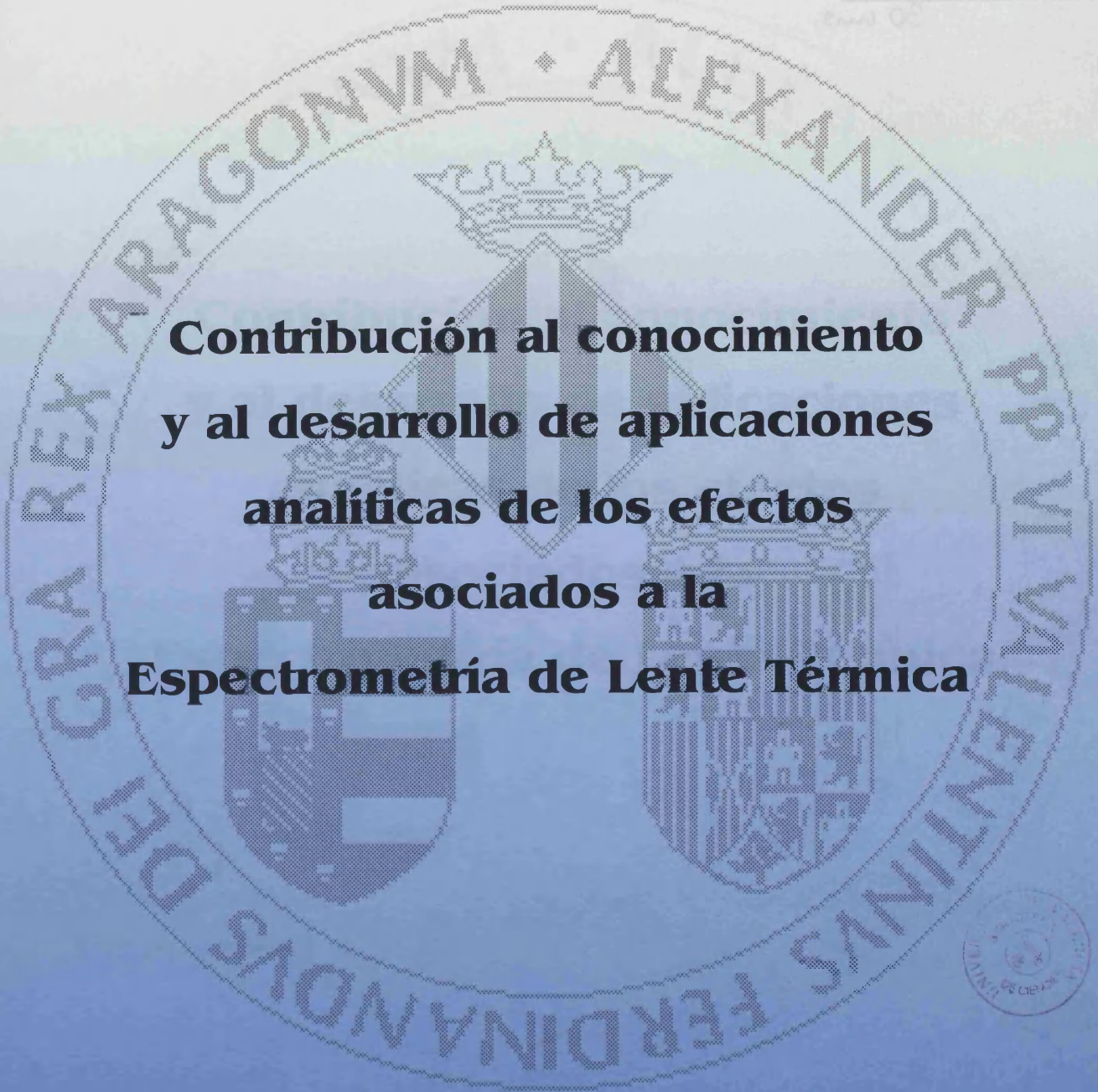


Universitat de València
Facultad de Química
Departamento de Química Analítica

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES
PCSP
JP 8 5
108.7.304
1996



**Contribución al conocimiento
y al desarrollo de aplicaciones
analíticas de los efectos
asociados a la
Espectrometría de Lente Térmica**

MEMORIA que para alcanzar el
Grado de Doctor en Ciencias
Químicas presenta la Licenciada

Yolanda Martín Biosca

Burjassot, mayo de 1996

Nº 471 del Registro de Facultad

UMI Number: U607183

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 U607183

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

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Químicas

Nº Registre 9239
DATA, 7.8.96

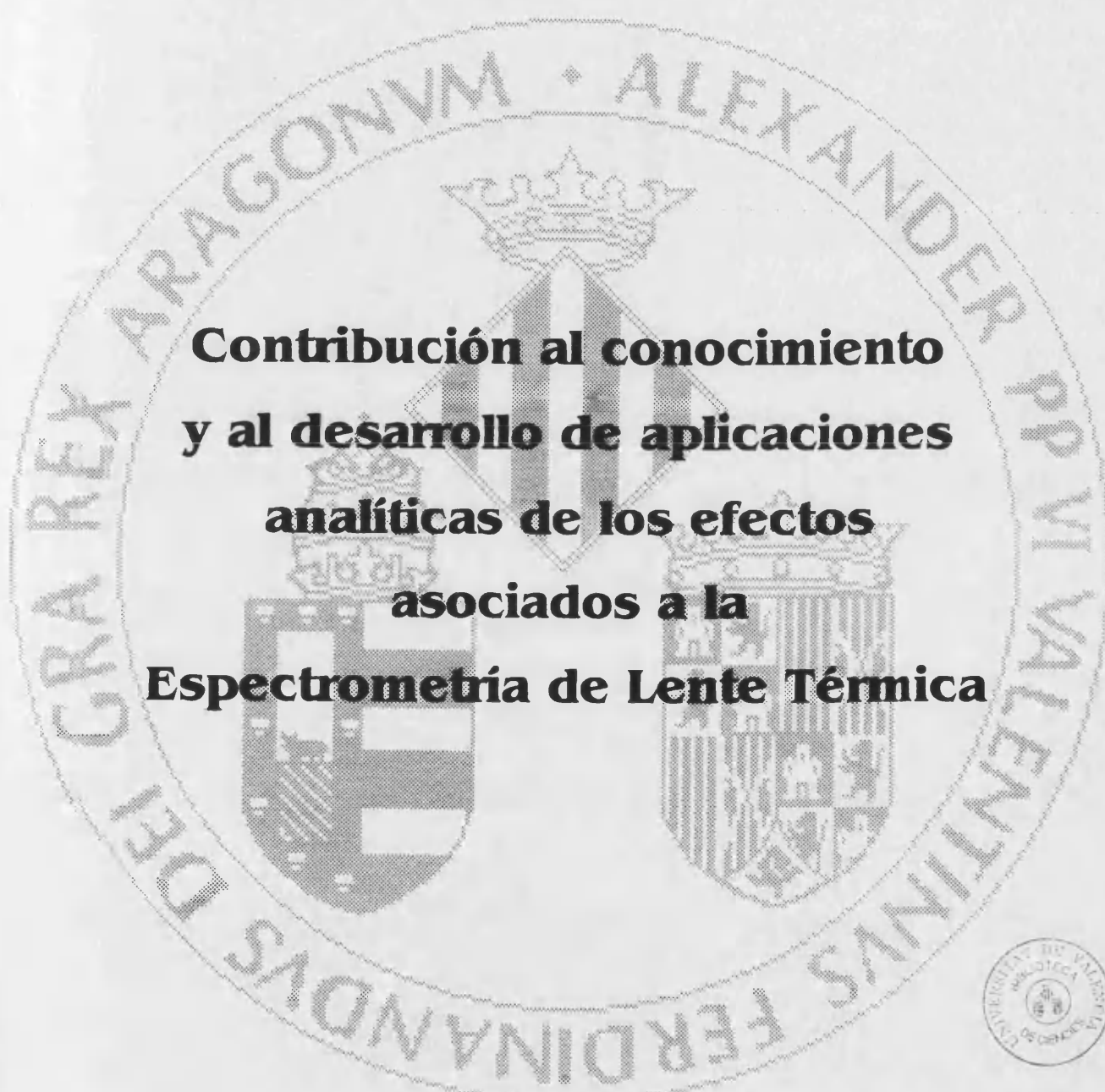
SIGNATURA

408.T.D


Nº LIBIS: Zi. 1865032E.

30 ans.

Universitat de València
Facultad de Química
Departamento de Química Analítica



**Contribución al conocimiento
y al desarrollo de aplicaciones
analíticas de los efectos
asociados a la
Espectrometría de Lente Térmica**



MEMORIA que para alcanzar el
Grado de Doctor en Ciencias
Químicas presenta la Licenciada

Yolanda Martín Biosca

Burjassot, mayo de 1996



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

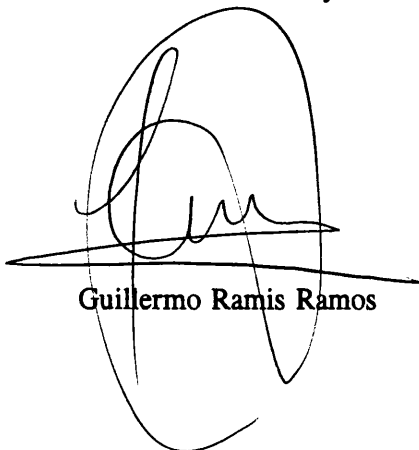
D. GUILLERMO RAMIS RAMOS y D.^a M^a CELIA GARCÍA ÁLVAREZ-COQUE,
Catedrático y Profesora Titular, respectivamente, adscritos al Departamento de Química Analítica de
la Universitat de València,

CERTIFICAN


que la presente Memoria, «*Contribución al conocimiento y al desarrollo de aplicaciones analíticas de los efectos asociados a la Espectrometría de Lente Térmica*», constituye la Tesis Doctoral de D.^a
YOLANDA MARTÍN BIOSCA.

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo como
su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia, a 15 de mayo
de mil novecientos noventa y seis.



Guillermo Ramis Ramos



M^a Celia García Álvarez-Coque

Deseo expresar mi agradecimiento a mis directores, los doctores Guillermo Ramis y M^a Celia García, por su apoyo y ayuda, tanto en la realización de la Memoria como en su redacción. Gracias a sus ideas y experiencia hemos conseguido obtener resultados muy interesantes.

También me gustaría expresar mi gratitud a la Dra. M^a José Medina por su ayuda en la realización del capítulo sobre la influencia de los disolventes en el ruido de ELT, así como por su apoyo a lo largo de todas las investigaciones que componen esta tesis.

Gracias también a los doctores Juan José Baeza, Ernesto Simó y Josep Esteve, por su aportación en algunos de los capítulos de esta Memoria.

A todos los compañeros del Departamento y del grupo de investigación, por su ayuda incondicional en todo momento, y principalmente por su amistad. El trabajo en su compañía fue más ameno y productivo.

Mi más sincera gratitud a todos los compañeros del *Laboratoire d'Energétique des Systèmes et Procédés* de Rouen, de los que siempre tendré un grato recuerdo, especialmente al Dr. Claude Rozé y su esposa. Su hospitalidad y amabilidad hicieron mi estancia en Rouen mucho más agradable.

Finalmente quiero dar las gracias a las personas que en su día, desde la *Conselleria de Cultura, Educació i Ciència* de la *Generalitat Valenciana*, decidieron concederme la beca de FPI. Sin su financiación hubiera sido muy difícil la realización de este trabajo.

*A mis padres
y hermanas*

A Emilia

ÍNDICE

I.- OBJETO Y PLAN DE TRABAJO	1
II.- LA ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA	5
II.1.- Introducción	7
II.2.- Espectroscopía de lente térmica de haces coaxiales y haces cruzados	8
II.3.- Los láseres	14
II.4.- Selectividad	16
II.5.- Los modelos parabólico y aberrante en espectroscopía de lente térmica	18
II.6.- Ruido de fondo y límites de detección	19
II.7.- Dispersión de la radiación	21
II.8.- Influencia del flujo	22
II.9.- Dicroísmo circular de lente térmica	23
II.10.- Determinación de compuestos orgánicos	24
a) Nitroanilinas	24
b) Aminoácidos	24
c) Detección fototérmica indirecta de ácidos grasos	25
d) Cetonas	26
e) Arilaminas	26
f) Catecolaminas	27
g) Nitratoreductasa	28
h) Teofilina	29
i) Formaldehído	29
j) Materia orgánica coloreada en aguas naturales	30
k) Espectroscopía de lente térmica de infrarrojo	31

II.11.- Determinación de compuestos inorgánicos	32
a) Hierro	32
b) Aluminio	33
c) Cromo y bismuto	34
d) Níquel y cobalto	35
e) Plata	36
f) Lantánidos y actínidos	36
g) Molibdeno, arsénico, fósforo y sílice	41
h) Otros iones metálicos	43
i) Sulfuro y SO ₂	45
j) Nitrito y NO ₂	46
III.- INSTRUMENTACIÓN	49
III.1.- Espectrómetros de lente térmica	51
a) Espectrómetro construido en la Universitat de València	51
b) Espectrómetros de lente térmica contruidos en el LESP	60
III.2.- Otra instrumentación utilizada	64
IV.- EFECTO DE LA NATURALEZA DEL DISOLVENTE SOBRE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN EN ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA	65
IV.1.- Introducción	67
IV.2.- Parte experimental	68
a) Instrumentación y reactivos	68
b) Procedimientos	69
IV.3.- Resultados y discusión	71
a) Relación entra la señal y el ruido en ELT	71
b) Correlación entre σ_0^* , k y la naturaleza del disolvente	76
c) Influencia de distintas variables experimentales sobre σ_0^* y k	78

d) Reproducibilidad de σ_0^* y k	79
e) Dependencia del límite de detección con la absorbancia del blanco	80
f) Influencia de los reactivos derivatizantes sobre el límite de detección	84
V.- LAS OSCILACIONES DE LALENTE TÉRMICA	87
V.1.- Introducción	89
a) Consideraciones generales sobre las oscilaciones de lente térmica	89
b) El papel de la tensión superficial	93
c) Descripción cualitativa de los distintos estados	95
c.1) La transformada de Fourier	95
c.2) Plano de los parámetros de control	99
c.3) Variación de f_0 y A_0 con la distancia d	103
V.2.- Parte experimental	105
a) Instrumentación y reactivos	105
b) Procedimientos	106
V.3.- Resultados y discusión	107
a) Estudio previo de la variación de los parámetros de interés con la concentración de especie absorbente	107
b) Variación de la frecuencia y de la amplitud del pico fundamental en función de la distancia y de la concentración, para disoluciones de PAN en aceite de silicona	108
c) Variación de la distancia con la concentración para una frecuencia fija	116
d) Estudio de la variación de la potencia total del espectro de transformada de Fourier con la concentración y la distancia	118
e) Estudio de la potencia mínima necesaria para que se produzcan las oscilaciones, para diferentes concentraciones y distancias	125
f) Conclusiones	128

VI.- MODELIZACIÓN DEL RUIDO DE BAJA FRECUENCIA EN ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA	129
VI.1.- Introducción	131
VI.2.- Fundamento teórico	131
VI.3.- Parte experimental	138
a) Instrumentación y reactivos	138
b) Procedimiento	138
VI.4.- Resultados y discusión	139
a) Relación entre las oscilaciones de la lente térmica y la viscosidad	139
b) Modelización del ruido	140
c) Variación del ruido con la frecuencia de bombeo	147
VI.5.- Conclusiones	154
VII.- UN MODELO QUE DESCRIBE LA SATURACIÓN ÓPTICA EN ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA	155
VII.1.- Introducción	157
VII.2.- Teoría	158
a) Modelo cinético para espectrometría de lente térmica	158
b) Interpretación cinética del proceso de absorción	160
c) Potencia disipada como energía térmica por unidad de volumen y unidad de tiempo	162
d) Modificación del modelo parabólico en ELT	164
e) Efectos de la aproximación a la saturación óptica en ELT	167
VII.3.- Discusión	171
VIII.- DIFUSIÓN Y CONVECCIÓN EN CONDICIONES DE SATURACIÓN ÓPTICA PARCIAL	173
VIII.1.- Introducción	175
VIII.2.- Fundamento teórico	178

a) Los efectos de la difusión y de la convección en la señal de ELT	178
b) Comentarios a la ecuación VIII.17	181
c) Evaluación experimental de B	183
VIII.3.- Parte experimental	184
a) Instrumentación y reactivos	184
b) Procedimiento	185
VIII.4.- Resultados y discusión	186
a) Los colorantes de ftaleína	186
b) Los azocolorantes	192
c) Saturación óptica en disolventes apolares	194
c.1) Reactivos	195
c.2) Preparación de los extractos metálicos	196
c.3) Procedimiento seguido para la obtención de las sensibilidades	197
c.4) Colorantes orgánicos bombeados con un láser de nitrógeno	197
c.5) Colorantes orgánicos bombeados con un láser de ion argon	201
c.6) Ditizonatos metálicos	203

IX.- CONTROL DE CALIDAD DE CLEMBUTEROL EN PREPARADOS

FARMACÉUTICOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA . . 205

IX.1.- Introducción	207
a) Reacción de diazotación y acoplamiento	207
b) Determinación de clembuterol	211
IX.2.- Parte experimental	213
a) Instrumentación y reactivos	213
b) Derivatización y procedimiento de medida	213
c) Preparación de las disoluciones de muestra y blanco	214
IX.3.- Resultados y discusión	215
a) Espectros y estabilidad del azocolorante	215
b) Determinación espectrofotométrica	216
c) Determinación mediante ELT	217

X.- DETERMINACIÓN DE CLEMBUTEROL EN ORINA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SOLIDA, DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MICELAR	221
X.1.- Introducción	223
X.2.- Parte experimental	225
a) Instrumentación y reactivos	225
b) Procedimiento de derivatización utilizado en la optimización cromatográfica	225
c) Procedimientos utilizados en la optimización de las condiciones de extracción	226
d) Procedimiento recomendado para determinar clenbuterol en orina	226
X.3.- Resultados y discusión	227
a) Espectros de absorción y optimización de las condiciones cromatográficas	227
b) Inyección directa de las muestras	230
c) Inyección de muestras extraídas	234
d) Adaptación del procedimiento a la ELT	240
e) Repetitividad y límites de detección	243
XI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES	245
XI.1.- Efecto de la naturaleza del disolvente sobre los límites de detección en Espectrometría de Lente Térmica	247
XI.2.- Las oscilaciones de la lente térmica y su relación con el ruido de fondo	248
XI.3.- Saturación óptica, difusión y convección en Espectrometría de Lente Térmica	250
XI.4.- Determinación de clenbuterol en preparados farmacéuticos y en orina	252
XII.- REFERENCIAS	255

I.- OBJETO Y PLAN DE TRABAJO



I.- OBJETO Y PLAN DE TRABAJO

Esta Memoria recoge una serie de trabajos que se enmarcan dentro de una línea de investigación dirigida al desarrollo de la Espectroscopía de Lente Térmica (ELT), línea que abarca estudios fundamentales sobre la técnica y los efectos asociados a la misma, y el desarrollo de aplicaciones en el campo de la Química Analítica. Al tratarse de una línea de investigación iniciada en el Departamento de Química Analítica de Valencia ya en 1988, esta Memoria se apoya en la experiencia adquirida en estudios anteriores y, en cierta medida, es continuación de los mismos.

En primer lugar, se ha pretendido recoger, actualizar y comentar desde una perspectiva crítica, la bibliografía disponible sobre la determinación de compuestos orgánicos e inorgánicos mediante ELT. El resultado de este estudio se ha expuesto en el capítulo II de esta Memoria.

Una de las ventajas de la ELT respecto a la espectrofotometría es la posibilidad de alcanzar límites de detección muy bajos, lo que es una consecuencia, por una parte, de una muy elevada sensibilidad, que es directamente proporcional a la potencia de bombeo y, por otra, es debido a un ruido de fondo bajo. Por ello, tiene interés investigar las causas que contribuyen al ruido de fondo, para que un mejor conocimiento de las mismas facilite la reducción de la varianza de las medidas, y con ella, la mejora de los límites de detección. En esta línea, en el capítulo IV, se presenta un estudio de la influencia de la naturaleza del disolvente sobre el ruido de fondo, y también se establece la relación entre el ruido y la señal de ELT. En nuestra opinión, la causa predominante de ruido en ELT es la convección térmica, y se intenta establecer correlaciones entre parámetros físicos del disolvente y la varianza de las medidas.

En los capítulos V y VI se continúa con el estudio del ruido de origen convectivo, pero en este caso se investiga la posible relación entre el ruido que afecta a las medidas de ELT y el fenómeno de los «latidos ópticos», que ha despertado el interés de algunos grupos de investigación en Física, dada su capacidad para generar diversos estados oscilatorios, incluyendo oscilaciones caóticas. Por otra parte, se estudia la posibilidad de explotar, desde el punto de vista de la Química Analítica, las relaciones que existen entre la concentración del cromóforo y los diversos parámetros que controlan la magnitud de las oscilaciones de la lente térmica, y que dan origen a los latidos ópticos.

En los capítulos VII y VIII se plantea el problema de las diferencias entre la sensibilidad esperada a partir de la absorptividad molar de los cromóforos, y la realmente observada en ELT. Los modelos que describen la relación señal de ELT-concentración no explican tales diferencias. Se plantea la hipótesis de que la energía absorbida queda retenida por el cromóforo en un estado excitado intermedio, sin degenerar hasta energía térmica dentro de la región de observación, por lo que no contribuye a la señal de ELT. Desde el punto de vista de la absorción, el fenómeno equivale a una saturación óptica, y en el capítulo VII se sientan las bases teóricas de la misma.

La teoría de la saturación óptica se amplía y se matiza en el capítulo VIII, al incluir en el modelo la influencia de la difusión y convección. En el mismo capítulo se presenta el esfuerzo experimental realizado para comprobar la teoría, tanto utilizando cromóforos polares en el seno de disolventes polares, como cromóforos apolares en tetracloruro de carbono y benceno.

Finalmente, en los capítulos IX y X se desarrollan dos procedimientos de determinación de clembuterol. En primer lugar, se desarrolla un procedimiento para la determinación de clembuterol en preparados farmacéuticos mediante ELT, y luego se expone un procedimiento similar para la determinación de este mismo compuesto en orina. En este último caso, debido a la complejidad de la muestra y a las interferencias, resulta obligado recurrir a técnicas de extracción en fase sólida y HPLC. En ambos procedimientos la mayor relación señal/ruido de la ELT permite resolver problemas que no pueden ser abordados con éxito mediante detección espectrofotométrica.

II.- LA ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA



II.- LA ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA

II.1.- Introducción

La espectroscopía fototérmica está basada en los efectos térmicos producidos por la absorción de un haz láser, efectos que fueron descritos por primera vez por Gordon y col. [1]. Una década más tarde, Dovichi y Harris [2-4], Carter y Harris [5-8], Ishibashi y col. [9,10], y otros autores, desarrollaron las técnicas analíticas fototérmicas, sobre las cuales han sido publicadas diversas revisiones bibliográficas [11-15]. Las técnicas espectroscópicas fototérmicas se emplean para medir con precisión absorbancias extremadamente bajas. Pueden determinarse compuestos coloreados a niveles de concentración de trazas y ultratrazas, así como algunos parámetros físico-químicos. En comparación con la espectrofotometría convencional, pueden alcanzarse límites de detección (LDs) mucho más bajos, el intervalo dinámico puede extenderse hasta tres órdenes de magnitud en la escala de absorbancia, y el volumen de muestra puede reducirse de forma importante. Por otro lado, debido a los reducidos niveles de concentración, se pueden evitar algunas reacciones laterales no deseadas, como las de precipitación o polimerización.

En espectroscopía fototérmica, al igual que en espectrofotometría convencional, se hace interaccionar un haz de radiación con la muestra, y la cantidad de energía absorbida se relaciona con la concentración de la especie absorbente. Sin embargo, en espectrofotometría se mide directamente la pérdida de intensidad del haz, mientras que en espectroscopía fototérmica, se miden los efectos térmicos producidos por la absorción de la energía. Los efectos térmicos producidos por los láseres pueden ser mucho más intensos y más fácilmente manipulables que los producidos por las fuentes convencionales de radiación, por lo que se emplean diversos tipos de láser como fuentes de radiación en espectroscopía fototérmica.

La espectroscopía fototérmica se diferencia de la espectroscopía fotoacústica, en que en esta última se miden los efectos mecánicos, en lugar de los térmicos, originados por la absorción de radiación. En espectroscopía fotoacústica se emplea un láser pulsado, la absorción y la relajación térmica de una parte de la energía de un impulso de radiación produce un frente de ondas mecánicas que es detectado mediante un micrófono. En cambio, en espectroscopía fototérmica, generalmente se

emplea un segundo haz láser, el haz de prueba, para medir el gradiente térmico generado por el primero de los haces, llamado haz de bombeo, dentro o en la proximidad de la región iluminada.

Existen diversas técnicas de espectroscopía fototérmica, que se diferencian por la forma en que se mide el gradiente térmico. En la espectroscopía de lente térmica (ELT), el gradiente térmico se comporta como una lente que desenfoca el haz de prueba, y en la espectroscopía de deflexión térmica o de refracción térmica, el haz de prueba es desviado por el gradiente térmico, que se comporta como un prisma. A continuación, nos referiremos exclusivamente a la espectroscopía de lente térmica.

La miniaturización de las técnicas de separación puede provocar mejoras en la eficacia de la separación, en el tiempo de análisis, en el consumo de disolvente y de fase estacionaria, así como en los límites de detección. Además, la resolución en una separación dada puede mejorar reduciendo el tamaño de la muestra. Todo ello aumenta el interés en el desarrollo de detectores cada vez más sensibles, capaces de funcionar con volúmenes muertos del orden del submicrolitro y constantes de tiempo pequeñas. La espectroscopía fototérmica, la fluorescencia inducida por láser, y otras técnicas láser, son fuertes candidatos para el desarrollo de detectores. En la bibliografía existen algunos ejemplos de detección mediante ELT en electroforesis capilar de zona (CZE) y en cromatografía de alta resolución (HPLC), particularmente cuando se utilizan columnas capilares.

II.2.- Espectroscopía de lente térmica de haces coaxiales y haces cruzados

La configuración de ELT más empleada es la de bomba-prueba de haces coaxiales (Figura II.1). El haz de bombeo es utilizado para generar el gradiente térmico, por lo tanto, la longitud de onda de éste debe ser la adecuada para que la radiación sea absorbida por el analito. Para generar un gradiente térmico intenso, debe emplearse un haz de bombeo de elevada potencia. Se consigue un valor máximo del gradiente térmico enfocando el haz de bombeo en la muestra. En cambio, el haz de prueba debe enfocarse a cierta distancia antes o después de la muestra.

En el foco o cintura del haz de prueba, el radio del haz, w , adquiere un valor mínimo, w_0 , y la sección es también mínima. Se define como distancia confocal, z_c , aquella a la cual la sección del haz se dobla. Por tanto, a una distancia confocal de la cintura, el cuadrado del radio del haz se ha doblado:

$$w_c^2 = 2w_0^2 \quad (\text{II.1})$$

La distancia confocal es función de la sección en la cintura y de la longitud de onda según:

$$z_c = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (\text{II.2})$$

Dependiendo del grado de enfoque y de otras condiciones experimentales, el punto de máxima sensibilidad se encuentra cuando la muestra se halla a una distancia a partir de la cintura que varía entre z_c y $\sqrt{3} z_c$. En el primer caso, se cumple el modelo parabólico, y en el segundo, la relación señal-concentración se ajusta mejor al modelo aberrante (ver más adelante).

En el esquema de la Figura II.1, el haz de prueba alcanza la muestra con cierta divergencia y el gradiente térmico origina un aumento de dicha divergencia. Finalmente, la disminución de la intensidad de la señal en el centro del haz de prueba en el campo lejano se relaciona con la concentración de la especie absorbente.

En la Figura II.2 se muestra un esquema completo de un instrumento de haces coaxiales. El disco rotatorio modula el haz de bombeo a una frecuencia dada, dando lugar, alternativamente, a la formación y disipación del gradiente, que produce a su vez la disminución y el aumento de la divergencia del haz de prueba, dentro de un ciclo de bombeo. En el detector se genera una señal alterna de la misma frecuencia, que puede describirse aproximadamente como una función sinusoidal deformada. La amplitud de la señal alterna es proporcional a la concentración de la especie absorbente.

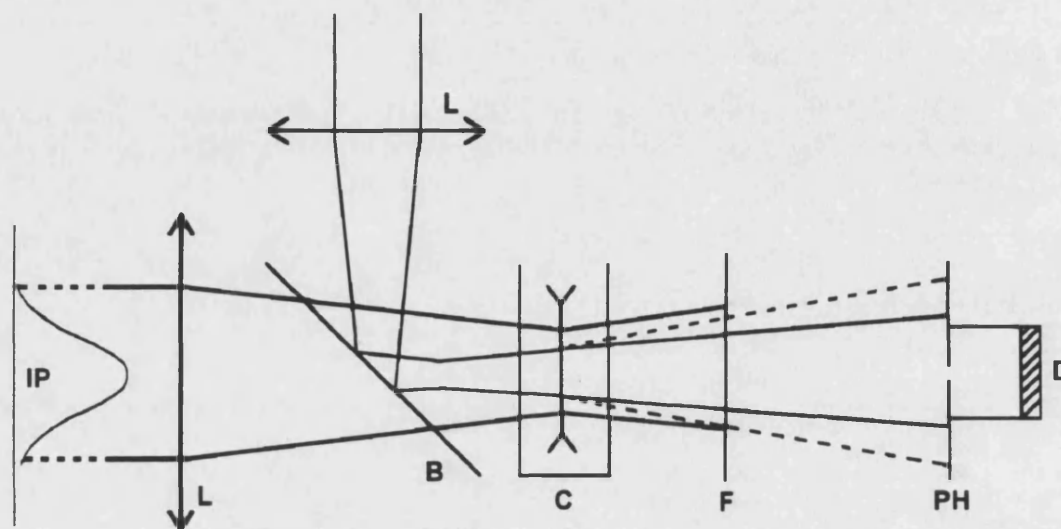


Figura II.1.- Fundamento de trabajo de un espectrómetro de lente térmica con la configuración de bomba-prueba de haces coaxiales: el gradiente térmico aumenta la divergencia del haz de prueba. IP = perfil de intensidad del haz de bombeo; L = lentes; B = divisor de haz; C = celda; F = filtro; PH = máscara de orificio o de rendija; D = detector (fotodiodo). Los diámetros de los haces han sido exagerados.

La amplitud de la señal alterna puede medirse con un amplificador sincrónico o con un ordenador. Un amplificador sincrónico mide directamente la amplitud, con la ventaja adicional de que cualquier otra señal que no está en fase con la señal alterna de referencia, proporcionada por el obturador rotatorio, es filtrada. Alternativamente, se puede utilizar un ordenador para retener todos los datos en bruto, lo que es interesante en el desarrollo de nuevas técnicas fototérmicas y en el estudio de los efectos asociados. Sin embargo, el uso de un ordenador obliga a alternar los períodos de adquisición y tratamiento de datos, lo que hace más lenta la adquisición de los mismos.

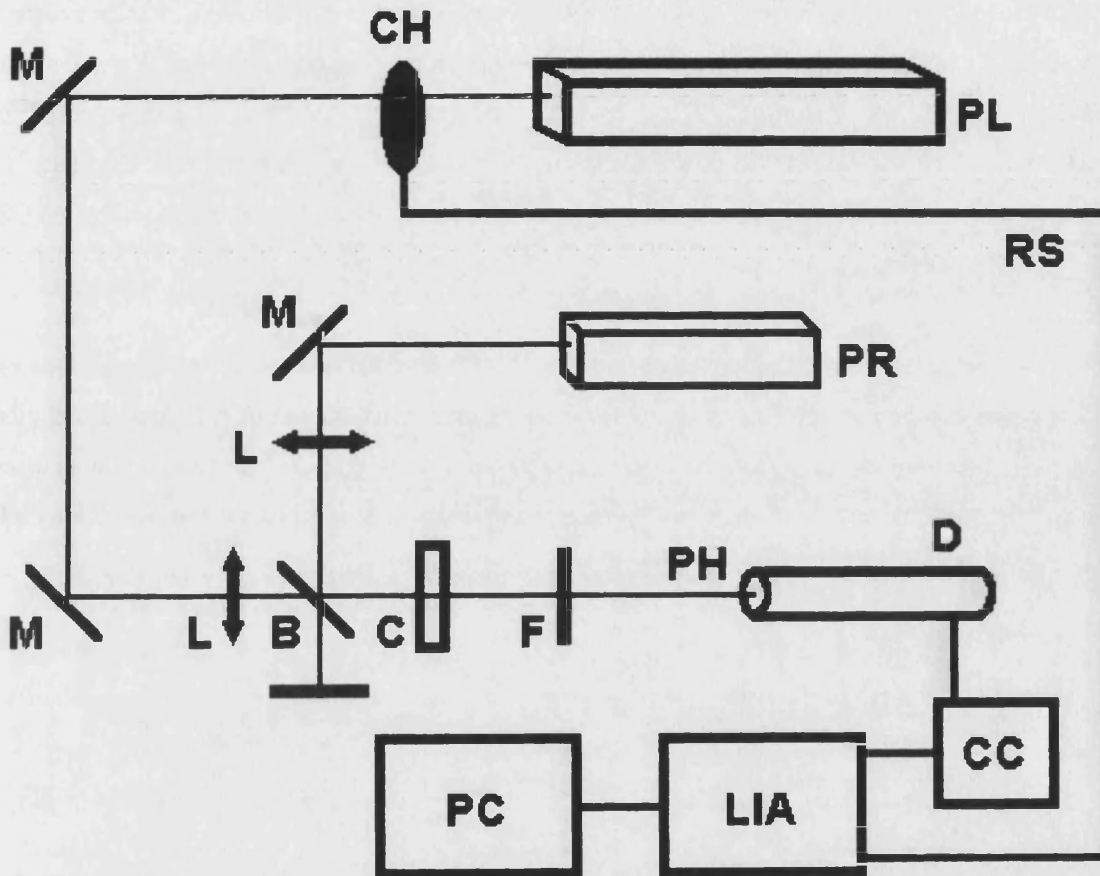


Figura II.2. - Esquema de un espectrómetro de lente térmica con la configuración bomba-prueba de haces coaxiales. PL = láser de bombeo; CH = modulador de haz; M = espejo; PR = láser de prueba; RS = señal de referencia; CC = circuito de acondicionamiento de la señal; LIA = amplificador sincrónico; PC = ordenador; los otros símbolos tienen el mismo significado que en la Figura II.1.

Se han descrito espectrómetros fototérmicos con otras configuraciones. En el diseño de haces cruzados, los haces de bombeo y prueba se cruzan en ángulo recto (Figura II.3). El haz de prueba es desenfocado verticalmente por la lente cilíndrica generada por la radiación de bombeo. En este diseño, el volumen de medida se limita a la región donde los dos haces láser se solapan y, con haces fuertemente enfocados, el volumen puede reducirse a tan sólo unos pocos picolitros. Esto hace a la configuración de haces cruzados muy atractiva para el desarrollo de detectores fototérmicos en CZE y en HPLC con columnas capilares.

También existen diseños que hacen uso de un único haz. En un experimento de ELT de este tipo, el haz de bombeo es enfocado a cierta distancia de la muestra, alcanzando la misma con cierta divergencia, la cual es incrementada por el gradiente térmico generado por el único haz. Con el diseño de un solo haz se gana simplicidad, pero se pierde la información asociada a los medios ciclos en los que el haz es cortado por el obturador rotatorio.

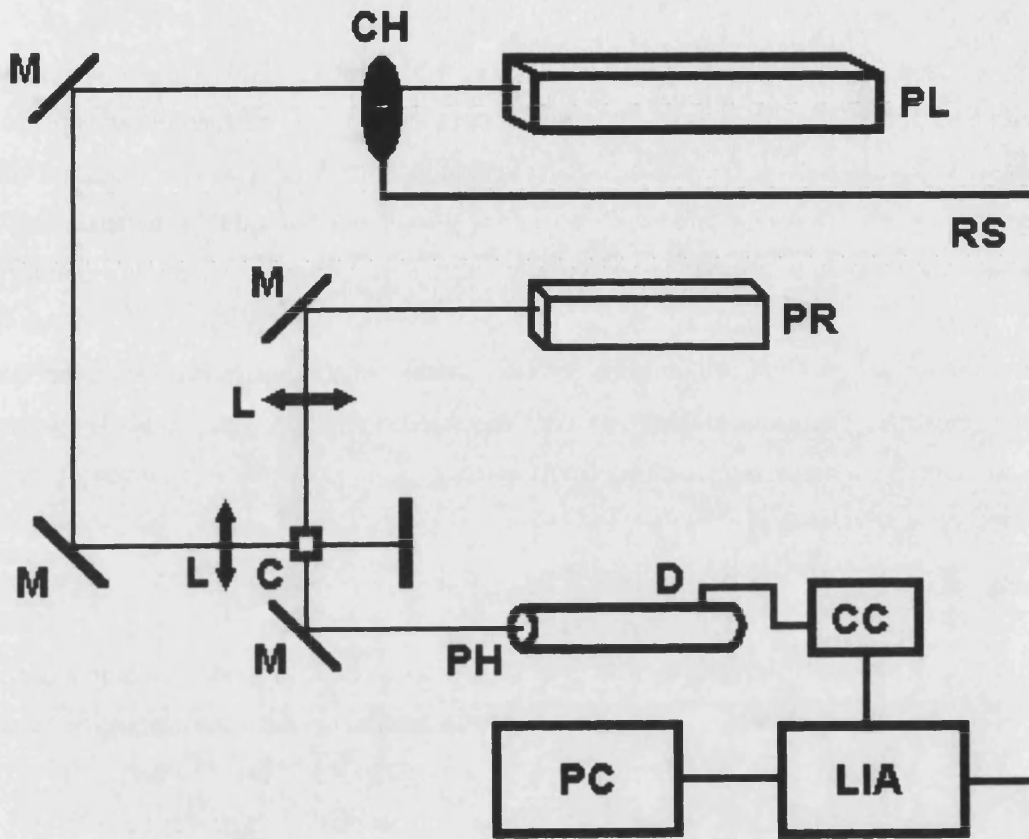


Figura II.3.- Esquema de un espectrómetro de lente térmica de haces cruzados. Los símbolos tienen el mismo significado que en las Figuras II.1 y II.2.

II.3.- Los láseres

Como veremos más adelante, en espectroscopía fototérmica, la sensibilidad es proporcional a la absorptividad molar del soluto y a la potencia del haz de bombeo. Por ello, se utilizan como haces de bombeo láseres de elevada potencia, que emiten a longitudes de onda a las cuales absorbe el cromóforo. La mayoría de cromóforos de interés analítico absorben en la región UV y en una pequeña región del visible, por debajo de 550 nm. Actualmente, el desarrollo y popularización de las técnicas fototérmicas se hallan todavía dificultados por las limitaciones y elevados precios de los láseres de elevada y moderada potencia que emiten en estas regiones del espectro. En la Tabla II.1 se muestran los láseres que se utilizan más frecuentemente en espectroscopía fototérmica, junto con algunas de sus características más relevantes.

Los nombres de los láseres aluden a la composición del material activo que genera la radiación láser. En ELT se emplea frecuentemente como haz de bombeo un láser de Ar^+ , debido a que muchas de las reacciones cromogénicas que son ampliamente utilizadas para derivatizar especies químicas de interés producen cromóforos que absorben en la región de 450 a 550 nm. El láser de He-Cd es una buena elección para obtener potencias de onda continua moderadas, a longitudes de onda más cortas, 442 y 325 nm. Por el contrario, la emisión a longitudes de onda más largas y la baja potencia limitan seriamente las posibles aplicaciones de los láseres de He-Ne como haces de bombeo en ELT. Sin embargo, estos láseres resultan convenientes como haces de prueba debido a su precio bajo y pequeño tamaño.

Tabla II.1. - Algunos tipos de láseres utilizados en espectroscopía fototérmica

Láser	Observaciones
Ar ⁺	Láser de descarga gaseosa con emisión cw. ^a Las principales líneas son 458, 488 y 514,5 nm. Las potencias se encuentran, generalmente, en el intervalo de unos pocos mW a unos pocos W por línea. Las líneas pueden ser generadas secuencialmente o simultáneamente.
Kr ⁺	Láser de descarga gaseosa con emisión cw. Es similar al láser de Ar ⁺ , pero las líneas se extienden por toda la región del visible. Las líneas principales son 530, 647 y 752,5 nm.
He-Ne	Láser de descarga gaseosa con emisión cw. Se construye generalmente para emitir a 632,8 nm, pero la mezcla de He-Ne puede también emitir otras líneas, por ejemplo, 3,39 μm en el infrarrojo. Los modelos más usuales son económicos y emiten entre 0,5 y 7 mW. Otros modelos emiten hasta 60 mW.
He-Cd	Láser de vapor metálico con emisión cw. Las potencias usuales se encuentran por debajo de 100 y 20 mW a 442 y 325 nm, respectivamente.
CO ₂	Láser de gas con una emisión pulsada muy potente en el infrarrojo, con muchas líneas discretas entre 9,1 y 10,9 μm.
Nd:YAG	Láser de estado sólido con una emisión pulsada muy potente a 1064 nm. Cuando se utilizan cristales para doblar y triplicar la frecuencia, se obtienen las líneas armónicas a 532, 355 y 266 nm, pero con pérdida de potencia. Se utiliza con frecuencia para bombear láseres de colorante.
Excímero	Emisión pulsada muy potente en el UV. La longitud de onda depende de la mezcla gaseosa que el usuario introduce en la cavidad, por ejemplo, 193 nm para ArF o 222 nm para KrCl.
Nitrógeno	Emisión pulsada potente a 337 nm (entre 10 μJ y 10 mJ por pulso). Existen modelos poco potentes a bajo precio. Se utilizan con frecuencia para bombear láseres de colorante.
Colorante	Son sintonizables desde el UV al infrarrojo. Deben ser bombeados con otros láseres; la potencia es una fracción de la potencia de bombeo, generalmente por debajo del 20% para el modo pulsado, y menor con el modo cw. El intervalo de longitudes de onda depende de la composición de la disolución de colorante orgánico que se haga circular a través de las celdas. La potencia disminuye rápidamente y se amula fuera del intervalo de ± 20 nm alrededor del óptimo de cada colorante.
OPO	El oscilador paramétrico óptico apareció en 1993. Es bombeado con un láser de Nd:YAG, y proporciona pulsos potentes en el intervalo 400-2000 nm. Un accesorio óptico para extender la longitud de onda posibilita la operación desde 2000 a > 3000 nm. La frecuencia puede doblarse para cubrir el intervalo de 200 a 400 nm.
Diodos	Los modelos usuales emiten una única línea de cw o radiación pulsada en la región de 670-1550 nm, con sintonización a lo largo de unos pocos nanómetros. La divergencia del haz es grande. Se construyen también en filas lineales y matrices cuadradas, conteniendo muchos diodos simples. Una matriz de gran tamaño puede alcanzar hasta 5 kW. Su precio no es elevado, pero se incrementa linealmente con la potencia.

^a cw = longitud de onda continua, lo opuesto a la operación pulsada.

También se han empleado láseres pulsados en espectroscopía fototérmica. La principal ventaja es la posibilidad de obtener elevadas potencias a muchas longitudes de onda, en las regiones visible y UV. La sintonización en estas regiones se obtiene mediante el uso de un láser de colorante y, también, mediante el oscilador paramétrico óptico (OPO). En un láser de colorante se hace circular a través de la celda del láser una disolución concentrada de un colorante orgánico, obteniéndose una radiación láser sintonizable, bombeando la celda con un haz láser de menor longitud de onda. La potencia no es constante y disminuye rápidamente cuando la longitud de onda del haz generado se aleja de la longitud de onda óptima del colorante. Deben emplearse disoluciones de distintos colorantes para barrer más de 40-50 nm. En cambio, mediante la utilización del OPO puede obtenerse una elevada y casi constante potencia, a lo largo de las regiones UV-visible-infrarrojo cercano. Sin embargo, un sistema OPO completo, en el que es necesario un láser potente de Nd:YAG para bombear el OPO, y un doblador de la frecuencia de salida para alcanzar el UV, posee un precio muy elevado.

II.4.- Selectividad

La espectroscopía fototérmica se basa en la absorción de radiación, por lo que la selectividad no es mejor que en espectrofotometría. Para mejorar la selectividad, se emplean reacciones de derivatización y la hibridación de las técnicas fototérmicas y de separación, incluyendo HPLC y CZE. La derivatización es también útil para aproximar la longitud de onda de absorción del analito a la proporcionada por el láser de bombeo disponible.

En la mayoría de los casos, la derivatización implica la mezcla de reactivos. En los sistemas en flujo, la disolución obtenida por mezcla de dos reactivos no es perfectamente homogénea, incluso a largas distancias corriente abajo desde el punto de mezcla. Las heterogeneidades se hallan asociadas a gradientes del índice de refracción, que pueden perturbar seriamente el gradiente térmico generado en un detector fototérmico. Puede mantenerse el ruido de medida a un nivel razonable insertando un mezclador en el sistema, tal como una columna de esferillas empaquetadas, después del punto de mezcla [16]. Sin embargo, cuando se inserta un mezclador en un sistema de flujo, se incrementa el volumen muerto, lo que puede arruinar la separación en el caso de que se utilice derivatización.

postcolumna. Por lo tanto, las operaciones de mezcla, incluida la derivatización, deben realizarse preferentemente fuera del sistema de flujo, por cargas, o bien, aprovechar las ventajas que ofrece el retraso cromatográfico. En este caso, la derivatización puede ser *on-line*, en modo precolumna. El retraso cromatográfico aísla los picos de las especies de interés de las perturbaciones refractométricas, que avanzan con el frente de fase móvil.

Tal como ocurre en la espectrofotometría convencional, en las técnicas fototérmicas, la selectividad puede mejorarse mediante técnicas de barrido, o bien, operando a varias longitudes de onda discretas. Los datos obtenidos a varias longitudes de onda son tratados mediante técnicas de análisis multicomponente. Una forma de realizar ELT multionda se basa en la utilización conjunta de las distintas líneas emitidas por los láseres de Ar^+ y Kr^+ . El láser se hace operar en el modo multilínea, seleccionando las líneas secuencialmente con una óptica externa, tal como un deflector opto-acústico sintonizable, y enfocándolas sobre la muestra [17,18]. Alternativamente, en un diseño multicanal de un solo haz, las líneas podrían ser dispersadas espacialmente con un prisma, y cada línea ser utilizada para generar un gradiente térmico en un punto distinto de la muestra. Finalmente, se medirían los gradientes simultáneamente con varios detectores.

Se ha demostrado la capacidad de la ELT multionda para corregir la absorción de fondo [19], y para analizar mezclas de hasta cuatro sustancias coloreadas [17-20]. La absorción de fondo puede eliminarse tomando la diferencia de señal de ELT a dos longitudes de onda. Por otro lado, la relación de señales a varias longitudes de onda puede proporcionar información suficiente para la identificación de una sustancia en una mezcla.

Para obtener un espectro de lente térmica se requiere un láser de bombeo sintonizable. Para este propósito se han utilizado láseres de colorante [21,22], sin embargo, con cada colorante sólo puede barrerse un pequeño intervalo de longitudes de onda, y debido a la gran dependencia de la intensidad del haz con la longitud de onda, se obtienen espectros deformados. Además, las diferencias de intensidad del haz de bombeo dificultan la comparación, con propósitos cuantitativos, de los espectros obtenidos con diversos colorantes. Como consecuencia de la incorporación del OPO, que proporciona una intensidad prácticamente constante a lo largo de una región muy amplia del visible e infrarrojo próximo, es de esperar que en los próximos años se produzcan nuevos desarrollos de las técnicas de ELT de barrido.

II.5.- Los modelos parabólico y aberrante en espectroscopía de lente térmica

La relación entre la señal de lente térmica y las variables experimentales, incluida la concentración de las especies absorbentes, puede describirse mediante los modelos parabólico y aberrante [23-27]. Según el modelo parabólico [1,23], e introduciendo los coeficientes de corrección de Carter y Harris [12,25], la señal de lente térmica viene dada por:

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{I(0) - I(\infty)}{I(\infty)} = 0,52\theta + 0,13\theta^2 \quad (\text{II.3})$$

donde:

$$\theta = \frac{2,303 P (-dn/dT) A}{\lambda_{\text{prueba}} \kappa} \quad (\text{II.4})$$

$I(0)$ es la intensidad que llega al detector cuando el haz de prueba ha sido perturbado, y $I(\infty)$ es la intensidad detectada cuando la lente térmica está totalmente formada, por lo que $\Delta I/I$ es el cambio relativo de intensidad en el centro del haz de prueba; P es la potencia de bombeo, dn/dT es el coeficiente de temperatura del índice de refracción, A es la absorbancia, λ_{prueba} es la longitud de onda del láser de prueba, y κ es la conductividad térmica del medio.

Como se deduce de la ecuación II.4, se obtiene una elevada sensibilidad con potencias elevadas, especies fuertemente absorbentes, y disolventes con buenas propiedades termo-ópticas, esto es, disolventes con valores altos de la relación $|dn/dT|/\kappa$. Para los disolventes orgánicos, esta relación varía entre $1,9 \times 10^{-4} \text{ mW}^{-1} \text{ cm}$ para metanol y $5,9 \times 10^{-4} \text{ mW}^{-1} \text{ cm}$ para tetracloruro de carbono. El agua presenta un valor bajo, $0,14 \times 10^{-4} \text{ mW}^{-1} \text{ cm}$ (a 20° C) [12], por lo que se recomienda el uso de mezclas agua-metanol y agua-acetona.

El modelo aberrante viene descrito por la ecuación siguiente [25]:

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{1}{1 - \tan^{-1} \left(\frac{1}{\sqrt{3}} \right) + \left[\frac{\theta}{2} \tan^{-1} \left(\frac{1}{\sqrt{3}} \right) \right]^2 + \left[\frac{\theta}{4} \ln \left(\frac{1}{3} \right) \right]^2} - 1 \quad (\text{II.5})$$

donde θ viene dada por la ecuación II.2. Esta ecuación se ha obtenido suponiendo que la muestra se encuentra a la distancia de máxima respuesta desde la cintura.

Según Carter y Harris [25], ambos modelos describen bien el comportamiento de lentes térmicas débiles. Cuando las lentes térmicas son más intensas, el modelo parabólico resulta más adecuado. Este modelo es también más sencillo desde el punto de vista matemático. Sin embargo, Shen y col. [27] prefieren el modelo aberrante, que tiene en cuenta la naturaleza aberrante del efecto óptico producido.

II.6.- Ruido de fondo y límites de detección

Para valores muy bajos de la señal del blanco, los disolventes con valores altos del cociente $|dn/dT|/\kappa$, tal como el tetracloruro de carbono y el cloroformo, proporcionan valores del límite de detección (LD) mucho menores que los disolventes polares. En tetracloruro de carbono, se han llegado a obtener LDs de 1×10^{-8} , en unidades de absorbancia. Este valor corresponde a niveles de ppt ($\mu\text{g ml}^{-1}$), para especies que presentan una elevada absorptividad molar. En las mismas condiciones, los LDs obtenidos en agua son del orden de 1×10^{-6} unidades de absorbancia.

La introducción de tampones o de reactivos de derivatización puede producir un aumento de la señal del blanco, que puede ser mucho mayor que la proporcionada por el disolvente puro. Debido al incremento del ruido asociado a la convección térmica, los LDs aumentan, y para valores elevados de S_{bl} , las diferencias entre los LDs obtenidos en disolventes apolares y polares, incluyendo el agua, son pequeñas. El intervalo dinámico lineal también disminuye apreciablemente. Por lo tanto, al adaptar un procedimiento espectrofotométrico a la ELT, debe reducirse la concentración del tampón y de los demás reactivos añadidos a la muestra.

Las técnicas de separación, tal como la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida, la cromatografía líquida de alta resolución o la electroforesis capilar, pueden ser muy útiles para separar los analitos derivatizados, del exceso de los reactivos derivatizantes o de otras especies absorbentes contenidas en la muestra. En ocasiones, se necesita la combinación de dos técnicas de separación para poder aislar la señal del compuesto de interés. Así, por ejemplo, en un procedimiento de HPLC-ELT para derivados dabsilados de aminoácidos, el exceso de reactivo derivatizante producía

un ruido elevado; la extracción de las muestras derivatizadas con éter dietílico redujo de forma importante el ruido de fondo de los picos, en la porción inicial del cromatograma, lo que permitió la detección de cantidades muy pequeñas de los analitos con tiempos de retención bajos [30].

Al utilizar una reacción cromogénica reversible, la constante condicional de estabilidad del derivado debe ser muy alta. De otra forma, la disociación del cromóforo a las bajas concentraciones empleadas puede hacer que el LD sea mayor que el esperado. Igualmente, si se aplica un procedimiento de extracción, es necesario que el coeficiente de distribución también sea muy elevado. En todos los casos, una reducción de la concentración de los componentes del tampón y de otros aditivos, puede ser importante para reducir la extensión de las reacciones laterales competitivas. Si se aplica un método de separación para eliminar el exceso de reactivo derivatizante, el equilibrio puede desplazarse hacia la disociación del cromóforo. Así, en la determinación de albúmina de suero bovino utilizando como colorante azul de Coomassie brillante R250 y G250, y electroforesis con gel de poliacrilamida, las curvas de calibrado de deflexión fototérmica fueron lineales en la región de 10-100 ng, pero la sensibilidad disminuyó muy rápidamente para concentraciones menores. La explicación más probable es que se produce la disociación de los complejos colorante/proteína por debajo de los 10 ng, lo que origina un LD mucho mayor de lo esperado [31].

Cuando la absorptividad molar del cromóforo es grande, y las condiciones expuestas anteriormente se cumplen de forma adecuada, pueden detectarse especies al nivel de las ultratrazas. Sin embargo, la ELT puede ser también de gran interés en la determinación de cromóforos de absorptividad molar moderada o baja en muchas muestras. Debido a la elevada sensibilidad de la ELT, pueden eliminarse o simplificarse algunos de los procedimientos de derivatización de rutina. De esta forma, procesos que tienen lugar a bajas concentraciones pueden monitorizarse, sin modificar el medio de la muestra.

En comparación con la fluorescencia, la respuesta de la ELT es casi universal, ya que las moléculas que absorben fuerte o moderadamente son mucho más comunes que las fluorescentes [32]. Las técnicas fototérmicas se hallan también libres de muchas de las fuentes de error sistemático que afectan a la fluorescencia.

II.7.- Dispersión de la radiación

Un problema que se presenta en el análisis de muestras reales es la dispersión de la radiación. En un espectrofotómetro, las partículas suspendidas atenúan el haz de luz y proporcionan lecturas de absorbancia altas. Este error sistemático positivo puede ser inaceptablemente alto, especialmente si la absorbancia de la muestra es baja [33]. En un experimento de lente térmica, la luz dispersada no origina una interferencia directa, ya que la radiación no absorbida no contribuye a la intensidad del gradiente térmico. Sin embargo, en presencia de las partículas dispersoras, se producen pequeñas, o incluso, moderadas pérdidas de sensibilidad, que son proporcionales a la atenuación de la potencia de excitación. Las partículas grandes en suspensión, entendiendo por grandes las que tienen diámetros no despreciables en relación al diámetro de los haces, producen ruido.

La señal de lente térmica se obtiene como un promedio de las variaciones relativas de intensidad en el centro del haz de prueba, producidas por los ciclos de bombeo. Por lo tanto, no deben esperarse cambios en la señal de lente térmica, cuando las variaciones de intensidad en el haz de prueba se produzcan a una frecuencia distinta a la de bombeo, o a frecuencias que no sean múltiplos de la frecuencia de bombeo. Una cierta proporción de radiación dispersada produce una disminución permanente de la intensidad del haz de prueba, por lo que no debe afectar a la sensibilidad de la señal de lente térmica.

Como se ha discutido antes, cuando las partículas dispersoras disminuyen significativamente la intensidad del haz de bombeo, se forma un gradiente térmico más débil, disminuyendo así la sensibilidad. Sin embargo, si las partículas que dispersan la luz son coloreadas, o si experimentan en su superficie una reacción cromogénica fotocatalizada, la absorción del haz de bombeo sobre las partículas puede incrementar el gradiente térmico. En este caso, se obtiene una contribución positiva a la señal, proporcional a la concentración de las partículas en suspensión. Este efecto ha sido observado con suspensiones de haluros de plata [34].

II.8.- Influencia del flujo

A valores bajos de la velocidad de flujo, la sensibilidad en ELT no se modifica significativamente respecto a la operación en estático. Así, por ejemplo, cuando se utilizó la ELT como técnica de detección en HPLC, a velocidades de flujo por debajo de $20 \mu\text{l min}^{-1}$, con una celda de detección cuadrada de $0,2 \times 0,2 \text{ mm}^2$, en el detector se alcanzó una amplitud de señal próxima a la amplitud obtenida en estático [30]. Tampoco se observaron reducciones de sensibilidad en una columna capilar de HPLC, para un flujo lineal en la celda de $0,02 \text{ cm s}^{-1}$ [35]. Afortunadamente, estos valores bajos de flujo son consistentes con una buena separación cromatográfica utilizando columnas capilares. Sin embargo, se requiere una bomba no pulsante, o en todo caso, que genere un flujo lo más regular posible y exento de pulsaciones, ya que las fluctuaciones del flujo producen perturbaciones en la amplitud de la señal. Probablemente, la ELT es insensible a las pulsaciones negativas de muy corta duración, que producen las modernas bombas de HPLC.

A flujos lineales altos (mayores de 3 cm s^{-1}), y con una radiación de bombeo de onda continua, se produce una disminución significativa en la sensibilidad de la lente térmica y un incremento en el ruido de fondo. El flujo a través de la celda origina dos efectos sobre la formación del gradiente térmico. En primer lugar, el flujo laminar aparta el material recalentado de la región de excitación de la celda de detección, antes de que la señal de lente térmica alcance su valor máximo. En segundo lugar, las turbulencias producidas en el interior de la celda originan una mezcla más rápida del material caliente con el material que lo rodea, lo que también causa una disminución de la sensibilidad y un aumento del ruido, debido a los gradientes de índice de refracción irregulares resultantes.

Por sus características y, especialmente, por el tiempo muy corto en el que se genera una señal, la excitación con láseres pulsados puede presentar ventajas en la detección mediante ELT de muestras en flujo, a velocidades de flujo elevadas. Probablemente, el tiempo de generación de la lente es mucho menor que el necesario para que los efectos de transferencia de calor, producidos por la conducción térmica y por las turbulencias o transporte de materia en el seno de la celda, lleguen a ser importantes [36]. Además, los láseres sintonizables de colorante, o el OPO, pueden emplearse para implementar un detector de ELT que haga uso de un láser pulsado, con una aplicación casi universal.

II.9.- Dicroísmo circular de lente térmica

Existen diferencias entre las propiedades fisiológicas y los efectos terapéuticos de las formas enantiómeras de muchos compuestos. Muy frecuentemente, un enantiómero no deseado puede alterar o limitar el efecto farmacológico del enantiómero deseado. Así, el conocimiento de la pureza óptica de sustancias quirales bioactivas es de extrema importancia en farmacología y en otros campos. La información quiral puede conseguirse midiendo el efecto Cotton a diversas longitudes de onda, esto es, mediante la obtención de los espectros de dicroísmo circular, o también mediante el uso de técnicas de separación con capacidad de discriminación quiral. En el último caso, puede incrementarse la selectividad con un detector de dicroísmo circular.

En el dicroísmo circular de lente térmica (DCLT), se utiliza una técnica fototérmica para medir el efecto Cotton, en lugar de un espectrofotómetro convencional. La DCLT fue estudiada, por primera vez, por Tran y Xu [37,38], tanto para muestras en estático como en flujo, y se aplicó a la detección en HPLC. En DCLT, la modulación de la radiación de bombeo se realiza con un modulador fotoelástico o celda de Pockels. Se obtienen medios ciclos alternados de radiación láser polarizada circularmente a derecha e izquierda. Ambos haces poseen la misma intensidad y, en presencia de especies absorbentes que no presentan efecto Cotton apreciable, generan un gradiente térmico de intensidad constante. Sin embargo, si ambos haces polarizados no son igualmente absorbidos, la intensidad del gradiente térmico aumenta y disminuye, a lo largo de cada ciclo. En el detector se genera una corriente alterna, cuya amplitud es proporcional al efecto Cotton, y el desfase de la señal de lente térmica respecto a la señal de referencia indica el signo del efecto Cotton. Si se emplea un amplificador sincrónico para demodular la señal, se obtiene una señal positiva o negativa, para un efecto Cotton positivo o negativo, respectivamente.

El DCLT presenta las ventajas del dicroísmo circular y de la espectroscopía de lente térmica: la capacidad de proporcionar información quiral con muy bajos límites de detección, y una resolución espacial superior a la conseguida con la espectrofotometría convencional. Otra ventaja es que un instrumento de ELT puede adaptarse fácilmente para realizar medidas de DCLT. En la bibliografía existen datos de límites de detección del orden de $\Delta A = 1 \times 10^{-6}$ y 4×10^{-6} (ΔA = absorbancia diferencial) para muestras acuosas en estático y flujo (HPLC), respectivamente [37].

II.10.- Determinación de compuestos orgánicos

A continuación, se describen algunos procedimientos de determinación de compuestos orgánicos, que han sido desarrollados utilizando detección fototérmica. Se describirán en este orden, procedimientos de HPLC, electroforesis capilar, estáticos y de infrarrojo.

a) Nitroanilinas

Las nitroanilinas han sido utilizadas como compuestos modelo, para investigar las características analíticas de la detección mediante ELT en HPLC [35][39-41]. Utilizando una columna capilar ODS y una fase móvil de metanol al 40% en agua, y bombeando el detector de ELT con la línea de 488 nm de un láser de Ar⁺, el límite de detección para la *o*-nitroanilina fue de 30 pg y la curva de calibrado fue lineal hasta 1,2 ng [35].

b) Aminoácidos

La determinación de cantidades muy pequeñas de aminoácidos es un problema importante en bioquímica, ciencia de los alimentos, medicina, y en otros campos interdisciplinarios relacionados con las ciencias de la vida. Frecuentemente, los aminoácidos se separan mediante HPLC o CZE con derivatización cromogénica con cloruro de (dimetilamino)azobencenosulfonilo (cloruro de dabsilo). Los aminoácidos dabsilados presentan un valor alto de la absorptividad molar, por encima de $1 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$, con un máximo de absorbancia próximo a la línea de 442 nm del láser de He-Cd, y la de 458 nm del láser de Ar⁺. Se han separado cantidades del orden del femtomol de aminoácidos dabsilados, haciendo uso de una columna capilar (1 mm de diámetro interno) de HPLC en fase inversa y detección mediante refracción fototérmica.

En otro estudio se hizo uso de una columna de sílice fundida de 250 μm de diámetro interno. Se utilizó un sistema de gradiente simple, con acetonitrilo y tampón acuoso de acetato 0,05 M de pH 5 (la composición inicial y final fue 40/60 y 75/25, respectivamente). Se utilizó la línea de 458 nm del láser de Ar⁺, operándola a 150 mW de potencia. Se demostró la posibilidad de separar 75 fmol

de 18 aminoácidos, y el límite de detección fue del orden de 750 amol (attomol) de analito inyectado en la columna. Ello significa que, en el volumen de prueba de 0,2 pl en el máximo del pico, sólo se hallaban presentes 50 moléculas de analito. Dicho límite de detección se encuentra entre los más bajos que aparecen en la bibliografía de aminoácidos [32].

También ha sido estudiada la combinación de la CZE con detección de ELT de haces cruzados [42,43]. Se llevó a cabo la separación mediante CZE de 18 aminoácidos dabsilados en orina, utilizando una mezcla de volúmenes iguales de acetonitrilo y tampón fosfato 20 mM de pH 7, que contenía dodecilsulfato sódico 5 mM, e inyectando tan sólo 200 pl de orina. Los límites de detección para los analitos inyectados estuvieron comprendidos en el intervalo 5×10^{-8} - 5×10^{-7} M de aminoácido. La señal fue lineal al menos a lo largo de tres órdenes de magnitud, desde el límite de detección hasta una concentración de 1×10^{-4} M [42].

c) Detección fototérmica indirecta de ácidos grasos

Se ha hecho uso de la detección fototérmica indirecta, que es análoga a la detección espectrofotométrica indirecta. La detección indirecta se basa en el desplazamiento de un aditivo fuertemente absorbente (reactivo visualizador) por el analito, lo que produce una disminución de la absorbancia de la fase móvil. La detección indirecta proporciona un esquema universal para detectar analitos no derivatizados a muy bajas concentraciones.

La detección de ELT indirecta ha sido aplicada a la determinación de ácidos grasos [44]. Se empleó, para ello, como haz de bombeo un láser de Ar^+ , una columna ODS de 10 μm (25 cm x 4,6 mm de diámetro interno), y como eluyente una mezcla de acetonitrilo-disolución acuosa de ácido fosfórico 0,3 M (95/5). Se adicionó Pontacyl Carmine 2B al eluyente, para obtener una disolución con una absorbancia de $1,3 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$. Este aditivo no interaccionó con la fase estacionaria y la señal obtenida fue debida a la dilución o intercambio del reactivo de visualización por el analito. El límite de detección fue de 15 ng en la celda, correspondiendo a 500 ng de ácido inyectado. La respuesta del detector fue lineal al menos hasta dos órdenes de magnitud por encima del límite de detección. Podrían obtenerse límites de detección absolutos menores con columnas de HPLC capilares, en lugar de las columnas de mayor diámetro empleadas en este estudio.

d) Cetonas

Las hidrazonas formadas por diversas cetonas con 2,4-dinitrofenilhidrazina fueron separadas en un sistema HPLC constituido por una columna capilar de 0,25 mm de diámetro interno, rellena de partículas de C_{18} de 5 μm , y una fase móvil de acetonitrilo-agua 3:1 [45]. El máximo de absorbancia de las hidrazonas se encuentra cerca de 360 nm, presentando una absorptividad molar de unos $2 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$. Se utilizó la línea de 442 nm del láser de He-Cd para bombear el detector de haces cruzados, longitud de onda a la que los derivados presentan una absorptividad molar relativamente baja, de tan sólo 2500-5000 $\text{mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$. Los límites de detección fueron, aproximadamente, 120 fmol para la acetona y 600 fmol para la adamantanona. Estas cantidades corresponden a la inyección en la columna, pero en el volumen de detección la cantidad detectada fue mucho menor.

e) Arilaminas

Mediante las reacciones de diazotación y acoplamiento de arilaminas primarias, se obtienen azocolorantes intensamente coloreados. Los iones diazonio se forman con ácido nitroso en medio ácido y son acoplados con N-(naftil)etilendiamina (NED). La reacción de acoplamiento experimenta catálisis positiva en un medio micelar de dodecilsulfato sódico (SDS), medio en el que, además, las constantes de protonación de los azocolorantes son mayores que en agua. Por estas razones, la diazotación, acoplamiento y medida de la absorbancia de los azocolorantes protonados es posible a $\text{pH} \approx 1$, para un gran número de compuestos diazotables [46]. Las reacciones de diazotación y acoplamiento cumplen los requisitos exigidos en un buen procedimiento en ELT: los reactivos son incoloros, las reacciones son irreversibles y los azocolorantes de NED presentan máximos de absorción en el intervalo 540-560 nm, coincidentes con las líneas más intensas de emisión del Ar^+ , y con absorptividades molares de $2 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$, o superiores.

Se ha llevado a cabo la determinación de varios diuréticos en orina mediante HPLC-ELT [46]. La hidroclorotiazida, bendroflumetiazida y furosemida son aminas secundarias que pueden ser hidrolizadas a arilaminas primarias, diazotadas y acopladas con NED. Los correspondientes azocolorantes fueron separados en una columna C_{18} , con una fase micelar de SDS 0,1 M conteniendo un 5% de *n*-propanol a pH 3. Con esta fase móvil es posible la inyección directa de muestras de orina

(sin desproteínización o extracción), y las muestras se pueden inyectar inmediatamente después de ser derivatizadas en el mismo medio micelar. A la longitud de onda de la radiación de bombeo (línea a 514,5 nm del láser de Ar⁺), los blancos proporcionaron cromatogramas casi planos. El límite de detección obtenido con el detector de ELT fue 20 a 50 veces inferior al obtenido mediante detección espectrofotométrica convencional.

f) Catecolaminas

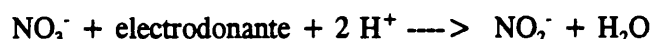
A pH 6-7, las catecolaminas presentes en los organismos vivos, epinefrina, norepinefrina, dopamina y L-dopa, son fácilmente oxidadas a los correspondientes aminocromos, que presentan su máximo de absorción entre 475 y 500 nm. Las absorptividades molares ($2500 < \epsilon < 3400 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$) son demasiado bajas para realizar la determinación espectrofotométrica de las catecolaminas en muestras fisiológicas, sin embargo, las bandas de absorción de los aminocromos coinciden con las líneas más intensas del láser de Ar⁺, a 488 y 514,5 nm. Este hecho ha sido aprovechado para desarrollar un procedimiento de HPLC-ELT para la determinación de catecolaminas libres en orina [47,48]. Las catecolaminas se aislaron mediante extracción en fase sólida con alúmina, se oxidaron con hexacianoferrato(III) y se inyectaron en una columna C₁₈ parcialmente rematada con C₁. La separación selectiva con alúmina fue muy útil para evitar interferencias, reduciéndose de forma importante la señal de fondo. Se empleó una fase móvil micelar de SDS, tamponada con citrato sódico a pH 4,9, y como estándar interno la catecolamina sintética isoproterenol. El intervalo dinámico de concentraciones se extendió desde el límite de detección, 1-4 ng ml⁻¹, hasta 1 µg ml⁻¹.

También se desarrolló un método de ELT no cromatográfico para la determinación de catecolaminas libres totales en orina [49]. Las catecolaminas se separaron de la matriz de orina coloreada mediante extracción con alúmina, y fueron oxidadas a aminocromos. Los cinco aminocromos presentaron absorptividades molares comparables, lo que proporcionó sensibilidades similares en ELT. Ello redujo los errores sistemáticos asociados al empleo de una de las catecolaminas como estándar de calibración, en la determinación del contenido total de catecolaminas mediante el método de adición estándar. Se utilizó la dopamina como estándar, debido a su sensibilidad intermedia y a su mayor concentración en la orina. Los errores sistemáticos calculados se encontraron en el intervalo $\pm 5\%$.

La técnica de ELT ha sido también utilizada para monitorizar la oxidación aérea de la dopamina, catalizada por la polifeniloxidasas, en la cual la velocidad de reacción inicial es una medida de la concentración de dopamina [50]. Esta oxidación enzimática da lugar al correspondiente aminocromo. Las otras catecolaminas sufren oxidaciones similares a aminocromos. Los espectros de absorción electrónicos no permiten distinguir entre las catecolaminas oxidadas, pero bajo ciertas condiciones se pueden diferenciar mediante las velocidades de reacción. La concentración de dopamina resultó proporcional a la pendiente inicial de la curva ELT-tiempo. A pH 6,5 la dopamina fue oxidada por completo en aproximadamente 10 min. La reacción enzimática de la dopamina en muestras fisiológicas no puede ser detectada con una sensibilidad suficiente mediante otros métodos espectrométricos.

g) Nitratoreductasa

La nitratoreductasa (NaR) es uno de los enzimas más importantes en el metabolismo del nitrógeno. La detección de este enzima en aguas naturales es importante en relación con la biogeoquímica de los compuestos de nitrógeno. Debido a las bajas concentraciones de NaR en las aguas naturales, es necesario el desarrollo de métodos de determinación altamente sensibles. En un método colorimétrico convencional, la actividad enzimática del NaR se mide mediante la reacción:



Después de una incubación apropiada, se adiciona un exceso de sulfanilamida, y el ion diazonio producido es acoplado con NED, midiéndose la absorbancia del azocolorante formado. Mediante espectrofotometría convencional no puede detectarse una concentración inferior a 100 nM de nitrato, mientras que este límite de detección fue mejorado adaptando el procedimiento a ELT [51]. Se utilizó como compuesto electrodonante, en la reacción enzimática, metilviológeno reducido. Un láser de Ar⁺ actuó a la vez como fuente de bombeo y de prueba, y se adicionó acetona al agua para aumentar la sensibilidad. El límite de detección para la medida de la actividad enzimática del NaR se mejoró en 20 veces respecto al método colorimétrico convencional.

h) Teofilina

Ha sido descrita la determinación mediante ELT de teofilina, previa reacción cromogénica de oxidación con H_2O_2 [52], utilizando la línea de 488 nm del láser de Ar^+ . En un medio acetona-agua 100:1, la curva de calibrado fue lineal desde 0,9 a 230 $\mu\text{g ml}^{-1}$, con un límite de detección de 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El método se aplicó a la determinación de teofilina en células nerviosas de molusco. En otro trabajo se indujo la termólisis de la muestra mediante la radiación del láser de Ar^+ , midiéndose la señal de lente térmica. El límite de detección disminuyó a 0,3 ng ml^{-1} [53].

i) Formaldehído

El interés en la determinación de formaldehído radica en su peligrosidad para la salud humana. Los polímeros del formaldehído se emplean en la fabricación de productos de la madera y aislantes en construcción, y se sabe que emiten bajas concentraciones de formaldehído al ambiente. En el método NIOSH para la determinación de formaldehído, la muestra de aire sospechosa de estar contaminada con formaldehído se burbujea en una disolución de ácido cromotrópico que contiene ácido sulfúrico, y se mide la absorbancia a 580 nm.

Este procedimiento fue adaptado a ELT [54], bombeando con un láser de colorante, el que era bombeado a su vez con un láser de Ar^+ . Fue necesario diluir 10 veces el blanco respecto al método espectrofotométrico, para obtener una señal del blanco que no fuera seriamente afectada por la convección térmica. Los límites de detección obtenidos fueron 66 y 17 ng ml^{-1} , para las configuraciones de haz simple y de doble haz, respectivamente, mientras que para el método NIOSH espectrofotométrico se alcanzaron valores de 0,1-2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Debido a los bajos valores del límite de detección, pudo reducirse de forma importante el volumen de muestra de aire necesario para detectar los mismos niveles de formaldehído. Así, sólo se necesitó 8 l de muestra gaseosa para detectar formaldehído en un nivel de concentración de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, considerando una eficacia del 95% en la operación de toma de muestra, mientras que los métodos para determinar formaldehído en aire mediante HPLC y cromatografía de gases, descritos en la bibliografía, precisan de 30 a 500 l de aire por muestra.

j) Materia orgánica coloreada en aguas naturales

La espectroscopía fototérmica también ha sido utilizada en estudios relacionados con la caracterización de la materia orgánica disuelta en aguas naturales [33]. El color, entre amarillo y marrón, de estas aguas está asociado a la materia orgánica disuelta, del tipo denominado comúnmente «sustancias húmicas». Estas sustancias juegan un papel importante en la especiación de metales traza en agua, debido a su capacidad para unirse a iones metálicos. Además, la absorción de luz por parte de la materia orgánica disuelta puede iniciar diversos procesos fotoquímicos. Por lo tanto, la evaluación de la absorptividad molar de las aguas naturales tiene interés, tanto en relación con la química de los iones metálicos, como en fotoquímica.

Es difícil la realización de estudios espectrofotométricos por dos razones: en primer lugar, las bandas en el visible, especialmente en el rojo, que distinguen las sustancias húmicas de otros cromóforos que pueden encontrarse en el agua (por ejemplo, pequeñas moléculas de metabolitos y péptidos), son muy débiles y causan problemas de sensibilidad. Por otra parte, los cromóforos se hallan frecuentemente asociados con partículas sólidas, y la absorbancia debe distinguirse de la dispersión de la radiación. No es posible realizar una filtración para eliminar las partículas dispersoras, ya que podría producirse la pérdida de una parte importante del material absorbente de interés. Mediante la espectroscopía fototérmica puede mejorarse la sensibilidad, distinguiendo la absorbancia de la dispersión de la radiación.

Se utilizó como haz de bombeo la línea de 458 nm del láser de Ar^+ y un láser de colorante funcionando a 600 nm. Se escogieron estas dos longitudes de onda, debido a la utilidad de la relación E_4/E_6 (que es la relación de absorbancias de las sustancias húmicas a 465 y 665 nm), para la caracterización de las sustancias húmicas. Se ha comprobado que el parámetro E_4/E_6 está correlacionado con el tamaño de partícula o el peso molecular. Además, esta relación varía con el pH y está correlacionada con la concentración de radicales libres. Los límites de detección para el carbono orgánico disuelto (COD) en las muestras acuosas fueron inferiores a $300 \mu\text{g ml}^{-1}$, un orden de magnitud inferior que el intervalo usual para el COD en aguas naturales, que es $1\text{-}25 \text{ mg l}^{-1}$. Por lo tanto, mediante la ELT puede determinarse la absorbancia de muestras de aguas naturales de interés, sin ser necesarias etapas de preconcentración.

k) Espectroscopía de lente térmica de infrarrojo

Para resolver diversos problemas de control sanitario del ambiente de trabajo, así como de contaminación atmosférica, es necesario detectar y determinar compuestos orgánicos volátiles a nivel de ultratrazas. Para ello, la espectrometría infrarroja resulta una técnica muy atractiva, debido a su capacidad para proporcionar información relacionada con la vibración molecular. Sin embargo, la baja sensibilidad de la espectrometría de absorción infrarroja convencional sólo permite la determinación de muestras a niveles superiores a las partes por millón, lo que no es suficiente para el análisis de trazas de los contaminantes gaseosos presentes a niveles de partes por billón [55]. La espectroscopía fototérmica aparece como un método viable para aumentar la sensibilidad de las medidas de absorción infrarroja. Una ventaja es el predominio de la relajación no radiativa de las moléculas excitadas vibracionalmente en el infrarrojo.

Se examinó la señal de ELT producida por una serie de hidrocarburos de cadena lineal y ramificada, disueltos en tetracloruro de carbono y utilizando para el bombeo la línea de $3,39 \mu\text{m}$ (2949 cm^{-1}) del láser de He-Ne [5]. Esta línea cae en la banda de tensión C-H de los hidrocarburos saturados, entre los picos de tensión asimétricos de los grupos CH_3 y CH_2 , a mayor y menor frecuencia, respectivamente. La situación de la línea representa una ventaja para la detección universal de hidrocarburos, pero también una desventaja, ya que pequeños cambios en la posición de los picos producirán grandes cambios en la absorptividad molar, haciendo que la cuantificación sea menos fiable. Se encontró que las absorptividades molares medias para los grupos metilo y metileno a $3,39 \mu\text{m}$ son útiles para la determinación de hidrocarburos saturados. Si bien los resultados obtenidos estaban limitados por la baja potencia del láser de He-Ne, la utilización de láseres más potentes permitiría la mejora de la sensibilidad.

De forma similar, se han desarrollado procedimientos para la determinación selectiva en fase gaseosa de acetona, alcoholes, moléculas aromáticas e hidrocarburos alifáticos [55,56]. Las muestras se hicieron circular a través de una celda de largo recorrido de 100 cm sin ventanas, y se hizo uso de un láser de He-Ne como haz de prueba y un láser de CO_2 para el bombeo. Resultó posible la medida del espectro de absorción y la asignación de la absorción a una longitud de onda dada a una especie molecular, debido a la capacidad de sintonización discreta del láser de CO_2 entre 9,1 y 10,9

μm (1100 a 920 cm^{-1}). Los enlaces C-C del esqueleto de la molécula absorben en esta región. Por lo tanto, la ELT con un láser de CO_2 puede ser empleada para la detección universal de compuestos orgánicos, separados mediante cromatografía de gases.

En otro estudio, se utilizó como fuente de excitación un láser de CO_2 , operando a 933 cm^{-1} , para la determinación mediante ELT de halometanos en argón [57]. Como láser de prueba se empleó un láser de He-Ne. El límite de detección para el diclorometano a 13,3 kPa fue 10 ng ml^{-1} . Este límite de detección fue extrapolado a 1 ng ml^{-1} a la presión atmosférica, que corresponde a 0,3 pg de analito en el volumen del haz de prueba, mejor que el obtenido con otros métodos utilizados para el análisis de trazas de halocarbonos, tal como el detector de captura de electrones, que proporciona un límite de detección de 1,4 pg. Este estudio mostró que la ELT, empleando un láser infrarrojo de alta potencia, es una técnica prometedora para el análisis de trazas en fase gaseosa.

A pesar de que los láseres de descarga de gas, tales como los de He-Ne, CO y CO_2 , no poseen una amplia sintonización, su comodidad de uso y su relativo bajo costo los convierte en fuentes atractivas para su utilización en espectroscopía fototérmica infrarroja. Así, por ejemplo, el láser de monóxido de carbono emite una serie de potentes líneas seleccionables en la región comprendida entre 5 y $6,5\text{ }\mu\text{m}$ (2000 a 1540 cm^{-1}), que podrían ser adecuadas para la detección de vibraciones de tensión de C=C, C=N y C=O, y las vibraciones de flexión de N-H. La detección a una única longitud de onda en el infrarrojo también puede permitir la monitorización de grupos funcionales [5].

II.11.- Determinación de compuestos inorgánicos

a) Hierro

La reacción de hierro(II) con 1,10-fenantrolina ha sido ampliamente utilizada en ELT. Filichkina y col. obtuvieron una curva de calibrado lineal, en el intervalo de concentraciones de hierro de 75 a 880 ng ml^{-1} , con un LD de $0,05\text{ ng ml}^{-1}$ [58], y comprobaron que concentraciones de Co, Ni y Cu superiores a 600 ng ml^{-1} no interfieren en la determinación. El ácido 4,7-difenil-1,10-fenantrolindisulfónico ha sido también aplicado a la determinación de hierro mediante ELT en

disolución acuosa y en CHCl_3 , mediante extracción de pares iónicos con cloruro de trioctilmetilamonio [59,60]. En agua, la señal fue lineal en el intervalo $0,6\text{--}6\text{ ng ml}^{-1}$ de hierro, y el LD fue $0,1\text{ ng ml}^{-1}$, utilizando una potencia de bombeo de 800 mW . Cuando se extrajo el complejo con cloroformo, el LD fue $0,01\text{ ng ml}^{-1}$. Los factores de exaltación fueron $\times 70$ y $\times 1200$, en agua y cloroformo, respectivamente.

La reacción entre Fe(II) y 1,10-fenantrolina también ha sido aplicada a la determinación de hierro por inyección en flujo, en un medio metanol-agua 50:50 [61]. El LD fue $0,37\text{ ng ml}^{-1}$. Considerando que el volumen del haz en la celda de flujo fue de sólo $0,3\text{ }\mu\text{l}$, y teniendo en cuenta el radio del haz en su cintura, por cálculo se obtuvo que la absorbancia medida en el LD correspondía a 34 fg de hierro en el volumen de análisis. Los autores demostraron que la inyección en flujo es útil para una rápida manipulación de muestras a nivel de trazas, previamente a su detección mediante ELT.

Imasaka y col. propusieron otro procedimiento para determinar trazas de hierro en disolución [62]. Para ello, el Fe(III) se redujo a Fe(II) mediante la adición de ácido ascórbico, se hizo reaccionar con 2-nitroso-5-dietilaminofenol, se extrajo con CHCl_3 y se midió la señal de la fase orgánica a 780 nm , con un espectrómetro de lente térmica equipado con un láser de semiconductor de GaAlAs. El LD fue $0,5\text{ ng ml}^{-1}$, 3 ó 4 veces menor que el obtenido con espectrofotometría convencional, siendo el factor de exaltación de $\times 47$. El ruido de fondo correspondió al hierro presente como impureza en el reactivo.

b) Aluminio

En 1965 se estableció por primera vez una correlación entre el porcentaje de afectados por la enfermedad de Alzheimer y la concentración de aluminio residual del agua, concluyéndose que es mayor la incidencia de la enfermedad en regiones donde la población está más expuesta a cantidades relativamente elevadas de aluminio medioambiental, que en áreas donde la exposición es menor. El sulfato de aluminio se utiliza como coagulante en el tratamiento del agua, para eliminar la materia en

suspensión y las sustancias húmicas coloreadas. La mayor parte del aluminio utilizado en el tratamiento se elimina en el proceso posterior de clarificación, sin embargo, cantidades residuales de aluminio pueden pasar al agua suministrada para uso doméstico.

Lowe y Snook desarrollaron un procedimiento para la determinación de aluminio en agua mediante ELT [63]. Estudiaron la compatibilidad de dos reactivos espectrofotométricos con esta técnica: el rojo de bromopirogalol (RBP), en presencia de bromuro de *n*-tetradeciltrimetilamonio (TDTA), y el cromazurol S (CAS), en presencia de cloruro de cetilpiridinio (CCP). El primer reactivo posee una sensibilidad relativamente alta ($\epsilon = 5,05 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$), el procedimiento analítico es bastante simple y rápido, con buena reproducibilidad y un intervalo de pH para la formación del complejo bastante amplio (5,0-6,2). El cromazurol S proporciona una mayor sensibilidad ($\epsilon = 1,28 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$), pero posee la desventaja de la mayor complejidad del procedimiento, debido al estrecho intervalo de pH óptimo para la formación del complejo (5,8-6,0). El LD para el sistema RBP-TDTA fue $1,2 \text{ mg l}^{-1}$, debido al elevado valor de la señal de los blancos a la longitud de onda de bombeo, mientras que el LD para el sistema CAS-CCP, con señales del blanco bajas, fue $0,17 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, muy inferior al obtenido mediante el método espectrofotométrico convencional.

c) Cromo y bismuto

La reacción del Cr(VI) con 2,2'-difenilcarbonato dihidrazida se ha aplicado a la determinación de cromo en muestras de pelo humano mediante ELT, utilizando un láser pulsado para la excitación [64]. El LD fue 2 ng ml^{-1} .

Proskurnin y col. aplicaron la ELT a la determinación de trazas de bismuto mediante su reacción con yoduro [65]. La muestra se acidificó con ácido sulfúrico y se hizo reaccionar con disolución de ácido ascórbico y yoduro potásico; la señal se midió después de 5-10 min a 488 nm, y fue proporcional a la concentración de bismuto en el intervalo $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$ - $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. El LD fue 10 pg ml^{-1} , y Cu(I), Cu(II), Sn(II), Pb(II) y Sb(III), no produjeron interferencias en la determinación.

d) Níquel y cobalto

La formación de una capa de óxido en la superficie de níquel metálico, en contacto con disoluciones alcalinas, es un tema de estudio en el campo de la electroquímica de superficies y en la investigación de baterías. Jiang y col. desarrollaron un procedimiento de espectroscopía fototérmica, utilizando un detector piroeléctrico de película de difluoruro de polivinildieno, para la medida *in-situ* de la capa anódica formada sobre un electrodo de níquel, en contacto con una disolución de NaOH 1 M [66]. Las variaciones de la señal en el electrodo de níquel reflejaron los cambios de composición de la capa superficial entre $\text{Ni}(\text{OH})_2$ y NiOOH , a diferentes potenciales. Con ello se demostró que la espectroscopía fototérmica es una técnica muy sensible y útil para la medida de fenómenos superficiales en un electrodo. La determinación de níquel con dimetilglioxima también ha sido adaptada a la ELT, midiendo la señal del complejo disuelto en etanol [67]. El LD para níquel fue $0,8 \text{ ng ml}^{-1}$.

La adaptación de la mayoría de los métodos espectrofotométricos existentes a la ELT requiere una elevada pureza de los reactivos y disolventes, y una disminución significativa del ruido experimental. En casos muy favorables, estos requisitos posibilitan la disminución de los LDs hasta 3 órdenes de magnitud. Filichkina y col. determinaron cobalto en cadmio y telurio de elevada pureza, y en agua potable, mediante ELT con un láser de Ar^+ operado a 514,5 nm como fuente de bombeo, haciéndolo reaccionar con 2-nitroso-1-naftol [68]. El LD fue 1 pg ml^{-1} , lo que supone una sensibilidad 30 veces mayor que la del método espectrofotométrico convencional.

El dicroísmo circular acoplado a la lente térmica se utilizó como detector en la separación mediante HPLC en fase reversa, de pares iónicos de los enantiómeros (-)-tris(etilendiamina)-cobalto(III) y (+)-tris(etilendiamina)-cobalto(III) [69]. Se utilizó como fase móvil una disolución de bis(μ -d-tartrato)diantimoniato(III). Se obtuvo un LD de 7,2 ng para ambos enantiómeros.

e) Plata

Rius Revert y col. comprobaron que la señal de lente térmica proporcionada por una disolución de haluro aumentaba, cuando se añadía Ag^+ a la disolución o viceversa [34]. Se interpretó el cambio en la señal de lente térmica como debido a la dismutación del precipitado de haluro de plata en suspensión, con el consiguiente oscurecimiento de la superficie de las partículas del sólido, producida por la radiación de bombeo de Ar^+ . El cambio en la señal dependió de la naturaleza de los iones en exceso; así, la inyección de un exceso de Ag^+ en disoluciones de cloruro dio lugar a la respuesta más rápida, mientras que la respuesta más intensa se produjo al inyectar el exceso de Ag^+ en disoluciones de bromuro. La monitorización mediante ELT de la valoración de cloruro con Ag^+ también fue posible. Las experiencias demostraron que es posible discriminar la absorbancia de la dispersión de radiación, al realizar medidas de lente térmica en suspensiones ligeramente turbias de haluros de plata.

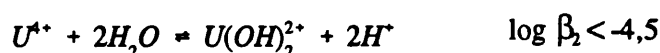
Zhang y Long estudiaron también la absorción de luz por disoluciones coloidales de plata generadas fotolíticamente, mediante ELT [70]. Comprobaron que la absorbancia de disoluciones de nitrato de plata a 488 nm es el resultado de la formación de un coloide. Los autores observaron que la absorbancia está relacionada con la distribución del tamaño de partícula, y que ésta varía sustancialmente de una medida a otra, incluso utilizando la misma disolución coloidal para las medidas. La desviación de la señal de lente térmica entre experimentos distintos se minimizó cuando se produjo el coloide en una disolución de AgNO_3 , transportada por un sistema de flujo continuo, pero aún así la desviación entre disoluciones distintas de la misma concentración fue importante.

f) Lantánidos y actínidos

Medina Hernández y col. compararon los procedimientos espectrofotométrico y de ELT, en la determinación de cerio con 8-hidroxiquinolina (oxina), tras su extracción en CHCl_3 [71]. El LD del cerio se vio condicionado por la pureza de los reactivos y por la extracción de la oxina al pH de trabajo (pH 10,5). La utilización de concentraciones bajas de reactivos de elevada pureza permitió disminuir la señal del blanco en ELT, alcanzándose un LD de $1,3 \text{ ng ml}^{-1}$, 40 veces inferior al

espectrofotométrico. El intervalo dinámico lineal se extendió hasta 84 ng ml⁻¹ y la desviación estándar relativa de una disolución que contenía 70 ng ml⁻¹ de cerio fue del 3,9%.

La información sobre la especiación de elementos traza en agua es de interés por varias razones. La forma química del metal traza puede influir en su toxicidad o en sus efectos beneficiosos, así como en la velocidad de transporte del elemento, afectando a su absorción en las fases sólidas que se encuentran en su recorrido. Para obtener información de la especiación en sistemas con más de un ligando, es necesario que los espectros de los complejos de los diferentes estados de oxidación presenten diferencias importantes. En el caso de los ligandos inorgánicos esto ocurre raramente, sin embargo, elementos como los actínidos presentan espectros bastante diferentes para cada estado de oxidación. Diversos autores han comprobado la posibilidad de utilizar la ELT para realizar estudios cuantitativos del equilibrio químico, en disolución acuosa muy diluida. La ELT puede ser un método adecuado para obtener información sobre la hidrólisis mononuclear del uranio(IV), información de difícil obtención con los métodos tradicionales. Los resultados obtenidos mediante ELT, en el intervalo de pH 0-2,8 , a una fuerza iónica 3 M, se describieron con el siguiente modelo químico:

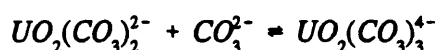


Haciendo uso de la teoría de interacción del ion específico, se obtuvo la constante de equilibrio a fuerza iónica cero: $\log \beta_1^0 = -0,51 \pm 0,03$. Este valor coincide con los valores de la bibliografía, lo que confirma que la ELT es una técnica fiable para el estudio de la formación de complejos mononucleares, en sistemas donde a mayores concentraciones del ion metálico predominan los complejos polinucleares o la formación de especies insolubles [72].

Posteriormente, se estudió el comportamiento en medio acuoso del ion uranilo (UO₂²⁺), utilizando un espectrómetro de lente térmica de dos haces no coaxiales, y se encontró un comportamiento de lente térmica anómalo, al adicionar ácidos carboxílicos al sistema [73]. La señal de lente térmica decae lentamente ($t_{1/2} \approx 3$ s) hasta alcanzar el equilibrio. El proceso se invierte al eliminar la radiación de bombeo. Medidas de deflexión del haz de prueba, en el volumen de interacción del haz, indicaron que este efecto es producido por un gradiente de índice de refracción inverso. Los autores proponen un posible mecanismo que explica este fenómeno, basado en una

transferencia de energía endotérmica y la posterior fotodescarboxilación del ácido carboxílico (ácido acético), que elimina la energía desde el centro del volumen de interacción del haz, e invierte el gradiente de temperatura y, por lo tanto, el gradiente del índice de refracción. Este estudio pone de manifiesto la posible presencia de mecanismos fotoquímicos interferentes para la disipación de la energía, difíciles de predecir y de cuantificar. Sin embargo, es posible que el desarrollo de las técnicas de ELT permita medir de forma específica eficacias cuánticas de reacciones fotoquímicas.

También se ha estudiado el sistema U(VI)-H₂O-CO₂(g), en medio NaClO₄ 0,5 M a 25°C [74,75]. La utilización de la ELT y una concentración total de U(VI) muy baja (4x10⁻⁶ M) permitió obtener información del equilibrio de estabilidad del complejo UO₂(CO₃)₂²⁻, sin la interferencia del trímero (UO₂)₃(CO₃)₆⁶⁻, formado a concentraciones mayores. De este modo, se determinó el valor de la constante de equilibrio, log K₃ = 6,35 ± 0,05, para la reacción:



Los autores discutieron el uso potencial de la ELT para los estudios de especiación de elementos traza, en sistemas de aguas naturales.

Omenetto y col. describieron un sistema que incorpora un láser de colorante pulsado para el bombeo y un láser de He-Ne como haz de prueba, capaz de detectar absorptividades molares del orden de 5x10⁻⁷ cm⁻¹, que corresponde a un LD de 5 ng ml⁻¹ de U(VI) en un medio acuoso de NaClO₄-NaHCO₃ [22]. El espectro del U(VI) en este medio, obtenido mediante ELT, es similar al obtenido espectrofotométricamente. Aunque el intervalo de longitudes de onda que puede alcanzarse es más amplio que con la utilización secuencial de las líneas de un láser de onda continua, la obtención del espectro de absorción completo, utilizando una sucesión de colorantes resultó poco práctica.

La ELT se aplicó al análisis de pequeñas concentraciones de nitrato de uranio en disoluciones acuosas de ácido nítrico, que contenían un 30% de tri-*n*-butilfosfato [76]. El espectrómetro utilizaba para el bombeo un láser de colorante pulsado, y una configuración doble para la detección, con el fin de reducir el efecto del ruido de fondo del disolvente y suprimir las fluctuaciones del láser de prueba. Se obtuvo el espectro de ELT de UO₂²⁺ 7,5x10⁻⁵ M en disolución de ácido nítrico 0,6 M, y se determinó uranio en el intervalo de concentraciones 5x10⁻⁷-5x10⁻² M. La sensibilidad fue aproximadamente 2 ó 3 órdenes de magnitud mayor que en espectrofotometría convencional.

Berthoud y col. utilizaron un láser pulsado sintonizable de colorante, bombeado con un láser de excímero, para el bombeo, y un láser de He-Ne como haz de prueba, para la determinación de uranio [77]. El láser de bombeo se sintonizó a la longitud de onda de 414 nm, con una potencia de 200 kW. Con una celda de 1 cm, las curvas de calibrado fueron lineales desde 0,1 mM hasta > 10 mM de UO_2^{2+} y el LD fue $4 \mu\text{M}$ ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$).

La determinación de iones lantánidos y actínidos está considerada como uno de los problemas más difíciles en análisis espectroquímico, ya que existen pocos métodos experimentales que puedan utilizarse para la especiación directa, a los niveles tan bajos en los que se encuentran éstos usualmente en la naturaleza. Estos estudios de especiación son importantes para el comportamiento migratorio de los actínidos en aguas naturales. Para la determinación de estos iones a niveles de trazas, se requieren técnicas de análisis que posean una elevada sensibilidad y selectividad. Los éteres corona son un grupo de ligandos macrocíclicos, cuya química es de particular interés, debido a su capacidad para formar complejos con una gran variedad de iones metálicos. Esta propiedad es de gran importancia en química analítica, particularmente en técnicas de separación, ya que mediante su utilización es posible la extracción selectiva de iones metálicos de disoluciones acuosas en una fase orgánica. La extracción de los iones lantánidos con éteres corona y la posterior detección mediante ELT, permite exaltar la sensibilidad y selectividad en la determinación de estos iones [78].

En el método desarrollado, los iones de tierras raras en disolución acuosa fueron extraídos selectivamente con éteres corona, tales como 18-corona-6 y 15-corona-5. La intensidad de la señal de lente térmica de los iones extraídos en la fase orgánica puede exaltarse hasta 24 veces, debido a las propiedades termoópticas del disolvente. La mejora en la selectividad se debe a la restricción de tamaño impuesta por los éteres corona, que forman complejos sólo con aquellos iones, cuyo tamaño es comparable al de las cavidades de estos compuestos. Así, por ejemplo, utilizando el 18-corona-6, puede extraerse más de un 41% de europio(III) en cloroformo, mientras que la extracción del praseodimio(III), bajo las mismas condiciones experimentales, es sólo del 28%. Los autores obtuvieron las eficacias de extracción para ocho iones lantánidos con varios éteres corona y diversos disolventes. En una revisión bibliográfica, Georges discute la utilización de la ELT en análisis de iones lantánidos [79].

La ELT también se ha utilizado para la determinación de estos iones en disolución acuosa y para la obtención de sus espectros, haciendo uso de un láser de colorante que cubría un amplio intervalo de longitudes de onda [74]. Se obtuvieron los LDs para distintos grados de oxidación de los iones actínidos, que estuvieron comprendidos entre 3×10^{-8} M para americio(III) en HClO_4 1 M y 2×10^{-6} M para plutonio(V) en HNO_3 0,2 M. Moulin y col. construyeron un espectrómetro de ELT completamente automatizado, para la especiación de actínidos, que permite mejorar la reproducibilidad de la señal [21]. Obtuvieron los espectros de plutonio en diferentes estados de oxidación, y los LDs para diversos iones actínidos, que variaron entre 4×10^{-8} M para plutonio(III) y plutonio(IV), y 2×10^{-7} M para neodimio(III).

En otro estudio, se determinaron diversas tierras raras, tras su separación mediante HPLC, utilizando un montaje con dos haces de láser dispuestos a 90° , ambos enfocados en la celda de flujo [80]. Se realizaron medidas simultáneas de las señales de ELT y de fluorescencia inducida por láser. La máxima señal en la separación y determinación de neodimio en medio HClO_4 , utilizando una fase estacionaria ODS-3, se obtuvo para una velocidad de flujo de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, y la absorbancia mínima detectable fue $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. El LD absoluto, obtenido al separar uranio en HNO_3 (pH 4) utilizando metanol-agua (3:2) como fase móvil, y realizando la detección con excitación y emisión a 337 nm y 494 nm, respectivamente, fue de 1 ng de uranio.

He y col. estudiaron el efecto de lente térmica para neodimio en disolución, y lo determinaron en una muestra que contenía una mezcla de óxidos de metales de tierras raras, sin interferencia de lantano, cerio y praseodimio [81]. Se ha aplicado la ELT a la determinación de terbio con 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR), por inyección en flujo [82]. Los resultados obtenidos con disoluciones acuosas y mezclas agua-metanol se compararon con los obtenidos previamente en espectrofotometría convencional. Se utilizó para el bombeo un haz de láser de Ar^+ a 514,5 nm y 20 mW, y un láser de He-Ne a 632,8 nm y 6,2 mW, como haz de prueba. Los LDs en ELT fueron $13,5 \text{ ng ml}^{-1}$ y 38 ng ml^{-1} para agua y una mezcla agua-metanol 40:60, respectivamente. En espectrofotometría convencional, los LDs fueron 8 ng ml^{-1} y 19 ng ml^{-1} . Por lo tanto, la ELT resultó ser menos sensible que la espectrofotometría convencional, ya que se vio fuertemente afectada por las condiciones experimentales, tales como la composición del disolvente y las irregularidades en el flujo y en el perfil del haz, y también debido a la elevada señal de fondo del PAR, así como a la reacción poco desplazada entre el reactivo y el analito.

Wruck y col. construyeron un espectrómetro de lente térmica compacto, utilizando fibra óptica y un láser pulsado de diodos como fuente de excitación, que se adaptó a las medidas de campo y a procesos en continuo [83]. El LD de plutonio(VI) fue $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ a 831 nm, comparable a los obtenidos mediante bombeo del experimento de ELT con un láser de colorante, y mediante espectroscopía fotoacústica.

g) Molibdeno, arsénico, fósforo y sílice

La determinación de cantidades a nivel de nanogramos de metales pesados, en pequeños volúmenes de muestra de aguas naturales, representa un importante problema. Proskurnin y col. optimizaron las condiciones experimentales para la determinación mediante ELT de molibdeno en aguas naturales [84]. La muestra de agua se acidificó con H_2SO_4 concentrado y se trató con disolución de ácido ascórbico, rodanida amónica y tartrato sódico-potásico para enmascarar el Fe(III); posteriormente, se extrajo el molibdeno con metiletilcetona. La emulsión se filtró y se midió la absorbancia a 488 nm. Se pudo detectar de 0,03 a $0,36 \text{ ng ml}^{-1}$ de molibdeno en agua potable y en agua de mar, con un coeficiente de variación del 8%.

Uno de los métodos más sensibles para la determinación de fósforo es la colorimetría clásica del azul de molibdeno, basada en la reducción del molibdeno a fosfo-12-molibdato y la extracción posterior con disolventes orgánicos. Este método permite determinar fósforo a niveles de subpartes por millón. Sin embargo, incluso con este método tan sensible, no pueden alcanzarse las bajas concentraciones de fósforo presentes en algunas aguas naturales, en las que la concentración de ácido fosfórico necesaria para inducir la eutrofización es, en ocasiones, menor que el LD de este método espectrofotométrico. Grishko y Grishko estudiaron la fotorreducción del ácido molibdofosfórico (AMF) en disoluciones alcohólicas (*n*-butanol, *iso*-butanol y *terc*-butanol), bajo la irradiación de una lámpara de mercurio [85]. Se utilizó un láser de Ne (337 nm) y un láser de He-Cd (441,6 nm), como haces de bombeo, y un láser de He-Ne (632,8 nm), como haz de prueba. Se demostró la posibilidad de monitorizar simultáneamente las formas amarilla y azul del AMF. El haz láser sirvió, además, para fotoactivar la reducción del molibdeno. Se llegó a la conclusión de que la reversibilidad de la reacción

de fotorreducción del AMF era producida por la interacción de la forma fotorreducida con el AMF original amarillo y los productos intermedios de reducción. Se observó que la eficacia cuántica de la reacción de fotorreducción aumenta en la serie *terc*-butanol, *iso*-butanol, *n*-butanol. El LD para fósforo fue 40 ng ml⁻¹.

Fujiwara y col. adaptaron también este procedimiento a la ELT, alcanzando niveles de detección extremadamente bajos, de 73 pg ml⁻¹ de fósforo en agua; 14 pg ml⁻¹ en una mezcla 1:2 acetona-agua y 5 pg ml⁻¹ en una mezcla 1:1 acetona-agua [86]. La validez del método se comprobó con muestras certificadas de agua de mar y de lago.

Grishko y col. determinaron fósforo y arsénico, por formación de los ácidos molibdofosfórico y molibdoarsénico, respectivamente [87]. Los compuestos de fósforo y arsénico se redujeron con Sn(II) e hidracina, respectivamente, y los productos de color azul formados se extrajeron en 2-metilpropan-1-ol. Se midió la absorbancia de los extractos a 632,8 nm, utilizando un láser de He-Ne. El LD fue 10 pg ml⁻¹ para fósforo y 100 pg ml⁻¹ para arsénico. El método se aplicó a la determinación de perfiles de concentración de fósforo en sílice.

En otro estudio, Grishko y col. propusieron dos esquemas de medida (uno cinético y otro de equilibrio), para la determinación por ELT de fósforo y sílice, mediante la fotorreducción de sus heteropoliácidos molíbdicos en el haz del láser [88]. El valor del blanco se determinó mediante la fotorreducción de molibdato amónico, que a pesar de extraerse en baja cantidad, se encuentra presente en la disolución, por haber sido introducido en exceso, de acuerdo con el procedimiento espectrofotométrico de rutina. La señal de lente térmica alcanzó el equilibrio en menos de 1 min, y el tiempo de resolución de las medidas cinéticas fue como máximo de 1,3x10⁻⁷ s. El rendimiento cuántico de la fotorreducción del ácido molibdofosfórico fue de 0,08 (láser de excímero, 308 nm), 0,045 (láser de nitrógeno, 337,1 nm), 0,015 (láser de He-Cd, 441,6 nm) y 0,001 (láser de Ar⁺, 488 y 514,5 nm). Se optimizaron las condiciones de medida para las curvas de monitorización en ELT, y se comparó con los registros espectrofotométricos, representando la curva de calibrado como velocidad inicial de fotorreducción en función de la concentración. La constante de velocidad de fotorreducción del ácido molibdofosfórico en butanol fue de 2,0 s⁻¹.

Los mismos autores determinaron fósforo como complejo de asociación iónica molibdofosfato-auramina en alcohol isobutílico-hexano-acetona (1:2:2), utilizando para el bombeo un láser de He-Cd operado a 441,6 nm ($\epsilon = 4,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$). El método fue aplicado a la determinación de fósforo en ácido clorhídrico, ácido nítrico, y en bismuto e indio de elevada pureza [89], a la determinación de trazas en sílice de elevada pureza, y a la determinación de perfiles de concentración de fósforo en láminas de vidrio fosfato-silicatado y en películas de sílice activadas con fósforo [90].

Rius Revert y col. desarrollaron un procedimiento de ELT para la medida de arsénico, mediante la generación del hidruro y posterior reacción cromogénica [91]. El hidruro de arsénico se generó con tetrahidroborato(III) sódico, para obtener posteriormente una disolución roja con dietilditiocarbamato (DDTC) de plata(I) en cloroformo, en presencia de dietanolamina. La señal de lente térmica se midió utilizando para el bombeo la línea de 514,5 nm del láser de Ar^+ . La señal de las disoluciones de Ag(DDTC) originó un blanco afectado de un ruido importante, y disminuyó el intervalo dinámico lineal. La sensibilidad disminuyó cuando la concentración de Ag(DDTC) se redujo por debajo de $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, lo que indicó que las reacciones implicadas no eran cuantitativas. Utilizando una potencia de bombeo de 50 mW, se obtuvo un LD para arsénico de 2 ng ml^{-1} .

h) Otros iones metálicos

Ramis Ramos y col. propusieron un procedimiento para la determinación de diversos iones metálicos (Pb, Zn, Cd, Hg, Ag, Cu y Bi) con ditizona, previa extracción con CCl_4 , utilizando un instrumento de lente térmica de haces coaxiales, con un láser de Ar^+ operado a 514,5 nm como haz de bombeo [92]. Los ditizonatos metálicos presentaron máximos de absorción en CCl_4 , en la región de 460 a 550 nm, y la absorptividad molar varió entre 3×10^4 y $9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$. Las disoluciones de ditizona se prepararon en CCl_4 y fueron purificadas por extracción con ditizona, para eliminar las trazas metálicas, previamente a la realización de las determinaciones. Las extracciones de los ditizonatos se realizaron a pH 1 para Hg(II) , 3 para Bi(III) , 4-5 para Ag(I) y Cu(II) , 5 para Zn(II) , 8 para Pb(II) y 12 para Cd(II) . El exceso de ditizona se retroextrajo con NH_3 diluido. Los autores encontraron, para todos los ditizonatos estudiados, relaciones prácticamente lineales entre la señal analítica y la concentración de metal. Los LDs estuvieron comprendidos entre $0,015 \text{ ng ml}^{-1}$ para el

Cu(II) y $0,08 \text{ ng ml}^{-1}$ para el Bi(III). Los valores de los LDs, correspondientes a extracciones independientes, fueron superiores a los obtenidos por dilución de una disolución concentrada, debido principalmente a que la ditizona se extrae en CCl_4 al pH de trabajo, contribuyendo a la absorbancia del blanco. Una excepción la constituyó el cadmio, para el cual se obtuvo un LD extraordinariamente bajo, del orden de $0,008 \text{ ng ml}^{-1}$, que corresponde a un LD absoluto de 4 fg de cadmio en el volumen de análisis. Este bajo valor se debe a que al pH al que se efectúa la extracción, fuertemente básico, no se extraen los ditizonatos de otros metales, tales como cinc, plomo y bismuto.

También se ha estudiado la posibilidad de utilizar la ELT para detectar quelatos metálicos, tras su separación por HPLC en medio tartrato, con una columna de intercambio iónico, seguida de complejación con PAR, en ausencia y presencia del complejo Zn(II)-EDTA [93]. Los LDs fueron del orden de $0,1\text{-}2 \text{ ng ml}^{-1}$. En presencia de flujo, la sensibilidad se redujo a la mitad y el ruido aumentó unas diez veces, siendo la principal fuente de ruido la mezcla incompleta de los reactivos durante la derivatización. Sin embargo, a pesar de estas dificultades, los LDs se redujeron en más de 10-100 veces, con respecto a los métodos espectrofotométrico y conductimétrico. El ruido de fondo aumentó de forma importante cuando se conectó el sistema cromatográfico al sistema de derivatización postcolumna, debido a la dificultad adicional que supone la mezcla de disoluciones de diferente composición y densidad (principalmente tartrato $0,14 \text{ M}$ con $\text{NaOH } 2 \times 10^{-2} \text{ M}$), y a la presencia de la reacción de neutralización, fuertemente exotérmica.

Abroskin y col. utilizaron un espectrómetro de lente térmica de doble haz para la determinación de trazas de Co, Bi, Fe, Ni y Mo, y elaboraron una metodología sistemática para la adaptación de procedimientos de la espectrofotometría convencional a la ELT [94]. Los métodos de ELT utilizados para la determinación de los metales se basaron en métodos espectrofotométricos conocidos (cobalto con 2-nitroso-1-naftol, níquel con α -dioximas, molibdeno con iones tiocianato, hierro con 1,10-fenantrolina y bismuto con yoduro). La aplicación de la espectrometría de lente térmica permitió el aumento de la sensibilidad de estos procedimientos analíticos en $10^3\text{-}10^5$ veces. Los LDs fueron: $0,17 \text{ pg ml}^{-1}$ para Co, 9 pg ml^{-1} para Ni, 10 pg ml^{-1} para Mo, 50 pg ml^{-1} para Fe y 10 pg ml^{-1} para Bi.

También se han adaptado a ELT métodos cinéticos de especiación para la determinación de iones metálicos a niveles bajos de concentración, en presencia de ligandos coloidales, importantes en

muchos sistemas naturales [95]. Utilizando la brominación de la acetona como reacción testigo, se comprobó que pueden obtenerse constantes de velocidad con 2-3 cifras significativas, a partir de series con un cambio total de la absorbancia inferior a 0,003. En el análisis cinético de óxido férrico hidratado coloidal, en presencia de ácido sulfosalicílico (ASS), que origina FeASS, se observó que la labilidad del complejo aumenta a las bajas concentraciones alcanzadas mediante la ELT, en comparación con el comportamiento observado con las concentraciones utilizadas para su análisis mediante espectrofotometría convencional, lo que se debe a un cambio en la naturaleza de los coloides. Los estudios realizados, utilizando partículas de látex coloidales de tamaño conocido, mostraron que la dispersión de la luz por las partículas no absorbentes no produce interferencia en las medidas de ELT, mientras que las partículas que absorben la radiación de bombeo producen un aumento significativo de ambos, la señal de ELT y el ruido asociado a las medidas.

i) Sulfuro y SO₂

La ELT también ha sido aplicada a la determinación de sulfuro mediante su acción reductora sobre el ácido molibdofosfórico [96]. Las formas azul y amarilla del ácido se separaron por extracción con alcohol isobutílico, determinándose el molibdeno en el extracto orgánico y, por lo tanto, también el sulfuro, midiendo la señal de lente térmica a 632,8 nm. El LD fue 5 ng de azufre y el tiempo de la determinación fue de tan sólo 5 min.

La reacción del Fe(II) con la 1,10-fenantrolina también se ha aplicado a la determinación de SO₂ [97]. Se midió la señal de lente térmica de disoluciones de metabisulfito, que contenían Fe(III) en exceso, 1,10-fenantrolina y F⁻ para enmascarar el exceso de Fe(III). La absorbancia de la disolución de Fe(II)-fenantrolina aumentó linealmente con la concentración de SO₂, hasta una concentración de 10⁻⁵ M, siendo el LD 2x10⁻⁸ M, mientras que en espectrofotometría convencional es 4x10⁻⁷ M. El procedimiento se aplicó a la determinación de SO₂ en aire.

j) Nitrito y NO₂

La detección colorimétrica del ion nitrito, basada en las reacciones de diazotación de sulfanilamida y acoplamiento del ion diazonio formado con dihidrocloruro de N-(naftil)etilendiamina, es uno de los métodos más sensibles para la determinación de NO₂⁻, y ha sido ampliamente aplicada al análisis de aire contaminado y de aguas naturales. Sin embargo, incluso con este método no pueden analizarse algunas muestras de agua (como agua de mar o agua de lago), que contienen cantidades de NO₂⁻ y NO₃⁻ por debajo del LD (2 ng ml⁻¹). Para los estudios medioambientales y geoquímicos, es fundamental la posibilidad de medir niveles muy bajos de nitrato en ambientes no contaminados. La adaptación de este método a la ELT ha sido llevada a cabo utilizando un láser de Ar⁺, operado a 514,5 nm para el bombeo [98]. Esta longitud de onda se halla próxima a la del máximo de absorción del azocolorante formado (aproximadamente 500 nm). Utilizando como disolvente una mezcla 1:1 de acetona-agua, el LD de NO₂⁻ fue 0,2 nM, el intervalo dinámico se extendió entre 0,2 y 50 nM y el calibrado fue lineal hasta una concentración de 10 nM. La aplicación de la ELT mejoró el LD en más de dos órdenes de magnitud, respecto al método espectrofotométrico.

Los óxidos de nitrógeno, especialmente en forma de NO₂, juegan un papel importante en la contaminación del aire, puesto que la interacción del NO₂ en la atmósfera con la luz solar y con los hidrocarburos insaturados produce peligrosos oxidantes fotoquímicos. Debido a los niveles de concentración a los que se encuentra presente, se requieren métodos sensibles y seguros para el análisis de trazas de NO₂. La espectrofotometría convencional es útil para la determinación de NO₂ a niveles del µg ml⁻¹, pero es poco sensible para la determinación a niveles del ng ml⁻¹. Para salvar esta limitación, se han investigado algunos métodos absorciométricos que hacen uso de fuentes láser. Así, se ha utilizado la ELT para el análisis de NO₂ en aire [99], y se han calculado los factores de exaltación de la sensibilidad respecto a la espectrofotometría convencional, para muestras gaseosas y líquidas, utilizando como haz de bombeo, tanto un láser continuo, como un láser pulsado. Se compararon los factores de exaltación predichos teóricamente con los valores experimentales, siendo la concordancia entre ambos valores bastante buena. Utilizando impulsos de 1 mJ, el factor de exaltación de la señal fue de x10³. La determinación de NO₂ se llevó a cabo utilizando un láser de colorante que proporcionaba impulsos de 20-40 µJ, alcanzándose un LD de 0,8 ng ml⁻¹.

Tran y Franko construyeron un espectrómetro de lente térmica de configuración bomba/prueba, capaz de medir simultáneamente la señal de lente térmica a dos longitudes de onda, provenientes de un láser de Ar^+ operado en modo multilínea [100]. La selectividad del procedimiento la proporcionó la medida del cociente entre las señales de lente térmica a las dos longitudes de onda, que actuó como una «huella dactilar» del compuesto y permitió su identificación en la muestra. El cociente entre las señales de lente térmica a 457,9 y 514,5 nm, para el NO_2 gaseoso, fue de 2,52, que concuerda con el valor 2,53, obtenido con un espectrofotómetro convencional. El LD para el NO_2 en aire, a una potencia de bombeo de 30 mW fue 300 ng ml^{-1} .

Higashi y col. estudiaron una nueva configuración óptica de ELT, con el fin de aumentar la sensibilidad [101]. El haz de bombeo, un láser de Ar^+ , se enfocó en la muestra como es habitual, pero el láser de prueba se introdujo directamente sin enfocar el haz. Los dos haces se colimaron y aislaron con dos prismas, para eliminar la interferencia óptica entre los mismos. El LD del NO_2 , utilizando la línea de 448 nm del láser de Ar^+ (700 mW), fue 5 ng ml^{-1} , mientras que el del método convencional (con una celda de 100 cm) es $4 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Las curvas de calibrado fueron lineales en aire hasta 300 ng ml^{-1} . La espectrometría fotoacústica proporciona LDs similares (del orden de 20-40 ng ml^{-1}), sin embargo, la ELT presenta ventajas respecto a esta técnica, ya que permite utilizar celdas de flujo y, para caudales pequeños, no se ve afectada por el flujo, lo que es muy útil en la práctica para el análisis en continuo del NO_2 atmosférico. Los mismos autores utilizaron un láser pulsado de colorante, bombeado con un láser de excímero, para medir el espectro de lente térmica del NO_2 , haciendo un barrido de longitudes de onda [102]. El espectro de ELT guardó una buena correlación con el espectro de absorción. Se obtuvo una curva de calibrado lineal en el intervalo del nl l^{-1} , siendo el LD 4 nl l^{-1} , similar a los mejores valores alcanzados mediante otros métodos espectrométricos que utilizan fuentes láser. Las experiencias mostraron que la ELT pulsada es especialmente útil para el análisis de muestras gaseosas a temperaturas elevadas.

III.- INSTRUMENTACIÓN

III.- INSTRUMENTACIÓN

III.1.- Espectrómetros de lente térmica

En las investigaciones que se presentan en esta Memoria se utilizaron tres espectrómetros de lente térmica distintos. El primero fue construido en nuestro laboratorio del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, y se empleó para obtener los datos presentados en los capítulos IV, VII, VIII, IX y X; mientras que el segundo y tercer instrumentos fueron construidos en el *Laboratoire d'Energétique des Systèmes et Procédés* (LESP) de la *Université I.N.S.A.* de Rouen (Francia), y se utilizaron durante una estancia en ese laboratorio. Corresponden a los resultados expuestos en los capítulos V y VI.

a) Espectrómetro construido en la Universitat de València

Para la construcción del instrumento de lente térmica se utilizaron elementos adquiridos de diversas casas comerciales, así como otros diseñados y construidos en nuestro departamento [29]. El espectrómetro de lente térmica se diseñó de acuerdo con la configuración más usual de bomba-prueba de haces coaxiales. Un esquema del instrumento se muestra en la Figura III.1. Las cabezas de los láseres, los elementos ópticos y el detector se montaron sobre una mesa óptica de acero inoxidable ferromagnético, de 90 x 180 cm², de Ealing (Watford, Reino Unido, serie 1000, ref. 37-8307), que proporcionó un soporte plano y estable.

Como fuente de radiación de bombeo se utilizó un láser de Ar⁺ de 4 W (Spectra-Physics, modelo 2016-04, Mountain View, CA), montado sobre cuatro pies de acero inoxidable de 17 cm de altura. Sus características se indican en la Tabla III.1. En el período en el que se desarrollaron las investigaciones presentadas en esta Memoria, se repuso el tubo del láser de Ar⁺, que se deteriora con el uso normal del mismo, perdiendo potencia. Para refrigerar la fuente de alimentación y el tubo de plasma, se utilizó agua tomada directamente de la red, que se filtró a través de dos filtros, uno grueso y otro fino. A los extremos del grupo de filtrado se colocaron dos manómetros, lo que permitió controlar constantemente el estado de los filtros. Además, se instaló una válvula de presión máxima, para impedir que la presión sobrepasase un cierto valor de seguridad.

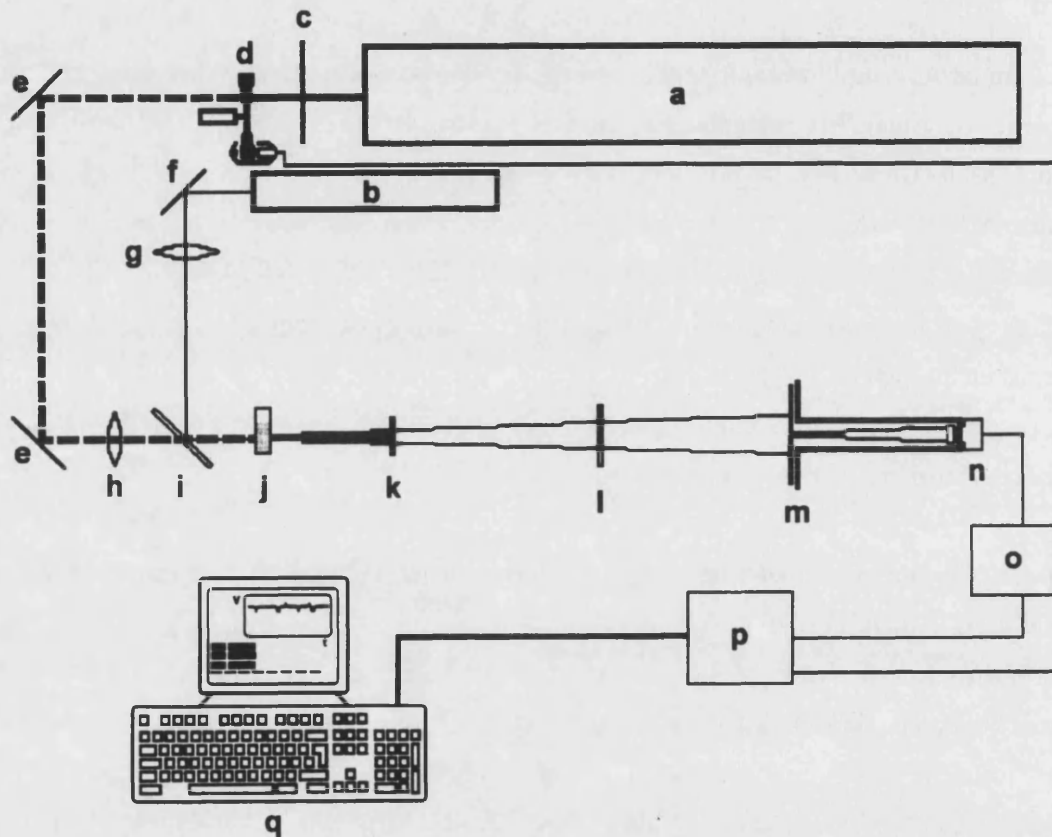


Figura III.1.- Esquema del espectrómetro de lente térmica: (a) láser de Ar^+ (bombeo); (b) láser de He-Ne (prueba); (c) obturador manual; (d) modulador de haz; (e)-(f) espejos; (g)-(h) lentes biconvexas; (i) divisor de haz; (j) soporte de la cubeta; (k) filtro interferencial; (l) filtro de gelatina; (m) máscara de rendija; (n) fotodiodo; (o) caja de conexiones; (p) amplificador; (q) ordenador provisto de una tarjeta de adquisición de datos DAS-8.

Tabla III.1. - Especificaciones del láser de Ar⁺.

Eléctricas	
Potencia de entrada	Trifásica con toma a tierra
Tensión	208 ± 10% (alterna)
Corriente (máxima)	42 A
Frecuencia	50/60 Hz
Ópticas	
Ruido ^a	
Modo Potencia	0,5% rms
Estabilidad ^b	
Modo Potencia	± 5%
Diámetro del haz ^c	1,4 mm
Divergencia del haz ^c	0,5 mrad
Longitud de la cavidad	
Sin prisma	0,920 m
Con prisma	0,960 m
Polarización	100:1 vertical
Sistema de refrigeración	
Caudal de agua mínimo	8,4 l min ⁻¹
Temperatura del agua	de 10 a 35°C
Dimensiones	
Tamaño de la cabeza	110,6 x 17,5 x 14,6 cm
Peso	43 Kg

^a A 514,5 nm, de 10 Hz a 2 MHz; rms = *root mean square*.

^b En un período de 30 min, tras un calentamiento de una hora.

^c Medido a 514,5 nm. A otras longitudes de onda y suponiendo que no cambia la configuración óptica, el diámetro viene dado por: $(\text{dia}_1/\text{dia}_2) = (\lambda_1/\lambda_2)^{1/2}$.

Como láser de prueba se utilizó un He-Ne de 7 mW (Spectra-Physics, modelo 105), que emite a 632,8 nm (ver Tabla III.2). El láser de He-Ne se sujetó con una montura de Ealing (ref. 22-1739), provista de dos grados de libertad, para facilitar el alineamiento óptico. A su vez, esta montura se sujetó sobre un conjunto compuesto por un pie de acero inoxidable de 10 cm de altura, un poste de construcción propia, y un pilar de altura regulable (Ealing ref. 22-4055). Ambos láseres se dejaron calentar durante al menos 10 min, antes de realizar cualquier medida.

Tabla III.2. - Especificaciones del láser de He-Ne.

Potencia de salida	más de 5 mW
Diámetro del haz	$0,83 \pm 0,02$ mm
Divergencia del haz	1 mrad
Polarización	500:1 mínimo
Modo transversal	TEM ₀₀
Estabilidad de potencia	$\pm 5\%$ máximo
Corriente óptima	$6,5 \pm 0,1$ mA
Voltaje de trabajo	2350 ± 100 V
Voltaje inicial	< 10 KV
Dimensiones	44,2 mm x 405 mm

Para modular el haz de bombeo se utilizó un modulador mecánico (Stanford Research Systems, modelo SR 540, Sunnyvale, CA), movido por un motor de corriente continua y retroalimentado por un par LED-fotodiodo. Asimismo, se montó un obturador manual junto al extremo de la cabeza del láser de bombeo, delante del modulador de haz, para poder bloquear el haz desde cualquier punto alrededor de la mesa.

La mayor parte de la óptica se montó sobre rieles ópticos de perfil bajo (Ealing, refs. 36-0065 y 36-0073), de 60 y 100 cm de longitud, respectivamente, sobre los que pueden deslizarse los conjuntos formados por una base (Ealing, ref. 22-4048), un pilar, un poste de altura regulable y una montura con 1 ó 2 grados de libertad. Sobre la montura se sujetó el correspondiente elemento óptico.

Se utilizaron dos lentes biconvexas simétricas de vidrio Crown, de 100 mm y 200 mm de distancia focal (Pedret, modelo B-270, refs. BXC040100 y BXC040200, Barcelona), que se sujetaron haciendo uso de unos soportes de aluminio a postes y bases de la casa Ealing. En las bases se colocaron piezas de deslizamiento vertical y horizontal (Ealing, ref. 22-4089 y 22-4071), para el ajuste fino de la posición de las lentes.

Para conseguir un mayor gradiente térmico, se utilizó la lente de menor distancia focal (la de 100 mm), para enfocar el haz de bombeo en el seno de la muestra. Para doblar el haz de bombeo se utilizaron espejos dicróicos, con un alto poder de reflexión, optimizados a 514,5 nm y con un ángulo de incidencia de 45°, marca Newport (Irvine, California, E.E.U.U.). Se utilizó también un espejo plano (Ealing, ref. 22-1464) (ver Figura III.1, espejo f), de 28 mm de diámetro, montado en una montura cinemática con dos ejes ajustables.

Se utilizó un divisor de haz de película plástica de nitrato de celulosa de 5 μm de espesor y forma elíptica (44 mm x 63 mm), sin recubrimiento (Ealing, ref. 22-8916), para hacer ambos haces coaxiales en la región de la muestra.

De la calidad del alineamiento de los haces de ambos láseres depende la sensibilidad obtenida. Una pequeña modificación en el alineamiento de los haces puede dar lugar a una diferencia de sensibilidad de más de un orden de magnitud. Para conseguir un buen alineamiento, los haces deben ser coplanares (estar en un plano paralelo a la superficie del tablero óptico), y todos los elementos ópticos deben estar perfectamente centrados y alineados en los dos sentidos, vertical y horizontalmente. El alineamiento se llevó a cabo de forma sistemática, elemento por elemento, manteniendo una altura de 265 mm sobre la superficie de la mesa, con ayuda de un gramil. Se observó la sombra de la punta de la aguja del gramil en el campo lejano (pared o pantalla).

Los haces deben ser perfectamente coaxiales, al menos durante el recorrido por el interior de la muestra. Para conseguir este alineamiento fino en la región de la cubeta, se utilizó una disolución de dicromato potásico y se observó el efecto de lente térmica sobre el detector. Se corrigió ligeramente el alineamiento, actuando sobre la posición de la lente y los espejos que gobiernan el haz de bombeo, hasta conseguir un efecto fototérmico circular, lo más simétrico posible.

Si no se indica lo contrario, se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico (Hellma, ref. 1000-QS, Müllheim, Alemania). Para sostener las cubetas se utilizó un soporte (Shimadzu, Kyoto, Japón), modificado por nosotros. En cualquier serie de experiencias se tuvo cuidado de utilizar la misma cubeta, con la misma orientación, evitando girarla sobre sí misma 180°. Debe tenerse en cuenta que si se cambia la cubeta, o si una cubeta dada se utiliza girada 180°, es necesario ajustar de nuevo ligeramente el alineamiento óptico, puesto que las caras de las cubetas ordinarias no son paralelas en un grado suficiente.

Después de su paso por la cubeta, la mayor parte de la radiación de bombeo se eliminó por reflexión, mediante un filtro interferencial de paso alto de 560 nm (Ealing, ref. 35-5586) y un filtro rojo de gelatina Kodak n° 29, que elimina la radiación por debajo de 560 nm.

A continuación, se colocó un tubo de acero de 250 mm de longitud y 30 mm de diámetro, a cuyos extremos se soldaron dos placas de 70 x 70 mm², recubriéndose el conjunto con pintura negra mate. La caja conteniendo el fotodiodo y sus conexiones se unió a la placa posterior. Se utilizó una rendija en posición horizontal para muestrear el haz de prueba. A través de la rendija, montada sobre un pilar y un poste, pasaba la señal al detector.

El fotodiodo de silicio fue un Centronic OST-15 y se montó en el interior de una caja metálica de 5,5 x 2,5 x 2 cm³, en la que se practicaron cuatro orificios, uno de ellos para la entrada de la radiación, y los otros para una salida NBC y dos conectores hembra del tipo banana. Estos tres últimos se utilizaron para llevar directamente la señal al registrador. Se acondicionó la señal de salida con la ayuda de un amplificador operacional, para convertir la corriente en voltaje y aumentar en gran medida la impedancia de salida. Con ello se redujo el ruido y se tuvo la posibilidad de llevar a cero la corriente de fondo.

Para recoger la señal, se utilizó un ordenador PC/AT, provisto de una tarjeta de adquisición de datos (una interfase DAS-8 de Metrabyte, Taunton, MA). La velocidad máxima de adquisición de datos de la interfase DAS-8 es 4000 s^{-1} , lo que permite el excelente seguimiento de la señal fototérmica, para un amplio intervalo de frecuencias de bombeo. La forma de la señal quedaría bien definida, incluso con frecuencias del orden de 200 Hz, poco usuales en espectrometría de lente térmica. A menos que se especifique lo contrario, en los trabajos que se presentan en esta Memoria se utilizó una velocidad de adquisición de datos de 1000 s^{-1} , para adquirir lentes térmicas de 4 Hz.

La adquisición de las señales y su tratamiento se hizo utilizando el programa AUTOTLS (*Automatic Thermal Lens Spectrometry*), escrito en QuickBASIC y fusionado con las subrutinas de lenguaje máquina de la interfase DAS-8, al ser compilado [103]. El programa contiene diversas subrutinas, que permiten al usuario seleccionar los parámetros del sistema y tratar los datos.

El efecto de lente térmica se midió como

$$I_{\max} - I_{\min}$$

siendo I_{\max} e I_{\min} las intensidades máximas y mínimas, cuando las lentes térmicas se disipan y forman, respectivamente (Figura III.2).

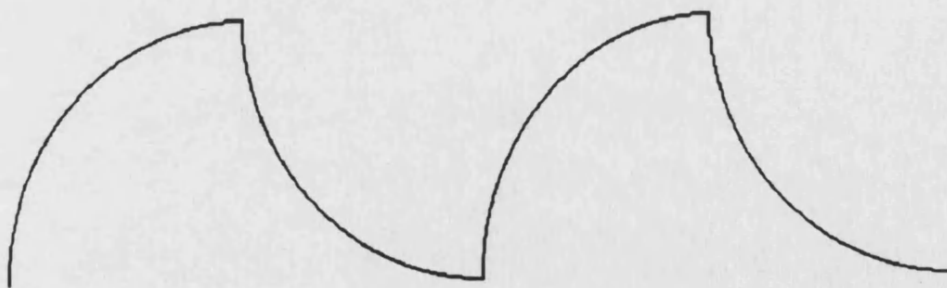


Figura III.2.- Señal de lente térmica excitada a 4 Hz y obtenida con una velocidad de adquisición de datos de 1000 puntos por segundo.

Los datos se dividieron en tantos grupos como ciclos de referencia del modulador de haz habían sido contados, durante el período de adquisición de datos, número que correspondió al número de lentes térmicas formadas y disipadas. Se buscó el máximo y mínimo de cada grupo y se calculó su diferencia. El período de adquisición de datos comenzó y terminó con un mínimo o con un máximo. Se eliminó el primer y último mínimo (o máximo), y se tomó la media aritmética de los otros mínimos y máximos, como I_{\min} e I_{\max} de cada ciclo. En las condiciones utilizadas se consideraron dos máximos y un mínimo por ciclo.

En la Figura III.3 se muestran las diversas pantallas del menú de opciones del programa AUTOTLS, utilizado para la adquisición de datos. La opción SETUP del menú principal permite seleccionar y establecer el conjunto de condiciones de trabajo. Mediante la opción «TIEMPO TOTAL DE MEDIDAS (MIN)» se determina el número de puntos adquiridos. Así, por ejemplo, si el tiempo es 1 min, se obtendrán 30 puntos.

La opción del menú principal «MONITORIZAR LA SEÑAL» muestra en pantalla la señal de lente térmica que se va obteniendo. La opción de «ADQUISICIÓN DE DATOS» conduce a una pantalla similar a la que se presenta en la Figura III.3, en la que se tiene una representación gráfica de una tabla de los datos señal-tiempo (s). Durante los períodos de adquisición de datos, los datos se almacenan en una memoria de entrada/salida, cuyo contenido es posteriormente copiado en una matriz por el programa.

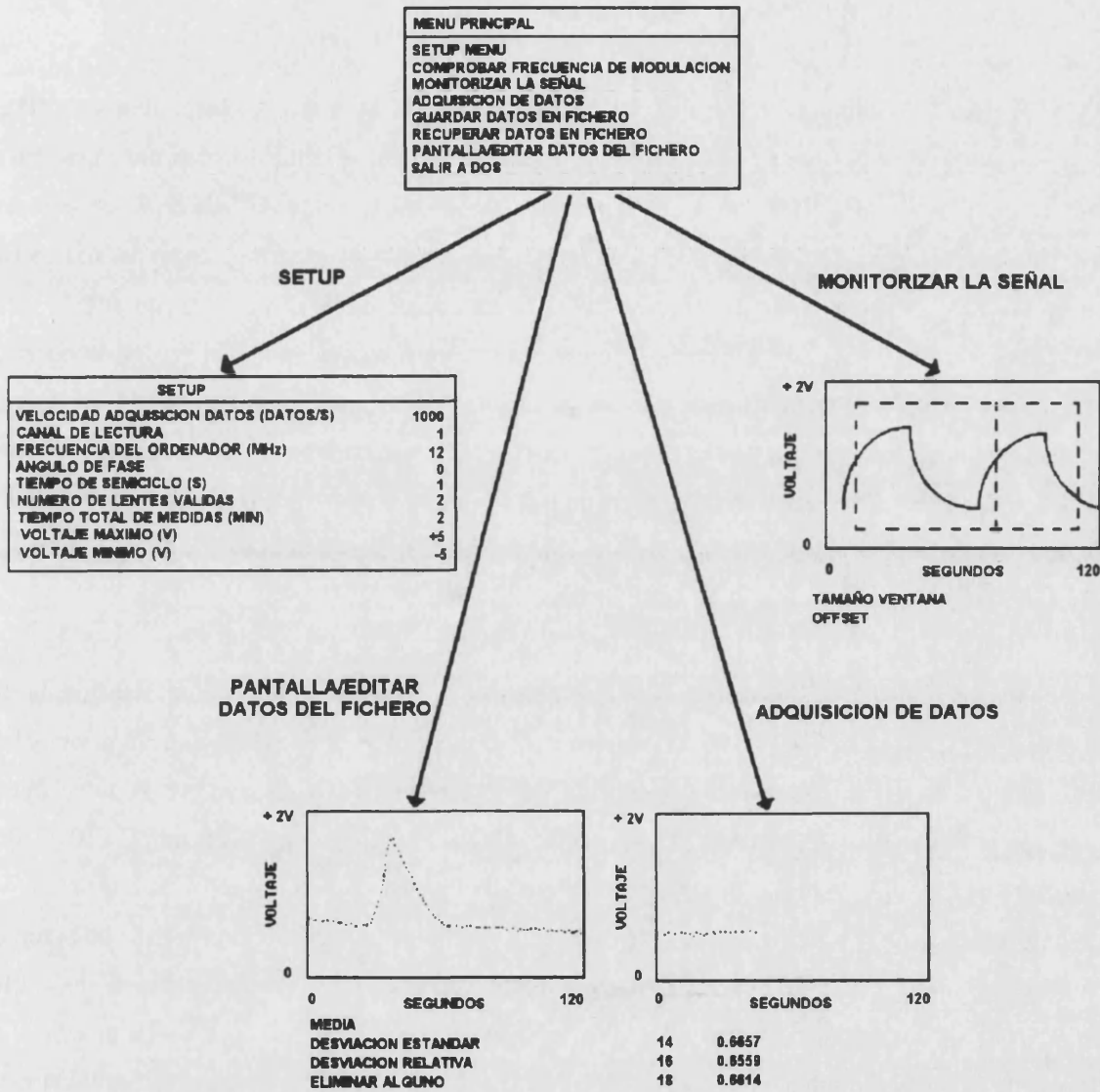


Figura III.3.- Ventanas del programa AUTOTLS asequibles al usuario.

b) Espectrómetros de lente térmica contruidos en el LESP

Para la realización de las medidas de las oscilaciones de lente térmica (capítulos V y VI) en el *Laboratoire d'Energétique des Systèmes et Procédés* en Rouen, se utilizaron dos montajes. En el primero de ellos (Figura III.4), se empleó para el bombeo un láser de Ar⁺ de 5 W de potencia (Spectra-Physics, modelo 164), que trabaja en modo TEM₀₀ a 514,5 nm. La potencia del haz se fijó con un medidor de potencia (Scientech, modelo 372). La utilización de dos prismas de ángulo recto (b) (Microcontrole, Evry Cedex, Francia), montados sobre unos soportes con tres grados de libertad, permitió la obtención de un haz paralelo al haz de salida, y de un montaje más compacto (el láser se encontraba a una altura distinta que el resto del montaje). El haz láser se enfocó mediante una lente (c) (Microcontrole), en el interior de la celda de 0,5 cm de paso óptico (d) (Hellma), cuya posición se controlaba mediante un microposicionador, que permitía variar la distancia d entre el haz y la superficie libre del líquido, con una precisión de $\pm 0,01$ mm.

Para la visualización de los «latidos ópticos», se utilizó una pantalla translúcida (e) (Microcontrole, Marata 85-85, S390 023), colocada 4 cm detrás de la celda. La función principal de esta pantalla, aparte de permitir la observación del fenómeno, era la de suavizar la señal óptica recogida por el fotodiodo (f) (Hamamatsu Photonics, Massy, Francia, serie S1227, modelo 1010 BR). El área de trabajo del fotodiodo es pequeña respecto a la imagen proyectada de la lente térmica (4-5 cm²). En ausencia de la pantalla, el detector mediría la intensidad en una porción limitada de la región iluminada y la señal contendría numerosos armónicos, relacionados con el movimiento de los anillos externos, producidos fundamentalmente por un fenómeno de interferencias ópticas. La presencia de la pantalla permite medir la modulación global, relacionada con las oscilaciones hidrodinámicas producidas en el seno de la muestra. Todos los elementos ópticos estaban fijos en un soporte óptico estable.

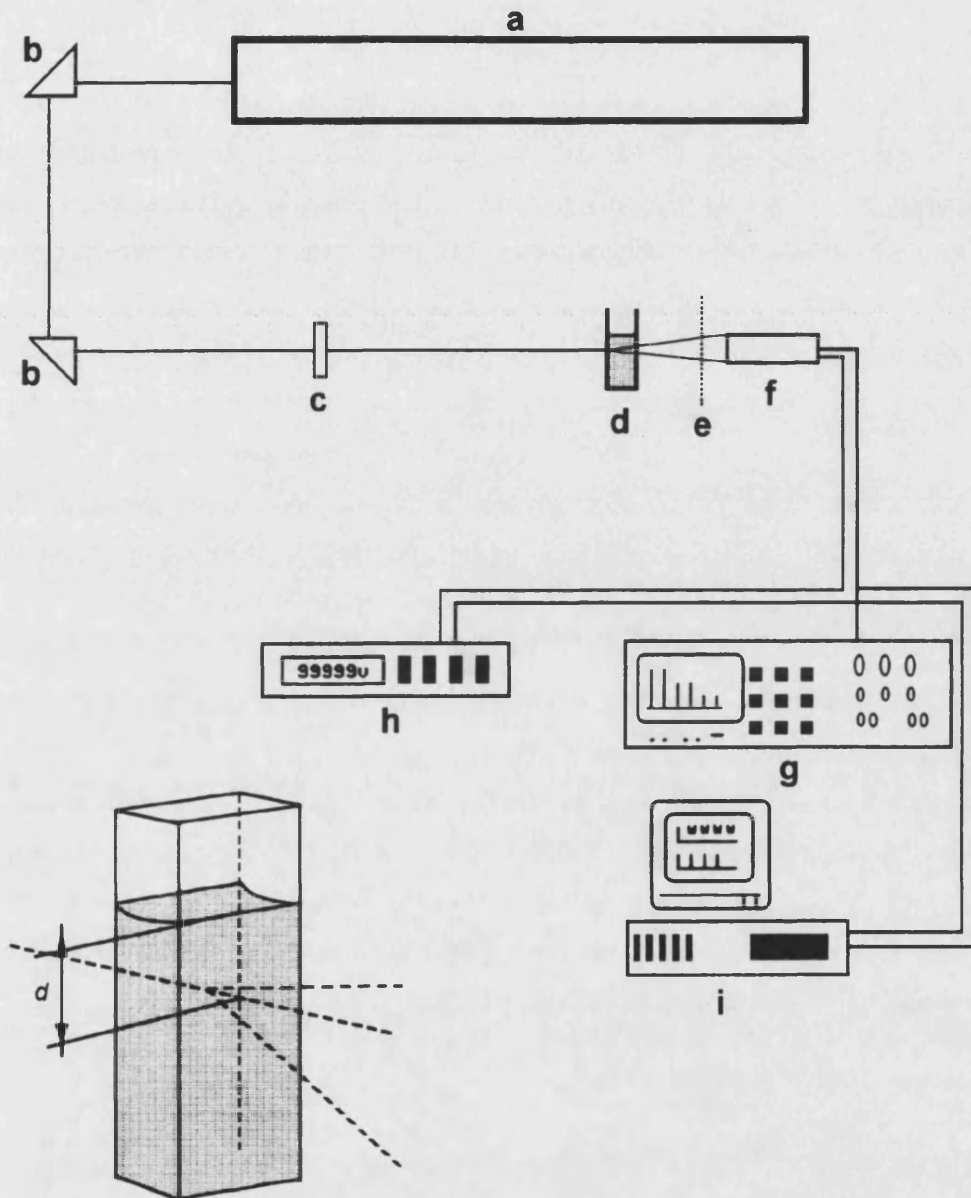


Figura III.4. - Esquema del espectrómetro de lente térmica construido en el LESP: (a) láser de Ar^+ ; (b) prismas de ángulos rectos; (c) lente; (d) celda; (e) pantalla translúcida; (f) fotodiodo; (g) analizador de espectros; (h) amplificador; (i) ordenador.

La señal del fotodiodo se envió a un analizador de espectros de transformadas rápida de Fourier (FFT) (Hewlett-Packard, modelo 2582A), que calculaba y mostraba en pantalla directamente la raíz cuadrada de la señal del espectro de potencia. Los espectros obtenidos en presencia de la pantalla translúcida son mucho más simples que los obtenidos sin ella, y revelan las características más esenciales del fenómeno.

La señal del fotodiodo era también enviada a un amplificador (construido por el grupo de investigación del LESP), que permitía amplificar la señal antes de ser transmitida al ordenador (SUN, Velizy-Villacoublay, Francia) mediante una tarjeta de adquisición de datos (Nextech, Maxeville, Francia, modelo AISC 1612). La utilización de un programa de ordenador permitió visualizar directamente la señal temporal y almacenar los datos para tratarlos posteriormente.

También se construyó en el LESP un montaje similar al utilizado en el Departamento de Química Analítica de la Universitat de València (Figura III.5). Para ello, se introdujo en el espectrómetro anterior un láser de He-Ne de 10 mW (Spectra-Physics), como haz de prueba, que se enfocó en la celda mediante una lente, y un modulador de haz (Eg & G, Evry Cedex, Francia, modelo 9479), para modular el haz de bombeo. Los dos haces se hicieron coaxiales en el interior de la celda mediante un divisor de haz de 8 μm de espesor y transmisión del 92% (Microcontrole). Se utilizó el mismo sistema de detección que en el caso anterior.

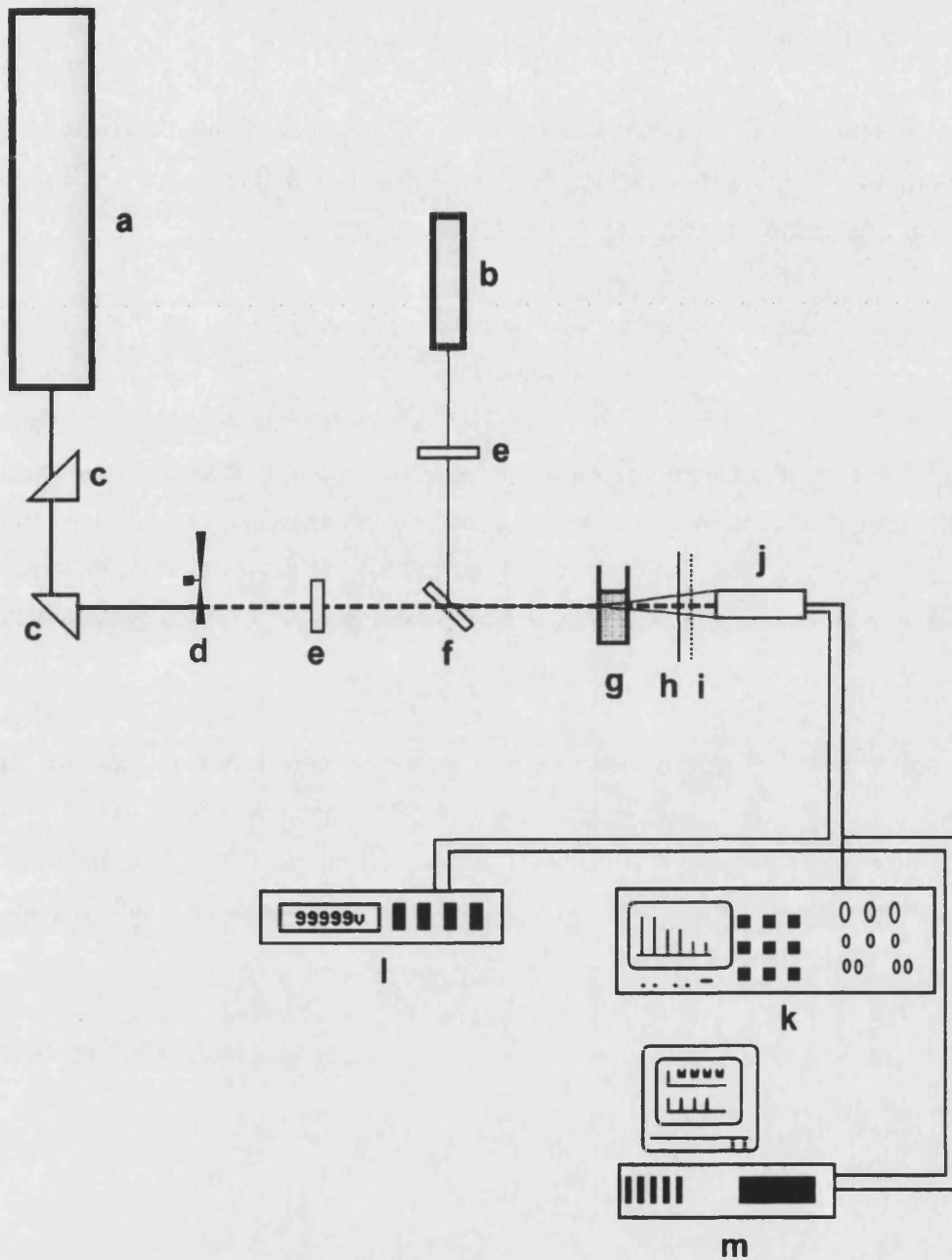


Figura III.5.- Esquema del espectrómetro de lente térmica del LESP modificado: (a) láser de Ar^+ ; (b) láser de He-Ne; (c) prismas de ángulos rectos; (d) modulador de haz; (e) lentes; (f) divisor de haz; (g) celda; (h) filtro; (i) pantalla translúcida; (j) fotodiodo; (k) analizador de espectros; (l) amplificador; (m) ordenador.

III.2.- Otra instrumentación utilizada

Para la obtención de los espectros de absorción y las medidas de absorbancia, se utilizó un espectrofotómetro de fila de diodos Hewlett-Packard, modelo 8452A (Palo Alto, CA, E.E.U.U.), provisto de un ordenador Xaloc 486, para la adquisición de datos.

Para la determinación de clenbuterol mediante cromatografía líquida micelar, presentada en el capítulo X, se utilizaron dos cromatógrafos Hewlett-Packard HP 1050, equipados con bombas isocráticas, detectores UV-visible e integradores HP 3396A, únicamente diferentes en el sistema de inyección: uno de ellos utilizaba un inyector automático, y en el otro la inyección era manual. Los cromatógrafos adquirían los datos a través del integrador y los transferían a un ordenador a través de su puerto en serie, empleando los protocolos de intercambio del programa Peak-96, creado por Hewlett-Packard (Avondale, Pennsylvania, EE.UU.). El tratamiento de los datos cromatográficos se realizó con el programa MICHROM [104].

Cuando se utilizó el espectrómetro de lente térmica como detector, la celda de 8 μl del cromatógrafo se montó sobre el soporte del montaje descrito anteriormente (Fig III.1, j), teniendo especial cuidado en hacer los haces coaxiales en el interior de la misma. Para realizar las inyecciones se utilizó una válvula Rheodyne (Cotati, CA, E.E.U.U.), con un bucle de 20 ó 100 μl , y los datos se tomaron con el programa AUTOTLS.

En el capítulo X se hizo uso de una estación para extracción a vacío Vac Elut SPS 24 (Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA, E.E.U.U.).

**IV.- EFECTO DE LA NATURALEZA DEL DISOLVENTE SOBRE LOS
LÍMITES DE DETECCIÓN EN ESPECTROMETRÍA DE LENTE
TÉRMICA**

IV.- EFECTO DE LA NATURALEZA DEL DISOLVENTE SOBRE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN EN ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA

IV.1.- Introducción

Como se ha comentado, en espectrometría de lente térmica se alcanzan las sensibilidades más altas en aquellos disolventes que presentan buenas propiedades termoópticas, es decir, en disolventes con valores altos de la relación $|dn/dT|/\kappa$. Sin embargo, en un procedimiento analítico, el límite de detección (LD) depende de la relación señal-ruido, S/σ , y no sólo de la sensibilidad. El LD se define habitualmente como la concentración de analito que proporciona un valor de la señal $S_{bl} + 3\sigma_{bl}$, donde S_{bl} y σ_{bl} son la señal del blanco y el ruido asociado a ésta (tomado como el valor absoluto de la desviación estándar), respectivamente. Por lo tanto, para seleccionar un disolvente en ELT, se debe considerar además del cociente $|dn/dT|/\kappa$, las características de ruido del disolvente, ya que el LD depende de σ_{bl} y no sólo de la sensibilidad.

Cuando se utilizan láseres de estabilidad adecuada, la fuente predominante de ruido en ELT en muestras líquidas es la convección térmica producida en el seno de la disolución [28,29]. La convección térmica produce cambios locales del índice de refracción, que originan a su vez deformaciones en el perfil del haz de prueba y cambios en su dirección de propagación. El ruido convectivo se halla siempre presente en las medidas de ELT y, como se muestra a continuación, aumenta linealmente con la señal de ELT. Por lo tanto, en la selección de un disolvente, debe considerarse también el valor esperado de S_{bl} , que puede ser superior a la señal proporcionada por el disolvente puro, S_0 .

Todas las especies químicas presentes en la disolución del blanco, incluyendo el disolvente, la matriz de la muestra, los reactivos y las impurezas, contribuyen a la señal y, por lo tanto, también al ruido convectivo. Las contribuciones a la señal a lo largo de la región UV-visible se deben a la presencia de especies con bandas electrónicas de absorción, a una distancia relativamente pequeña de la longitud de onda de la radiación de bombeo, y a los sobretonos de orden alto de las transiciones vibracionales del disolvente. Estos últimos no son despreciables en ELT. El tetracloruro de carbono,

que posee unas excelentes propiedades termoópticas, es también un disolvente extremadamente transparente, ya que presenta sobretonos vibracionales de orden muy alto y, por lo tanto, también de muy baja intensidad, en la región UV-visible.

A continuación, se presenta un estudio del ruido en función de la señal de ELT, para diversos disolventes, así como de la influencia de diferentes factores sobre el LD. Es necesaria una mejor comprensión de todos estos factores para el desarrollo de la ELT como una herramienta analítica de rutina. En este capítulo, se proponen criterios para la selección del disolvente que proporciona un mejor LD, cuando S_{bl} es similar a S_0 , o cuando es mucho mayor que S_0 . En ocasiones, la composición del disolvente no puede ser alterada. En muchos otros casos, puede añadirse a las disoluciones acuosas un alcohol miscible o acetona, para aumentar la sensibilidad, o los analitos pueden ser extraídos en diversos disolventes orgánicos. Diferentes mezclas de disolventes poseen la misma fuerza eluyente y son prácticamente equivalentes en cromatografía líquida y, por lo tanto, debe seleccionarse la mezcla que proporcione los mejores LDs para la detección en ELT.

IV.2.- Parte experimental

a) Instrumentación y reactivos

Se empleó el instrumento de lente térmica construido en este Departamento, y que fue descrito en el capítulo III. Se hizo uso de una celda estándar de cuarzo de 5 ml, una celda de flujo de 18 μ l (Hellma, Müllheim-Baden, Alemania) y una celda de HPLC de 8 μ l (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, E.E.U.U.), todas ellas de 1 cm de paso óptico. También se utilizó una bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson, Middleton, WI, E.E.U.U.) y tubos de PTFE de 0,8 mm de diámetro interno.

Se utilizaron los siguientes disolventes de grado HPLC: acetona, metanol, etanol, *n*-butanol, cloroformo y tetracloruro de carbono (Panreac, Barcelona); y los disolventes de grado analítico: *n*-pentanol (Merck, Darmstadt, Alemania), *n*-propanol y cloroformo (Panreac).

Se prepararon las siguientes disoluciones madre: $K_2Cr_2O_7$ (Panreac) $1,2 \times 10^{-3}$ M en agua, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Panreac) 5×10^{-2} M en agua, rojo de metilo (Scharlau, Barcelona) $4,5 \times 10^{-6}$ M en agua, metanol, etanol, *n*-butanol, *n*-pentanol y acetona; negro de eriocromo T (NET) (Probus, Barcelona) 2×10^{-6} M en metanol, etanol y *n*-pentanol; 1-(2'-piridilazo)-2-naftol (PAN) (Scharlau) 6×10^{-6} M en metanol, etanol, *n*-pentanol, cloroformo y tetracloruro de carbono, y iodo resublimado $2,9 \times 10^{-6}$ M (D'Hemio, Madrid) en cloroformo y tetracloruro de carbono. Todos los reactivos fueron de grado analítico, excepto el iodo, que era puro. Se hicieron diluciones de las disoluciones madre en los mismos disolventes. Se utilizó siempre agua desionizada ultrapura (desionizador Barnstead, Sybron, Boston, MA, E.E.U.U.).

b) Procedimientos

Las experiencias se realizaron en una habitación interior cerrada, que mantenía la temperatura casi constante a $22^\circ C$. En esta habitación se hallaba instalado el espectrómetro de lente térmica. Para conseguir el equilibrio térmico con el ambiente, se introdujeron las disoluciones en la habitación, al menos 30 min antes de realizar las medidas. Además, las celdas se mantuvieron cerradas durante varios minutos, antes y durante las medidas.

Salvo cuando se indique lo contrario, el procedimiento experimental utilizado para la medida de la señal de ELT y su ruido asociado fue el siguiente: se introdujo aproximadamente 3 ml de la disolución de prueba en la celda de 5 ml, se realizaron 30 medidas, calculándose el valor medio de la señal y su desviación estándar. Esta operación se repitió de tres a cinco veces, renovándose cada vez el líquido de la cubeta para cada serie de 30 medidas. Finalmente, se obtuvo la media de las señales de lente térmica, S , y su correspondiente desviación estándar, σ .

Los valores obtenidos en ausencia de especies absorbentes distintas del disolvente, $S_0 \pm \sigma_0$, se compararon con los datos obtenidos para los mismos disolventes, en presencia de concentraciones crecientes de diversos colorantes orgánicos e inorgánicos, $S \pm \sigma$. Sólo se realizaron comparaciones entre los valores obtenidos en la misma sesión de trabajo. Se representaron los valores de σ frente a los correspondientes valores de $(S - S_0)$, a concentraciones crecientes del compuesto absorbente,

aplicándose a los datos experimentales análisis de regresión por mínimos cuadrados. La ordenada en el origen de la curva ajustada, σ_0^* , se consideró como el valor más fiable del ruido asociado a S_0 .

Las curvas de calibrado se obtuvieron para los siguientes intervalos de concentración de rojo de metilo:

- 2,2x10⁻⁸ - 6,7x10⁻⁸ M en agua
- 2,4x10⁻⁷ - 1,5x10⁻⁶ M en metanol
- 3,0x10⁻⁷ - 1,5x10⁻⁶ M en etanol
- 1,9x10⁻⁷ - 1,3x10⁻⁶ M en *n*-butanol
- 1,6x10⁻⁸ - 6,6x10⁻⁸ M en *n*-pentanol
- 3,6x10⁻⁸ - 2,4x10⁻⁷ M en acetona
- 8,2x10⁻⁸ - 2,0x10⁻⁷ M en mezclas agua-glicerina

Para el 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), los intervalos de concentración fueron:

- 1,9x10⁻⁸ - 3,5x10⁻⁷ M en metanol
- 4,3x10⁻⁸ - 4,6x10⁻⁷ M en etanol
- 4,3x10⁻⁸ - 2,2x10⁻⁷ M en cloroformo
- 4,1x10⁻⁸ - 2,5x10⁻⁷ M en tetracloruro de carbono

para el negro de eriocromo T (NET):

- 5,0x10⁻⁹ - 9,5x10⁻⁸ M en metanol
- 1,3x10⁻⁸ - 1,4x10⁻⁷ M en etanol

y para iodo:

- 1,4x10⁻⁷ - 8,5x10⁻⁷ M en cloroformo
- 1,3x10⁻⁷ - 7,2x10⁻⁷ M en tetracloruro de carbono

IV.3.- Resultados y discusión

a) Relación entre la señal y el ruido en ELT

En todos los casos, al representar los valores de σ frente a $(S - S_0)$, para concentraciones crecientes del compuesto absorbente, se obtuvieron líneas rectas (Figuras IV.1 y IV.2). La ecuación de las rectas es:

$$\sigma = \sigma_0^* + k(S - S_0) \tag{IV.1}$$

En la Tabla IV.1 se muestran los valores de σ_0^* y k , obtenidos con diversos colorantes, para una serie de disolventes puros y mezclas de disolventes. De la Figura IV.2, se deduce que σ_0^* y k dependen más de la naturaleza del disolvente que de la naturaleza de las especies absorbentes.

El valor de σ_0^* depende de las contribuciones instrumentales y de convección térmica. En cambio, es razonable suponer que el aumento lineal del ruido, que se produce cuando la señal aumenta, es debido principalmente al aumento en la convección térmica, más que a causas instrumentales. Una evidencia de ello es la gran diferencia entre los valores de k obtenidos en algunos casos para distintos disolventes, para el mismo intervalo de valores de la señal de ELT, y dentro de la misma sesión de trabajo.

A partir de la ecuación IV.1, la relación señal-ruido puede expresarse como una función de la señal de la forma:

$$\frac{S}{\sigma} = \frac{1}{\frac{\sigma_0^* - k S_0}{S} + k} \tag{IV.2}$$

que indica que cuando la señal aumenta, la relación señal-ruido se aproxima asintóticamente a $1/k$. Por lo tanto, en ELT, el ruido convectivo limita seriamente la relación señal-ruido que puede alcanzarse con un determinado disolvente. En la Figura IV.3 se representa la variación de S/σ , a valores crecientes de la señal, para distintas especies absorbentes en distintos disolventes. Los datos concuerdan con la forma de las curvas predichas por la ecuación IV.2.

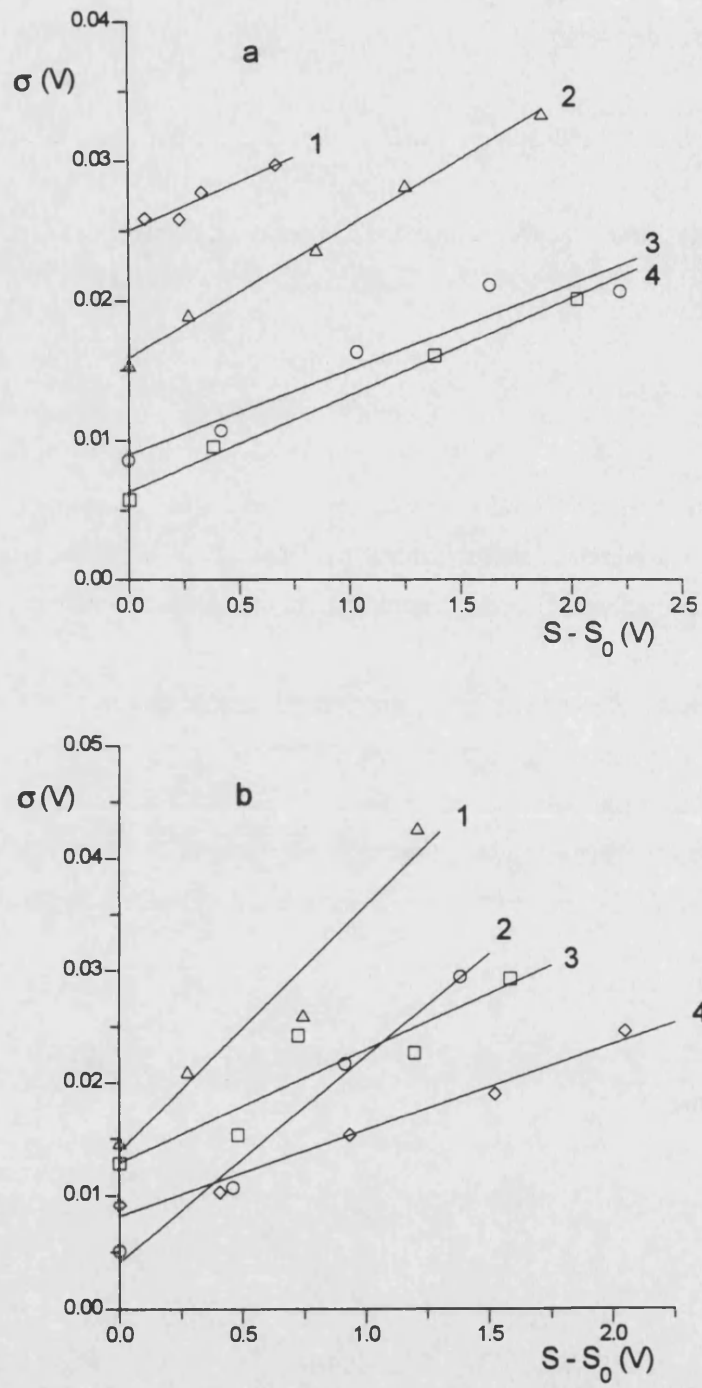


Figura IV.1.- Dependencia del ruido con la señal para concentraciones crecientes de un compuesto absorbente en diferentes disolventes. Parte a, rojo de metilo en: (1) *n*-pentanol; (2) *n*-butanol; (3) metanol; (4) etanol. Parte b: (1) acetona (rojo de metilo); (2) tetracoloruro de carbono (PAN); (3) cloroformo (PAN); (4) agua (dicromato potásico).

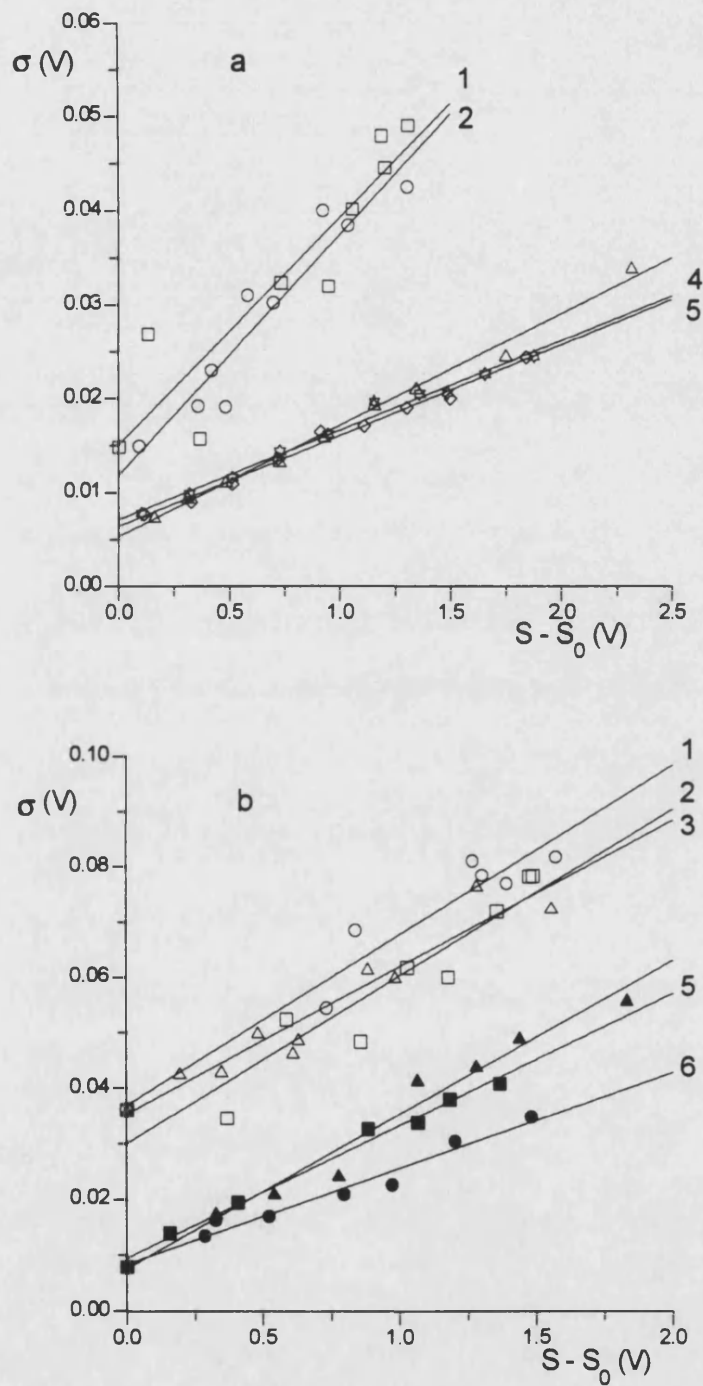


Figura IV.2.- Variación del ruido con la señal para concentraciones crecientes de varios compuestos absorbentes en el mismo disolvente. Parte a: (1) PAN y (2) NET en metanol, (3) dicromato potásico, (4) rojo de metilo y (5) cobalto(II) en agua. Parte b: (1) rojo de metilo, (2) PAN y (3) NET en *n*-pentanol, (4) PAN, (5) NET y (6) rojo de metilo en etanol.

Efecto del disolvente sobre el límite de detección

Tabla IV.1. - Valores de S_0 , σ_0^* y k obtenidos en distintos días para diferentes disolventes y compuestos absorbentes.

Compuesto	Disolvente	Día	$S_0 \pm \sigma_0$ (mV)	σ_0^* (mV)	$k \times 10^3$	r^c
K ₂ Cr ₂ O ₇	Agua	1	100 ± 1	4,9 ± 0,9	8,4 ± 0,6	0,995
		2	104 ± 2	3,2 ± 0,7	9,0 ± 0,5	0,997
		3	89 ± 2	3,8 ± 1,9	10,4 ± 1,3	0,98
		7	103 ± 5	4,6 ± 0,4	9,7 ± 0,3	0,96
		8	98 ± 4	2,7 ± 1,0	9,6 ± 0,7	0,995
		9	117 ± 3	3,0 ± 0,7	7,3 ± 0,6	0,994
		10	112 ± 2	2,7 ± 0,9	5,8 ± 0,7	0,98
		13	101 ± 5	4,9 ± 1,4	8,0 ± 2,0	0,97
		13 ^a	126 ± 4	3,9 ± 0,5	3,8 ± 0,7	0,96
		13 ^b	83 ± 4	3,9 ± 0,3	4,7 ± 0,5	0,99
		Rojo de metilo	Agua	11	96 ± 3	5,9 ± 1,5
12	117 ± 3			-	-	-
Rojo de metilo	Acetona	1	174 ± 7	10,0 ± 3,0	22,0 ± 4,0	0,97
Rojo de metilo	Metanol	2	231 ± 8	5,4 ± 1,1	16,9 ± 0,9	0,997
		3	233 ± 20	8,9 ± 1,2	14,0 ± 0,7	0,997
		4	226 ± 6	6,7 ± 1,3	5,8 ± 0,9	0,93
		7	272 ± 3	8,5 ± 0,3	17,9 ± 0,7	0,98
Rojo de metilo	Etanol	4	223 ± 5	5,1 ± 0,1	6,4 ± 0,1	0,999
		13	214 ± 7	7,5 ± 0,3	13,1 ± 0,5	0,999
		13 ^a	-	7,0 ± 1,4	8,0 ± 2,0	0,97
		13 ^b	228 ± 9	9,8 ± 1,4	8,8 ± 1,4	0,96
Rojo de metilo	<i>n</i> -Butanol	2	231 ± 1	9,5 ± 4,0	14,9 ± 3,0	0,96
		3	228 ± 7	18,4 ± 0,6	15,8 ± 0,6	0,999
		4	237 ± 4	11,5 ± 0,5	9,1 ± 0,4	0,998
Rojo de metilo	<i>n</i> -Pentanol	4	356 ± 10	17,7 ± 0,6	6,7 ± 1,5	0,96
Rojo de metilo	Agua-glicerina 1:1	11	588 ± 20	26,0 ± 1,3	13,5 ± 1,5	0,994
Rojo de metilo	Agua-glicerina 1:3	11	633 ± 50	36,3 ± 2,0	83,7 ± 4,0	0,999
Rojo de metilo	Agua-metanol 1:4	12	235 ± 5	-	-	-
Rojo de metilo	Agua-propanol 1:4	12	232 ± 6	-	-	-
PAN	Tetracloruro de carbono	5	187 ± 10	2,8 ± 2,0	18,0 ± 2,0	0,994
		6	209 ± 10	3,4 ± 2,0	18,2 ± 3,0	0,98
PAN	Cloroformo	5	272 ± 16	9,2 ± 5,0	10,0 ± 4,0	0,855
		6	301 ± 15	9,0 ± 1,3	14,3 ± 1,3	0,990

^a Datos obtenidos con la celda de 18 μ l.

^b Datos obtenidos con la celda de 8 μ l.

^c Coeficiente de correlación de la regresión lineal, 5-10 puntos.

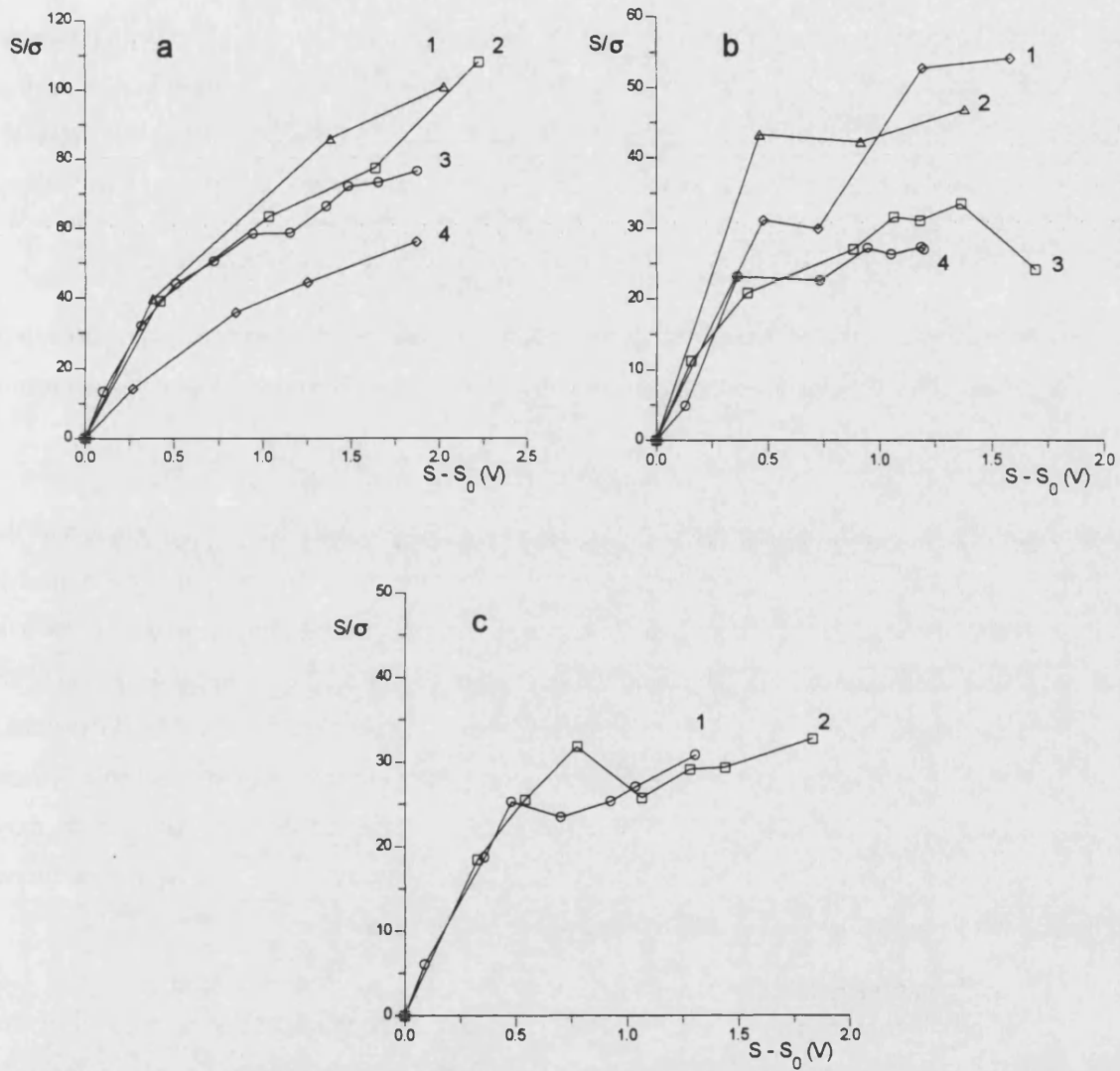


Figura IV.3.- Relación señal-ruido en función del valor de la señal: Parte a, rojo de metilo en: (1) etanol, (2) metanol, (3) agua, (4) *n*-butanol. Parte b, PAN en: (1) cloroformo, (2) tetracloruro de carbono, (3) etanol, (4) metanol. Parte c, NET en: (1) metanol, (2) etanol.

b) Correlación entre σ_0^* , k y la naturaleza del disolvente

En la Tabla IV.2 se muestran valores medios de S_0 , σ_0^* y k , junto con algunas propiedades físicas de los disolventes. Los valores de S_0 y σ_0^* deben depender de la absorptividad molar del disolvente, y el ruido instrumental debe también contribuir al valor de σ_0^* . El disolvente que presentó el menor ruido, en ausencia de una especie absorbente, fue el tetracloruro de carbono. Los valores de S_0 , σ_0 y σ_0^* crecieron en el orden:

$$\text{agua} < \text{metanol} \approx \text{etanol} < n\text{-butanol} < n\text{-pentanol}$$

Los valores de estos parámetros también se incrementaron para mezclas agua-metanol, agua-propanol y agua-glicerina, cuando aumentó la cantidad de alcohol en la mezcla. Esto concuerda con el aumento esperado en la absorptividad molar de los disolventes.

En la Tabla IV.2 se intenta correlacionar k con algunas propiedades físicas y mecánicas de los disolventes. Puesto que k ha sido definida como el incremento del ruido dividido por el aumento de la señal de ELT (ecuación IV.1), y no dividida por el aumento de la absorbancia, ésta no debería depender del cociente $|dn/dT|/\kappa$. La convección se produce debido a las diferencias de densidad en un campo gravitatorio, por lo que k debería aumentar cuando el coeficiente térmico de la densidad, $d\rho/dT$, aumente. Puesto que las diferencias de temperatura generadas por el efecto de lente térmica son muy pequeñas, del orden de 0,1 K [12], el gradiente de densidad debe ser también de muy pequeño valor. Sin embargo, se pudo observar visualmente, con ayuda de una lupa, una fuerte corriente convectiva, al añadir a las disoluciones partículas en suspensión.

Otras propiedades físicas se hallan también correlacionadas con $d\rho/dT$ y k , lo que dificulta la interpretación de los resultados. Así, por ejemplo, la convección está controlada por la viscosidad, η , y por lo tanto, la velocidad de la corriente convectiva que cruza el gradiente térmico debe disminuir al aumentar la viscosidad. Debido al pequeño gradiente térmico, el gradiente de viscosidad también debe ser muy reducido. Sin embargo, puesto que el coeficiente $d\eta/dT$ es mayor que el coeficiente $d\rho/dT$, y la convección es producida por este último, lo más probable es que los efectos que produzca el gradiente de viscosidad sobre la convección sean importantes.

Tabla IV.2. - Valores medios de S_0 , σ_0^* y k , y algunas propiedades termoópticas y mecánicas de los disolventes^a.

Disolvente	S_0 (mV)	σ_0 (mV)	$k \times 10^3$	n	$-dn/dT \times 10^4$ ($^{\circ}\text{C}^{-1}$)	$(-dn/dT)/\kappa$ (cm mW^{-1})	η (cP)	$(-d\eta/dT) \times 10^3$ ($\text{cP } ^{\circ}\text{C}^{-1}$)	ρ (g ml^{-1})	$(-d\rho/dT) \times 10^3$ ($\text{g ml}^{-1} ^{\circ}\text{C}^{-1}$)
Agua	102	3,9	9,2	1,334	0,81	0,136	0,89	20	1,00	0,28
Metanol	241	7,4	13,7	1,342	3,94	1,950	0,55	8,7	0,81	0,93
Etanol	-	6,3	9,8	1,359	4,0	2,395	1,10	20	0,79	0,86
<i>n</i> -Butanol	232	13,1	13,3	1,397	-	-	2,62	65	0,82	0,70
<i>n</i> -Pentanol	-	-	-	1,408	-	-	3,54	110	0,80	0,70
Glicerina	-	-	-	1,474	-	-	954	86000	1,27	0,55
Acetona	-	-	-	1,357	5,42	2,853	0,136	2,8	0,81	1,11
Cloroformo	287	9,1	12,2	1,444	6,03	5,154	0,54	6,6	1,53	1,86
Tetracloruro de carbono	198	3,1	18,1	1,459	6,12	5,942	0,91	13	1,63	1,91

^a Datos obtenidos a 25°C; $-dn/dT$ y κ fueron tomados de la ref. [12]; $-d\rho/dT$ de la ref. [105]; los otros datos de la ref. [106].

La corriente convectiva es más intensa en la región central del gradiente térmico, donde la temperatura es mayor y la viscosidad menor que en los alrededores. El valor absoluto del coeficiente térmico de la viscosidad aumenta con la viscosidad del disolvente. Por lo tanto, en un disolvente viscoso la velocidad de la corriente convectiva, en la zona central del gradiente, puede ser mucho mayor que en los alrededores. Ello puede producir que las turbulencias sean también mayores que en un disolvente menos viscoso. En este caso, los efectos asociados a η y $d\eta/dT$ estarían inversamente correlacionados, mientras que estos parámetros físicos de los disolventes se hallan directamente correlacionados entre sí, lo que podría compensar parcialmente o anular su posible influencia sobre k .

c) Influencia de distintas variables experimentales sobre σ_0^* y k

Se utilizaron disoluciones acuosas de dicromato potásico, para estudiar la influencia del alineamiento óptico de los láseres de bombeo y de prueba sobre σ_0^* y k . Los haces se hicieron coaxiales en la región de la celda, y se realizó un ajuste más fino hasta obtener a la entrada del detector una imagen casi perfectamente simétrica. Posteriormente, se desplazó el haz de bombeo horizontal y verticalmente, con respecto a su posición normal, tomándose en cada punto a lo largo de ambos barridos, una serie de valores de la señal de lente térmica. Se observó que el ruido aumentó ligeramente, cuando el haz de bombeo no era perfectamente coaxial con el haz de prueba.

Se estudió también la influencia del volumen y de la forma de la celda de medida. Las celdas de flujo de 18 μl y 8 μl se llenaron utilizando una bomba peristáltica, deteniéndose la bomba al menos 30 s antes de tomar las medidas. En la Tabla IV.1 se muestran los resultados obtenidos con disoluciones acuosas de dicromato potásico y con disoluciones de rojo de metilo en etanol. Los valores de σ_0^* obtenidos con las celdas de flujo fueron similares a los obtenidos con la celda de 5 ml, mientras que los valores de k se redujeron en un 35-50% con las celdas de 18 y 8 μl . Por lo tanto, la restricción de espacio físico impuesta por el estrecho canal de estas celdas, resultó ser efectivo en disminuir el ritmo de aumento del ruido convectivo con el incremento de la señal.

Se obtuvo un valor de σ_0 muy elevado cuando se empleó cloroformo de grado analítico ($\sigma_0 = 350$ mV). Se supuso que el elevado ruido era debido a la presencia de partículas en la disolución. Después de hacer pasar las disoluciones por un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, se redujo el valor de σ_0 a $10,6 \pm 0,7$ mV. Cuando se utilizó, en su lugar, cloroformo de grado HPLC, el ruido fue similar antes y después de filtrar las disoluciones, con $\sigma_0 = 6 \pm 4$ y $9,0 \pm 0,9$ mV, respectivamente. Por lo tanto, se recomienda el uso de disolventes de grado HPLC. Si sólo se dispone de un disolvente de menor calidad, el ruido puede disminuirse mediante el filtrado previo de las disoluciones.

d) Reproducibilidad de σ_0^* y k

Se estudió la reproducibilidad de los valores de σ_0^* y k , utilizando disoluciones de dicromato potásico en agua, y de rojo de metilo en metanol y *n*-butanol, y realizando medidas de ELT en días distintos (ver Tabla IV.1). Parece razonable esperar que el correspondiente coeficiente de variación (CV) aumente al crecer los valores de los parámetros de ruido, σ_0^* y k . La reproducibilidad entre días de σ_0^* fue CV = 26, 22 y 35% para agua, metanol y *n*-butanol, respectivamente. De forma similar, la reproducibilidad entre días de k fue 18, 40 y 27%, respectivamente. A pesar de los elevados valores de CV, casi en todos los casos los valores de σ_0^* y k obtenidos en días diferentes mantuvieron el orden agua < metanol < *n*-butanol, y agua < metanol \approx *n*-butanol, respectivamente.

e) Dependencia del límite de detección con la absorbancia del blanco

Ambos parámetros σ_0^* y k pueden utilizarse para caracterizar disolventes, en términos de ruido convectivo, y para comprobar cómo el LD aumenta cuando la absorbancia del blanco se incrementa. Para un valor dado de la señal de la disolución del blanco, S_{bl} , el LD (en unidades de concentración) viene dado por:

$$LD = \frac{3\sigma_{bl}}{m\epsilon_a b} = \frac{3}{m\epsilon_a b} [\sigma_0^* + k (S_{bl} - S_0)] \quad (IV.3)$$

donde ϵ_a es la absortividad molar del analito, b es el camino óptico, y $(m \epsilon_a b)$ la sensibilidad. A partir de las ecuaciones II.3 y II.4 (ver capítulo II), se obtiene:

$$m = 0,52 \frac{2,303 P(-dn/dT)}{\lambda_{prueba} \kappa} \quad (IV.4)$$

donde se ha despreciado el término cuadrático. Si A_{bl} y A_0 son la absorbancia del blanco y del disolvente, respectivamente, se tiene que $(S_{bl} - S_0) = m (A_{bl} - A_0)$, y:

$$LD = \frac{3}{\epsilon_a b} \left[\frac{\sigma_0^*}{m} + k (A_{bl} - A_0) \right] \quad (IV.5)$$

Por lo tanto, cuando A_{bl} se incrementa, el LD aumenta con una pendiente que es proporcional a k y $1/\epsilon_a$, y que no depende de las propiedades termoópticas del medio. En la Figura IV.4 se muestra una representación de la ecuación IV.5, para distintos disolventes y valores crecientes de $(A_{bl} - A_0)$.

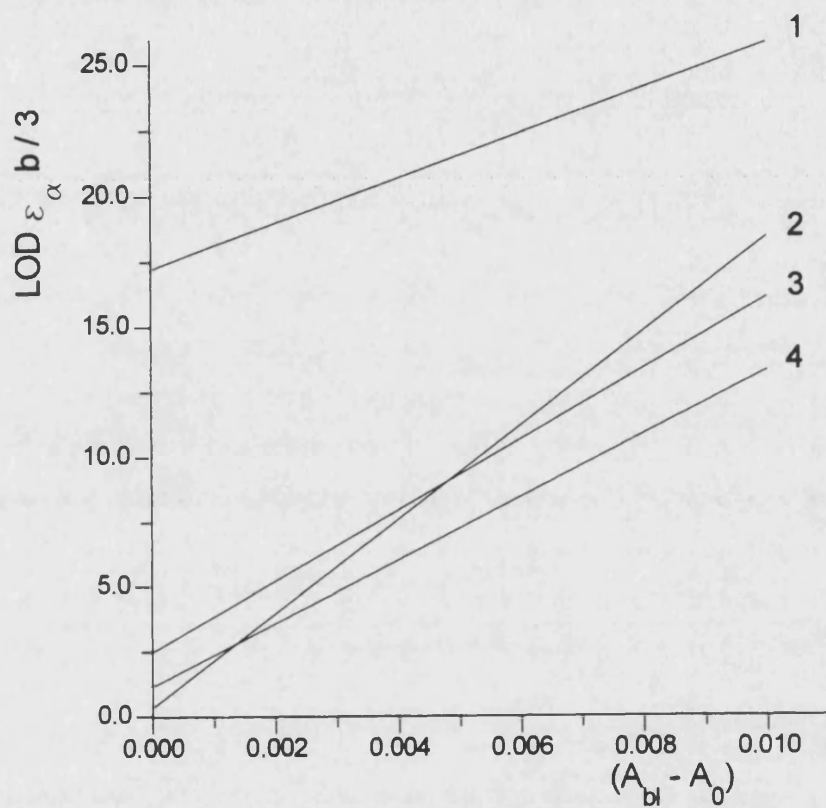


Figura IV.4.- Representación de la ecuación IV.5 para diversos disolventes, a valores crecientes de $(A_{bi} - A_0)$: (1) agua, (2) tetracloruro de carbono, (3) metanol, (4) cloroformo. Para calcular m , se utilizaron los valores de $P=100$ mW y $\lambda_{prueba}=633$ nm.

En ausencia de cualquier especie absorbente en la disolución del blanco, con excepción del mismo disolvente, que absorbe débilmente, el segundo término de las ecuaciones IV.3 y IV.5 es nulo, y los LD de los disolventes siguen el orden de los valores de $\left| \frac{dn}{dT} \right| / \kappa$, es decir:

tetracloruro de carbono < cloroformo < metanol < agua

Por el contrario, a valores altos de A_{bl} , el LD dependerá principalmente de k , más que de $\left| \frac{dn}{dT} \right| / \kappa$, con lo que un disolvente con un valor de k bajo puede ser mejor que otros disolventes con mejores propiedades termoópticas, pero con valores mayores de k .

En la bibliografía, el agua no es considerada como un buen disolvente en ELT, debido al bajo valor de su cociente $\left| \frac{dn}{dT} \right| / \kappa$, que da lugar a una baja sensibilidad, por lo que se ha recomendado el uso de mezclas agua-etanol y agua-acetona. Sin embargo, el agua presenta unos valores muy bajos de S_0 y σ_0^* , lo que compensa parcialmente sus malas propiedades termoópticas. El agua ofrece además un valor bajo del parámetro k , lo que reduce las diferencias entre el agua y otros disolventes de mejores propiedades termoópticas, para valores elevados de A_{bl} .

Por último, se estudió la influencia de la frecuencia de bombeo del haz de Ar^+ . La Figura IV.5 muestra las líneas rectas obtenidas al representar σ vs. $(S - S_0)$, para una serie de disoluciones de dicromato potásico bombeadas a una frecuencia de 4, 8 y 16 Hz. Al aumentar la frecuencia de bombeo, σ_0^* también se incrementó (5×10^{-3} para 4 Hz y 16×10^{-3} para 16 Hz), y k disminuyó (41×10^{-3} para 4 Hz y 14×10^{-3} para 16 Hz). Sin embargo, debido a la menor sensibilidad, el LD calculado a partir de la ecuación IV.3 aumentó en un factor de 6 y 16 veces para 8 y 16 Hz, respectivamente.

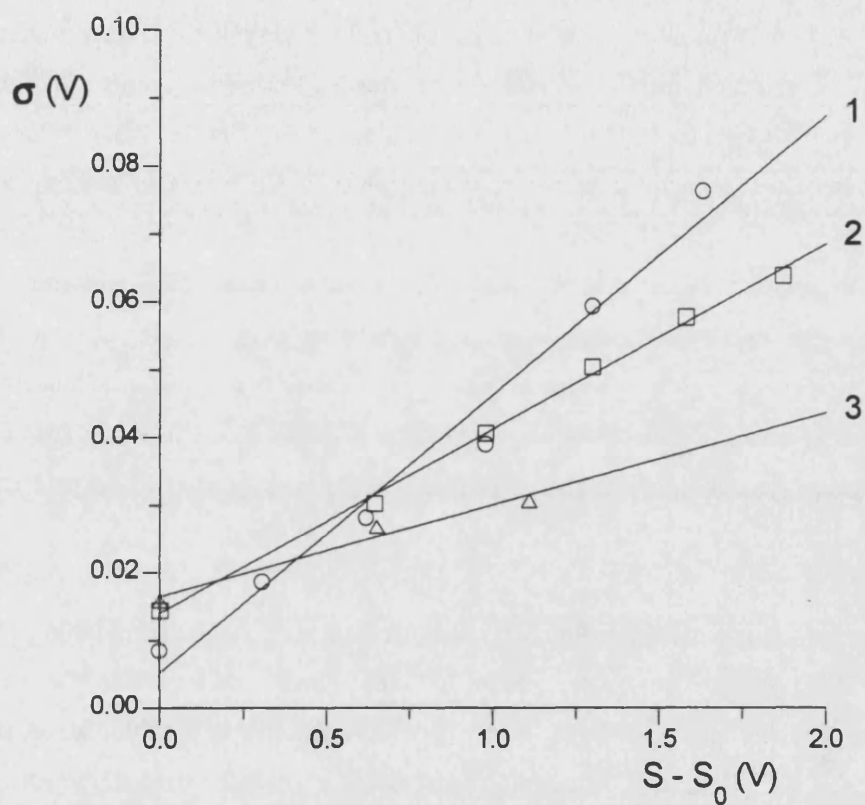


Figura IV.5.- Variación del ruido con la señal para concentraciones crecientes de dicromato potásico en agua, y a varias frecuencias de modulación del haz de bombeo: (1) 4 Hz, (2) 8 Hz, (3) 16 Hz.

f) Influencia de los reactivos derivatizantes sobre el límite de detección

En ELT, para reducir la absorbancia del blanco, las concentraciones de los reactivos derivatizantes y la de otros aditivos, tales como los tampones de pH, deben mantenerse lo más bajas posibles. Esto es particularmente importante para aquellos reactivos que presentan un máximo de absorción, a una distancia de 100 nm o menor de la longitud de onda de bombeo. Por esta razón, no debe sorprender que la mayoría de los procedimientos de ELT para la determinación de iones metálicos descritos en la bibliografía, utilicen ligandos incoloros, tales como el ácido etilendiaminotetracético [2] y la *o*-fenantrolina [97]. El uso de extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y la cromatografía líquida también pueden ser técnicas muy importantes para reducir la contribución de los componentes de la matriz y de los reactivos derivatizantes a la señal del blanco. Se recomienda el empleo de reactivos ultrapuros, procedimientos de extracción altamente selectivos y una limpieza cuidadosa del material de vidrio, especialmente cuando se determinan especies ampliamente difundidas en la naturaleza, como son los iones metálicos.

Cuando se utiliza derivatización, existen otros factores que no se consideran en las ecuaciones IV.3 y IV.5, y que pueden hacer que el LD sea mayor del esperado. Debido a las bajas concentraciones a las que se trabaja, la constante condicional de estabilidad de la reacción de derivatización, o el coeficiente de distribución de un procedimiento de extracción seleccionado, debería ser mucho mayor en ELT que en espectrofotometría. Además, la dilución de las disoluciones puede hacer que el cromóforo no se forme cuantitativamente. Estos factores producen una pérdida de sensibilidad, y el LD alcanzado será mucho mayor que el valor esperado.

Un aumento en la concentración del tampón y de otros aditivos puede también hacer disminuir la constante condicional de estabilidad, es decir, un ligando cromogénico muy diluido puede ser fácilmente desplazado por otro ligando más débil, presente en una concentración mucho mayor. Esta es otra de las razones por las que debe mantenerse tan baja como sea posible la concentración de los aditivos, incluyendo los tampones de pH.

En los procedimientos espectrofotométricos, cuando la constante condicional de estabilidad es demasiado baja, puede emplearse un gran exceso de reactivo derivatizante para desplazar la reacción cromogénica. Sin embargo, en ELT la aplicación de este procedimiento puede hacer el LD mucho mayor, particularmente si la absorptividad molar del reactivo derivatizante no es despreciable. Un ejemplo que hemos comprobado experimentalmente es la determinación de sulfito mediante la reacción con *p*-rosanilina. El reactivo absorbe la radiación de bombeo del Ar⁺, y cuando se reduce su concentración, la sensibilidad también se reduce debido a la menor relación molar [*p*-rosanilina]/[sulfito], y a la relativamente baja estabilidad del derivado. En todas las condiciones experimentales ensayadas, el LD obtenido en ELT fue similar o incluso mayor al obtenido en espectrofotometría.

En la determinación de cerio(IV) con 8-hidroxiquinolina, después de su extracción en cloroformo, la constante condicional de estabilidad y el coeficiente de distribución del procedimiento de extracción son elevados, sin embargo, el LD se ve condicionado por la falta de selectividad del procedimiento de extracción. Tanto el ligando, como los oxinatos de diversos metales, presentes como impurezas en los reactivos, contribuyeron a la señal del blanco, obteniéndose un LD de 30 ng ml⁻¹, el mismo valor que en espectrofotometría. Cuando el tampón se preparó con amoníaco de alta pureza, el LD disminuyó a 1 ng ml⁻¹ [71].

Un buen ejemplo de un procedimiento de ELT ventajoso desde el punto de vista del LD, es la determinación de cadmio(II) con ditizona, previa extracción en tetracloruro de carbono [92]. Tanto la constante condicional de estabilidad, como el coeficiente de distribución de la extracción, son muy altos. Además, el cadmio(II) es extraído en medio fuertemente alcalino, donde los ditizonatos de otros iones metálicos y el reactivo no se extraen. Por ello, el blanco presenta la misma señal de ELT que el disolvente. Finalmente, la absorptividad molar del complejo es muy elevada, y el disolvente tiene unas excelentes propiedades termoópticas. La combinación de todas estas condiciones favorables permitió la obtención de un LD extremadamente bajo, cercano a 0,008 ng ml⁻¹.

El desarrollo de procedimientos analíticos de ELT basados en reacciones redox de derivatización cromogénicas es muy atractivo, ya que la mayoría de las reacciones redox son altamente cuantitativas o irreversibles, y la posibilidad de encontrar interferencias, debido a las impurezas de los reactivos, es mucho menor que en la determinación de iones metálicos. Por esto, por ejemplo, se han obtenido LDs muy bajos en la determinación de catecolaminas en muestras de orina, previa separación mediante extracción en fase sólida con alúmina y oxidación a aminocromos [47]. También se han obtenido LDs muy bajos en la determinación de algunos diuréticos en orina mediante hidrólisis a arilaminas primarias, formación de los correspondientes azocolorantes y HPLC con detección de ELT [46].

V.- LAS OSCILACIONES DE LA LENTE TÉRMICA

V.- LAS OSCILACIONES DE LALENTE TÉRMICA

V.1.- Introducción

a) *Consideraciones generales sobre las oscilaciones de la lente térmica*

Bajo ciertas condiciones, cuando el haz láser se propaga horizontalmente a una distancia d , próxima a la superficie libre de un líquido, o verticalmente en sentido ascendente atravesando la superficie, la lente térmica puede pasar de la estabilidad a la inestabilidad, y exhibir varios comportamientos o estados dinámicos, dentro de la inestabilidad (oscilaciones periódicas, oscilaciones cuasiperiódicas, caos, ...). El fenómeno de las oscilaciones de lente térmica ha recibido el nombre de «latidos ópticos» de tipo 1 (*optical heart-beat 1*, HB1), cuando el haz se propaga horizontalmente, y latidos ópticos de tipo 2 (HB2), cuando se propaga verticalmente [107]. Los latidos ópticos pueden visualizarse proyectando el haz láser emergente sobre una pantalla. Tanto esta introducción como las experiencias que se muestran a continuación, se centran en el caso HB1. La primera observación de las oscilaciones de lente térmica fue hecha por Jakeman y col. en 1973 [108], los cuales no profundizaron posteriormente en la investigación del fenómeno. El fenómeno fue redescubierto fortuita e independientemente por el equipo de Gouesbet [109] en 1982, e investigado desde el punto de vista de la dinámica de fluidos.

En el punto de impacto del haz láser en el interior de la celda, la absorción de la radiación produce un intenso calentamiento local, que es disipado principalmente por conducción al líquido circundante. Este calentamiento genera un paquete de líquido caliente que es empujado hacia la superficie por las fuerzas de Arquímedes, en un régimen dominado por la convección. El gradiente de temperatura en la superficie, provocado por la llegada del fluido caliente, induce un gradiente de tensión superficial, que da lugar a un movimiento de convección. Este efecto, que corresponde a una deformación local de la superficie, es el efecto Marangoni. De este modo, cuando el paquete de líquido alcanza la superficie, es destruido por el efecto Marangoni, que expulsa el líquido caliente hacia los laterales de la celda (suponiendo el caso más habitual, en el que la derivada de la tensión superficial respecto a la temperatura es negativa). El líquido de la celda se mueve, llevando líquido frío hacia el punto de impacto del láser, produciéndose la relajación de la lente térmica y cerrando un ciclo del proceso. Un nuevo ciclo está a punto de comenzar.

De esta interpretación se deduce que en el fenómeno intervienen las fuerzas de Arquímedes y las fuerzas de tensión superficial, caracterizadas por la densidad y la tensión superficial, respectivamente. El comportamiento oscilatorio podría entonces relacionarse con una continua formación y destrucción de paquetes de líquido caliente; pasos del proceso que, en realidad, tienen lugar de forma simultánea y no secuencial. Se pueden asociar al proceso dos escalas de tiempo: un tiempo de flujo ascensional o Rayleigh, correspondiente a la ascensión del paquete de fluido, y un tiempo de tensión superficial o Marangoni, correspondiente a su destrucción en la superficie libre, siendo este último usualmente mucho menor que el primero. Cuando se crea el paquete de líquido caliente, la lente térmica formada aumenta progresivamente hacia un máximo, disminuyendo después durante la ascensión. Finalmente, el desbaratamiento producido por el efecto Marangoni produce la contracción repentina del anillo, que puede observarse en la pantalla de visualización del fenómeno.

Las principales características de las oscilaciones de lente térmica son las siguientes:

- (i) Todos los líquidos absorbentes producen una lente térmica, pero no presentan obligatoriamente oscilaciones de lente térmica.
- (ii) Existe un valor máximo de distancia entre el haz láser y la superficie libre, a partir del cual, para una absorbancia y una potencia del haz dadas, no se observan las oscilaciones.
- (iii) Existe un intervalo de absorbancias fuera del cual, para una distancia y una potencia dadas, no se observan oscilaciones.
- (iv) Finalmente, existe un valor crítico de la potencia del láser, P_c , por debajo del cual, para una distancia y una absorbancia dadas, no se observan las oscilaciones de lente térmica.

Es importante tener en cuenta que estas cuatro características son válidas tan sólo en las condiciones de excitación continua de la lente térmica, utilizadas en los estudios de dinámica de fluidos. Cuando el experimento de lente térmica se bombea a impulsos regulares, entran en juego otros fenómenos que también generan oscilaciones de la lente térmica, en las circunstancias en las que no se observan con excitación continua. Este punto es, precisamente, el objeto del capítulo siguiente.

Mediante técnicas de visualización óptica, se ha establecido que los latidos ópticos están acompañados de oscilaciones convectivas en el seno del líquido, y oscilaciones superficiales en la superficie libre del mismo. Estas oscilaciones también pueden producirse cuando el calentamiento bajo la superficie se lleva a cabo con un alambre caliente, en lugar de con un haz láser (HW: *hot wire experiments*) [110-116]. Existen dos diferencias importantes entre los experimentos de HW y HB. En primer lugar, en HW el calentamiento se produce a lo largo de todo el alambre, mientras que en HB, el calentamiento está prácticamente localizado en un punto, ya que la divergencia del haz en la celda se produce en una región muy pequeña (longitud menor de 1 mm). Por otro lado, en los experimentos de HW se controla la temperatura del alambre y las condiciones de calentamiento necesarias para la obtención de oscilaciones que no dependan del estado dinámico del sistema. Sin embargo, en HB se produce una «retroalimentación» entre las condiciones de calentamiento y el movimiento del líquido, haciendo de las oscilaciones de lente térmica un fenómeno mucho más complejo que el de HW.

El establecimiento o no establecimiento de la inestabilidad en un sistema fluido depende, generalmente, de los valores que pueden tomar uno o varios números adimensionales que relacionan propiedades del líquido, tales como el número de Prandtl, que se define como:

$$P_r = \frac{\hat{C}_p \mu}{\kappa} \quad (\text{V.1})$$

siendo \hat{C}_p el calor específico a presión constante por unidad de masa, μ la viscosidad y κ la conductividad térmica. Generalmente, para un cierto valor crítico de estos números, el sistema pasa de la estabilidad a la inestabilidad. Si se modifica una de las propiedades del líquido, con el fin de superar las condiciones críticas, podremos provocar el establecimiento de la inestabilidad. A modo de ejemplo, consideremos nuestro sistema en un estado (1) donde se ha determinado el valor de P_c . Si se utiliza una potencia del láser tal como P_2 , inferior a P_c , el fluido se encontrará en el estado de inestabilidad estacionaria. Si ahora se modifica una de las propiedades del líquido, de forma que a una potencia P_2 , el sistema pase al estado de inestabilidad oscilatoria, habremos bajado el valor de la potencia límite P_c .

Los estados dinámicos del sistema dependen de la naturaleza del líquido (incluida su absorbancia a la longitud de onda de bombeo), la geometría de la celda, condiciones externas tales como la temperatura ambiente y la presión, la potencia de bombeo, P , y la distancia d entre el eje del haz y la superficie libre. Hasta el momento, todas las investigaciones se habían llevado a cabo fijando todos los parámetros, excepto la potencia y la distancia. Nosotros presentamos aquí un estudio en el que también modificamos el valor de la concentración de la especie absorbente.

Se entiende como bifurcación el conjunto de valores de los parámetros, en los que las oscilaciones pasan de un estado de estabilidad a uno de inestabilidad, o de un estado de inestabilidad a otro distinto, tal como oscilación periódica a no periódica o viceversa. Los valores críticos de bifurcación dependen en gran medida de la naturaleza del líquido. Así, por ejemplo, la potencia de bombeo requerida para el inicio de las oscilaciones varía entre 1 W, para una disolución de limpieza de mezcla crómica ($\text{CrO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$) y 100 mW, para ciertos disolventes orgánicos (acetona, benceno, tolueno y tetracloruro de carbono), mientras que en otros disolventes, como el agua, nunca se han observado oscilaciones. Los valores críticos de los parámetros dependen mucho de la temperatura externa, cuando se utilizan potencias pequeñas de bombeo. Así, por ejemplo, el valor crítico de la frecuencia en una experiencia efectuada a una potencia baja, se modificó en un 100%, al variar la temperatura ambiente en 1°K . Para evitar esta fuerte dependencia entre los valores críticos y la temperatura, es habitual trabajar a valores de potencia elevados.

La Figura V.1a muestra una señal temporal típica para líquidos con valores altos del número de Prandtl (tales como aceites de silicona y mezcla crómica). La Figura V.1b corresponde a la señal para líquidos que presentan valores bajos del número de Prandtl (disolventes orgánicos volátiles, tales como acetona, tetracloruro de carbono y tolueno). La señal no es simétrica respecto al valor medio, y toma la forma de picos temporales asociados a la contracción del latido óptico, separados por períodos de relajación. Las dos escalas de tiempos mencionadas anteriormente aparecen claramente, y pueden definirse como el período T de la señal y la anchura de pico a media altura δT . Para una onda sinusoidal, el cociente $R = 2\delta T/T$, que caracteriza la agudeza del pico, es la unidad. Este cociente varía entre 1 y 3 para los aceites de silicona, y entre 7,5 y 8,5 para los disolventes orgánicos ensayados.

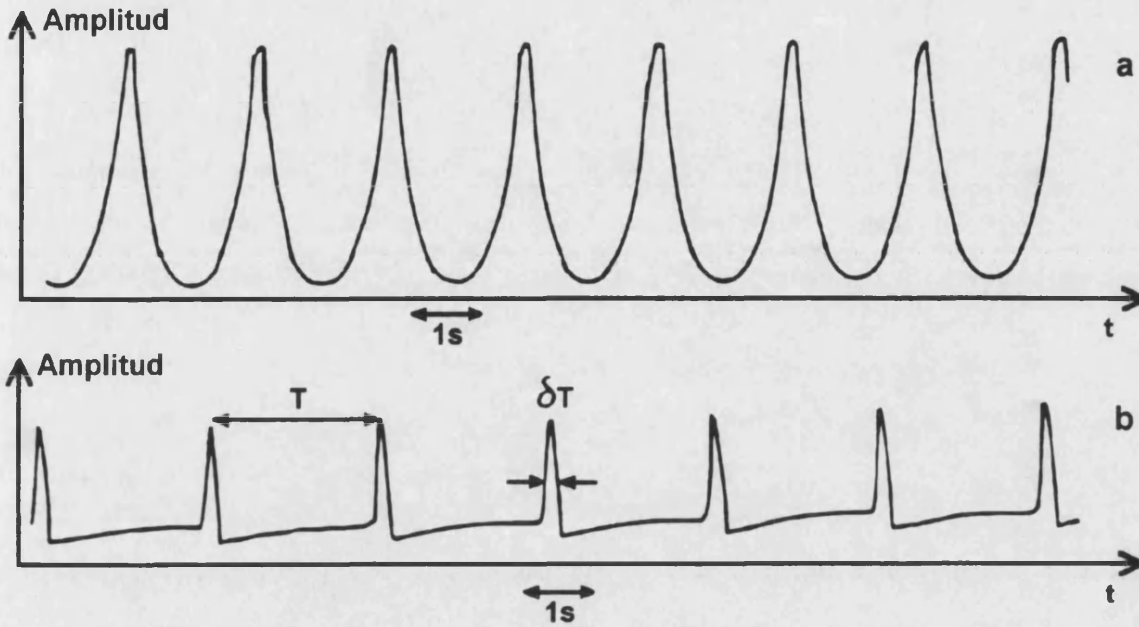


Figura V.1.- Señales temporales periódicas para dos tipos de disolvente: (a) aceite de silicona 47V5, y (b) tetracloruro de carbono.

b) El papel de la tensión superficial

El efecto Marangoni se estudia, generalmente, mediante un número adimensional llamado número de Marangoni, M_a , que viene dado por la expresión:

$$M_a = \left[-\frac{ds}{dT} \right] \frac{\Delta T d}{\mu k} \tag{V.2}$$

donde ΔT es la diferencia de temperatura (de signo positivo), s la tensión superficial (por lo que este número es función del coeficiente térmico de la tensión superficial), d el espesor de la capa de fluido, μ la viscosidad dinámica del fluido y k la difusividad térmica. Cuando $M_a > M_{ac}$ (valor crítico), se observa la inestabilidad por el efecto Marangoni.

En el tratamiento matemático de las inestabilidades, donde interviene el efecto Marangoni, puede intervenir otro número adimensional denominado número de crispación:

$$c_r = \frac{\rho v k}{s d} \quad (V.3)$$

donde d es el espesor del fluido, ρ la densidad, y v la viscosidad cinemática. En este número, la tensión superficial interviene directamente. La presencia de la tensión superficial en estos números adimensionales permite, si todos los demás parámetros están fijos, dar un valor a s para el cual el sistema pase al estado de inestabilidad oscilatoria. La potencia del láser será entonces la potencia crítica para este valor de s .

Por analogía con otros fenómenos en los que también interviene el efecto Marangoni, se pueden hacer las consideraciones siguientes:

- (i) La amplitud de la deformación de la superficie libre depende del flujo de energía absorbido. Cuanta más energía llega al sistema, mayor es la amplitud de las oscilaciones.
- (ii) La amplitud de la deformación de la superficie es inversamente proporcional a la tensión superficial. Parece correcto suponer que cuanto más pequeña sea s , más débiles serán las fuerzas de tensión superficial y, por lo tanto, habrá menos oposición a la deformación oscilatoria de la superficie.
- (iii) El movimiento de la superficie libre está ligado a los latidos de la lente térmica. Se observan los latidos de la lente térmica a partir del momento en el que la superficie libre comienza a oscilar.

De lo anterior, se deduce que la disminución de la tensión superficial equivale a la reducción del umbral de la potencia del láser. Supongamos que la potencia utilizada no sea suficiente para provocar la deformación de la superficie (consideración i) y, por tanto, los latidos de la lente térmica (consideración ii). Si disminuimos s , reduciendo de esta manera la energía necesaria para la deformación de la superficie (consideración ii), hasta que la potencia disponible sea suficiente, habremos reducido el umbral de potencia, P_c , del fenómeno.

c) Descripción cualitativa de los distintos estados

Hemos comentado que la lente térmica puede pasar de un estado estable a otro inestable y presentar diversos comportamientos dentro de la inestabilidad. El estudio de los diferentes estados se lleva a cabo, generalmente, mediante los espectros de transformada de Fourier de las oscilaciones.

c.1) La transformada de Fourier

Supongamos una secuencia de n valores del tipo $x_1, x_2, \dots, x_j, \dots, x_n$, que representan medidas de una variable $x(t)$, tomadas a tiempos Δt . Si hay n valores de x , el intervalo total del tiempo es $(0, t_{\max}) \equiv (0, n \Delta t)$; $x(t)$ se supone continua y acotada en ese intervalo. La transformada discreta de Fourier, $\hat{x}_1, \hat{x}_2, \dots, \hat{x}_n$, de la serie temporal, x_1, x_2, \dots, x_n , viene dada por la expresión:

$$\hat{x}_k = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{j=1}^n x_j \exp \left(-i \frac{2\pi jk}{n} \right) \quad (\text{V.4})$$

donde k puede valer desde 1 hasta n . Para simplificar la notación, se toma $\Delta t = 1$. La transformación inversa es:

$$x_j = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{k=1}^n \hat{x}_k \exp \left(-i \frac{2\pi jk}{n} \right) \quad (\text{V.5})$$

Algunas propiedades de esta transformación son las siguientes:

- (i) Las dos secuencias están relacionadas por el teorema de Parseval-Plancherel, que afirma que

$$\sum_j |x_j|^2 = \sum_k |\hat{x}_k|^2 \quad (\text{V.6})$$

- (ii) Mientras que el argumento de x es un tiempo, ya que $x_j = x(j \Delta t)$, el de \hat{x} es una frecuencia y $\hat{x}_k = x(k \Delta \omega)$. El incremento de frecuencia es $\Delta \omega = 2\pi / t_{\max} = 2\pi / n \Delta t$, siendo por tanto, $\omega_{\max} = 2\pi / \Delta t$, la frecuencia máxima.

(iii) Como la variable x se supone real, debe cumplirse:

$$\hat{x}_k = (\hat{x}_{n-k})^* \quad (\text{V.7})$$

El número n suele ser muy grande, por lo que se toma $n \rightarrow \infty$.

La representación gráfica de $|\hat{x}_k|^2$ en función de la frecuencia ω ($\omega = k \Delta \omega$) se denomina usualmente espectro de potencia de la señal. El espectro de potencia de una función real presenta una propiedad particular, expresada por la relación:

$$|\hat{x}_k|^2 = |\hat{x}_{n-k}|^2 \quad (\text{V.8})$$

Partiendo de una serie temporal de n puntos equidistantes en Δt , tras calcular la función \hat{x}_k , aplicando la expresión (V.4), y a partir de ella, $|\hat{x}_k|^2$, se obtiene una nueva función discreta de n puntos de abscisa $k/(n \Delta t)$ ($k = 1, \dots, n$). El eje de abscisas tiene dimensiones de s^{-1} , es decir, de frecuencia. Para obtener el espectro de Fourier, debe calcularse $|\hat{x}_k|^2$. En principio, no existe ninguna dificultad para realizar este cálculo, pero desde el punto de vista práctico no es tan sencillo, debido al valor elevado que toma n , dado que para representar fielmente la señal $x(t)$ se eligen valores grandes de n y pequeños de Δt . Por ejemplo, para $n = 10^3$ (valor relativamente pequeño), deben calcularse 1000 sumas de 1000 términos cada una. De forma general, la determinación de n componentes de un espectro exige un número de operaciones del orden de n^2 . Sin embargo, cuando n es una potencia de 2, un algoritmo particular, TRF (transformada rápida de Fourier) permite obtener el espectro de potencia, utilizando un número de operaciones mucho menor, del orden de $n \log_2 n$. En el comercio y en la red Internet pueden encontrarse analizadores de Fourier digitales, que combinan el algoritmo TRF con otros procedimientos, proporcionando rápidamente el espectro de potencia de una señal de varios millares de puntos. La interpretación del eje de ordenadas depende de la naturaleza de la señal medida. Los máximos estrechos y bien definidos que aparecen en el espectro de potencia reciben el nombre de picos, rayas o líneas. El aspecto general del espectro de potencia depende de cómo evoluciona la señal x a lo largo del tiempo. El examen del espectro de Fourier permite revelar ciertas propiedades de la evolución de la señal temporal, que de otra forma pasarían desapercibidas. El movimiento dado por la señal x_j puede ser periódico, cuasiperiódico o aperiódico (Figura V.2).

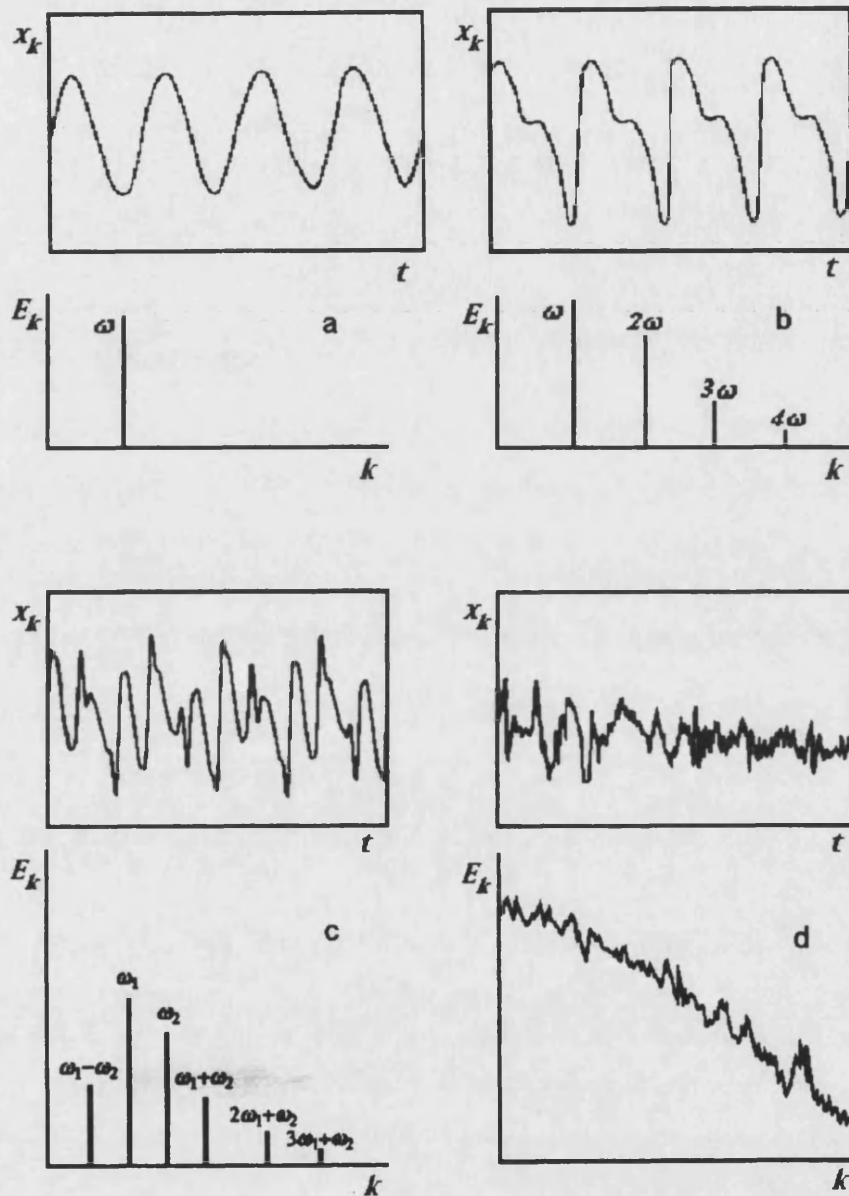


Figura V.2.- Señal temporal, $x(t)$, y espectro de potencia, E_k , para distintos tipos de estado oscilatorio: (a) sinusoidal, (b) periódico, (c) cuasiperiódico y (d) aperiódico.

(i) *Movimiento periódico*

Consideremos primero el caso simple, en el que $x(t)$ es una señal periódica, de período T :

$$x(t) = x(t + T) = x\left(t + \frac{2\pi}{\omega}\right) \quad (\text{V.9})$$

En una situación extrema en la que el período es igual a la duración de la medida, $T = t_{\text{max}} = n \Delta t$, los picos del espectro aparecen exactamente a las frecuencias $\omega, 2\omega, 3\omega, \dots, n\omega$. En el caso en el que la señal $x(t)$ es una función circular, *sen* o *cos*, en el espectro sólo aparece un pico de amplitud no nula, a la frecuencia ω (Figura V.2a). Para una señal de forma no sinusoidal, la amplitud de los armónicos de frecuencia $(2\omega, 3\omega, \dots)$ es distinta de cero (Figura V.2b). La presencia de armónicos en el espectro revela el carácter no sinusoidal de la evolución temporal de la señal. Por tanto, el espectro de una señal periódica de período T está formado por un pico de frecuencia ω , y de un cierto número de picos, correspondientes a los armónicos de esta frecuencia base.

(ii) *Movimiento cuasiperiódico*

Una función cuasiperiódica del tiempo es aquélla que puede escribirse de la forma:

$$f(\omega_1 t, \dots, \omega_k t, \dots, \omega_r t)$$

donde f es periódica, con período 2π en cada uno de sus r argumentos $t_k = \omega_k t$. Tales funciones se llaman también r -periódicas. Se dice que f tiene r frecuencias base ω_k y, por tanto, r períodos $T_k = 2\pi / \omega_k$. El espectro de Fourier de una función cuasiperiódica puede ser muy complejo, ya que puede incluir todas las funciones del tipo:

$$\omega = m_1 \omega_1 + m_2 \omega_2 + \dots + m_r \omega_r$$

donde m_k son números enteros (Figura V.2c). Sin embargo, suele suceder en los casos de interés en dinámica, que sólo aparece de modo importante un número menor, y que las amplitudes decrecen siguiendo una función $\exp(-\sum |m_k|)$.

(iii) *Movimiento aperiódico*

Las funciones $x(t)$, cuyo espectro es continuo, se llaman aperiódicas y no son ni periódicas ni cuasiperiódicas (Figura V.2d). No aparecen en su espectro máximos definidos que indiquen frecuencias características. Se dice que tienen ruido de banda ancha. Pero debe advertirse que, en algunas ocasiones, es difícil distinguir entre un espectro discreto con muchas líneas muy próximas y otro que sea realmente continuo. Las señales aperiódicas en sistemas con pocos grados de libertad manifiestan el llamado caos determinista.

c.2) Plano de los parámetros de control

En la Figura V.3 se muestra el diagrama de estados en el plano de los parámetros de control (P, d) , para una disolución de rojo organol BX1750 de 6 mg/l, en aceite de silicona Rhodorsil 47V5. Se observan los siguientes estados dinámicos: estable, periódico con una frecuencia fundamental básica, cuasiperiódico con dos frecuencias fundamentales, y biperiódico respecto al estado periódico básico. Las transiciones que tienen lugar son: estable a periódico, periódico a cuasiperiódico, periódico a biperiódico. También debe mencionarse, para valores de P mayores de 300 mW, la existencia de una transición desde un estado cuasiperiódico a un estado periódico subarmónico, y la presencia de histéresis a valores pequeños de potencia, para una transición de estado periódico a cuasiperiódico.

En la curva BL1 del plano (P, d) tiene lugar la transición de estable a inestable: la lente térmica pasa de la estabilidad a un estado periódico con una frecuencia fundamental básica (Figura V.4). La curva BL1 separa la zona S de estabilidad de la zona US de inestabilidad. La transición entre los dos estados es supercrítica: la amplitud de los picos espectrales aumenta continuamente desde cero, de forma irreversible, cuando se cruza la línea BL1 desde S a US.

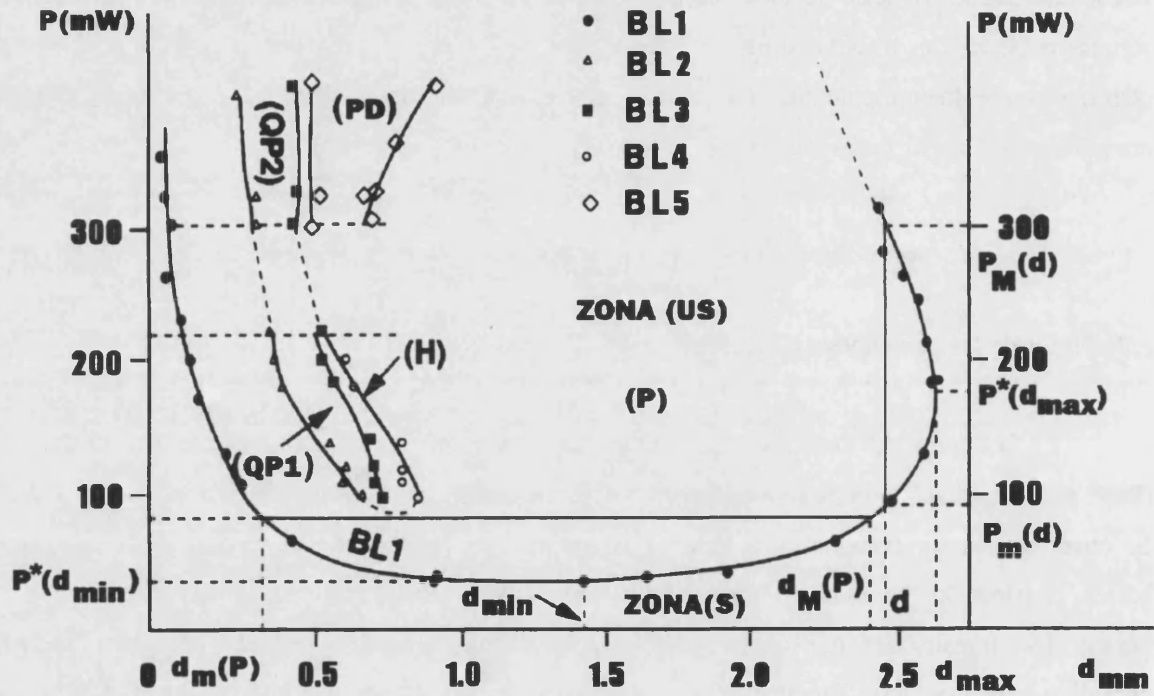


Figura V.3.- Los diferentes estados dinámicos en el plano potencia de bombeo (P) - distancia a la superficie (d), para una disolución de rojo organol en aceite de silicona. Para su obtención los autores utilizaron una celda de 5 cm de espesor y realizaron las medidas barriendo d para un valor fijo de P [116].

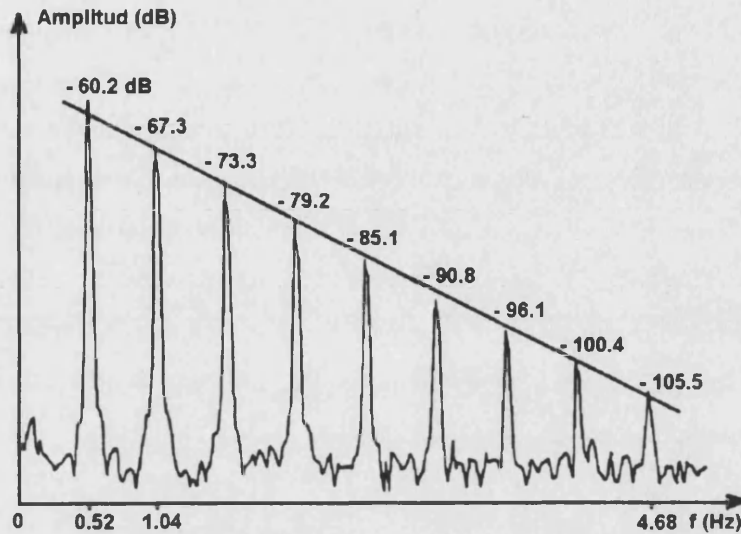


Figura V.4.- Espectro periódico básico para aceite de silicona 47V5.

En la Figura V.3 se observa que existe una potencia del láser $P^*(d_{\min})=34$ mW, asociada a una distancia $d_{\min}=1,5$ mm, por debajo de la cual el sistema es siempre estable, independientemente del valor de d . También existe una distancia $d_{\max}=2,7$ mm, asociada a una potencia $P^*(d_{\max})$ igual a 160 mW, por encima de la cual el sistema es siempre estable, para cualquier valor de P . Además, en principio, es probable que haya una potencia P por encima de la cual no existan oscilaciones, aunque esta potencia sería demasiado alta para ser observada en la práctica. La zona US estaría entonces limitada por la curva BL1 cerrada. Esta potencia crítica máxima, o límite superior ha sido observada para el caso HB2 [107].

Para valores de P mayores que $P^*(d_{\min})$, se producen oscilaciones a valores de d comprendidos entre dos valores, $d_m(P)$ y $d_M(P)$. Para valores ligeramente inferiores a $d_M(P)$, las oscilaciones se observan a valores de P comprendidos entre $P_m(d)$ y $P_M(d)$. Además, a una potencia P aproximadamente igual a 360 mW, el valor de $d_m(P)$ es cero. Incluso, es posible observar oscilaciones para valores negativos de d , lo que está relacionado con la forma de medir el cero de distancias, que no tiene en cuenta, por ejemplo, la formación de los meniscos de la celda de medida.

A valores bajos de potencia ($P < 220$ mW), tiene lugar la transición del estado periódico al cuasiperiódico, a lo largo de las curvas BL2, BL3 y BL4, apareciendo los dominios QP1 y H, que corresponden a un estado cuasiperiódico con dos frecuencias fundamentales (Figura V.5), y a un estado de histéresis, respectivamente. La línea BL2 corresponde a una transición supercrítica (continuidad y reversibilidad), mientras que la zona H se alcanza mediante una transición subcrítica (discontinuidades e irreversibilidades asociadas con el fenómeno de histéresis). En la zona H son posibles dos estados, dependiendo la zona observada de si los experimentos se realizan aumentando o disminuyendo el valor de d . Las líneas BL2 y BL4 se han dibujado de forma discontinua, ya que se han supuesto y no corresponden a datos experimentales. Esta zona requeriría un estudio específico, por ejemplo, trabajando a un valor fijo de d y variando P , para intentar revelar los posibles estados cuasiperiódicos.

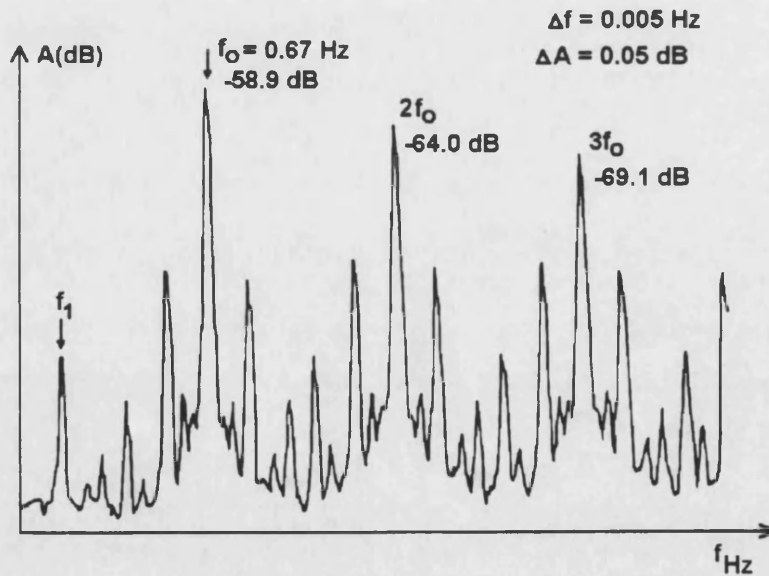


Figura V.5.- Espectro correspondiente a un estado QP con dos frecuencias fundamentales f_0 y f_1 . Aceite de silicona 47V5, $d = 1$ mm, $P = 200$ mW.

La zona PD corresponde a estados biperiódicos. A través de la línea BL5 se alcanzan mediante una transición supercrítica estados biperiódicos del tipo $f_0/2$, $3f_0/2$, etc. Dentro del dominio PD también se han observado estados biperiódicos del tipo $f_0/4$, $f_0/8$, $f_0/16$, pero la extensión de los correspondientes dominios es del orden del error experimental; por ello, no se dibujó la línea de transición. El sistema también puede saltar espontáneamente, por ejemplo, del estado $f_0/8$ al estado $f_0/16$, debido probablemente a la sensibilidad a las condiciones externas.

A valores altos de la potencia ($P > 300$ mW), se observa el dominio QP2, correspondiente a un estado QP con dos frecuencias fundamentales. Las zonas QP1 y QP2, posiblemente, estén unidas como indican las líneas discontinuas. Cuando aumenta la potencia, la anchura de QP2 es casi constante, mientras que la anchura de PD aumenta; por lo tanto, la importancia relativa de la biperiodicidad crece con la potencia del láser.

c.3) Variación de f_0 y A_0 con la distancia d

La Figura V.6 muestra los valores de la frecuencia f_0 (frecuencia fundamental) en función de d , para valores seleccionados de P . Para el estado periódico básico, f_0 es la frecuencia fundamental; para los estados QP (zonas QP1 y QP2), f_0 se define por continuidad del estado básico periódico. Esta definición no es ambigua, ya que siempre es posible pasar a un estado QP a través de un estado P, mediante una transición supercrítica. Para estos estados, f_0 es siempre la frecuencia del pico más alto. Para los estados biperiódicos, f_0 todavía se define por continuidad desde el estado periódico básico, sin embargo, f_0 no es la frecuencia fundamental para estos estados.

La variación de la frecuencia f_0 con respecto a d puede dibujarse como una hipérbola, modificada en tres partes (D, E, F en la Figura V. 6). La zona D, cercana a $d_m(P)$, corresponde a frecuencias más pequeñas que los valores de la hipérbola base. La región E corresponde a la histéresis (zona H en el plano de los parámetros). Finalmente, en la zona F, la frecuencia aumenta ligeramente cuando d se acerca a $d_M(P)$.

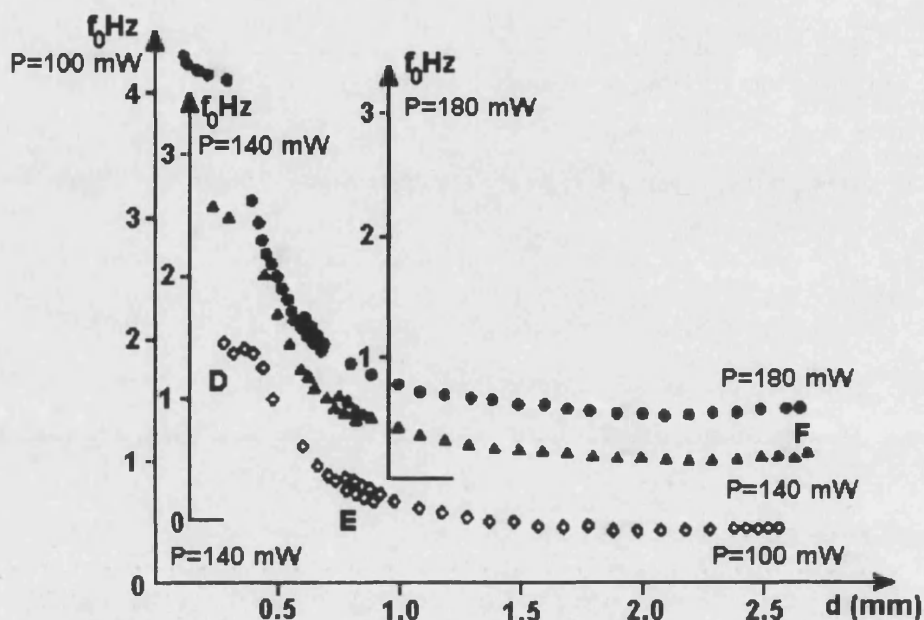


Figura V.6.- Variación de la frecuencia f_0 en función de la distancia, para $P = 100, 140$ y 180 mW.

En la Figura V.7 se muestran valores de A_0 (amplitud del pico de frecuencia f_0 , expresada en dB), en función de la distancia d . La comparación entre diferentes valores de A_0 sólo tiene sentido para un valor fijo de P y distintos valores de d . Todos los perfiles de la amplitud son similares, presentando tres partes que denominaremos A, B, C (Figura V.7, para una potencia de 320 mW). La parte A se sitúa cerca del valor inicial, $d_m(P)$. La amplitud aumenta muy rápidamente desde -90 dB (ruido experimental) hasta por encima de -40 dB, para un pequeño cambio de d , igual a 0,1 mm para $P=34$ mW, e igual a 0,2 mm para $P=300$ ó 400 mW. En la parte B, la amplitud disminuye cuando d aumenta. La disminución es aproximadamente exponencial, correspondiendo a una disminución lineal en la representación logarítmica de la Figura V.7. En la parte C, la pendiente del descenso se hace mayor al aproximarse a $d_M(P)$. Finalmente, la amplitud cambia de -50 a -80 dB, para un cambio en d de 0,1 mm.

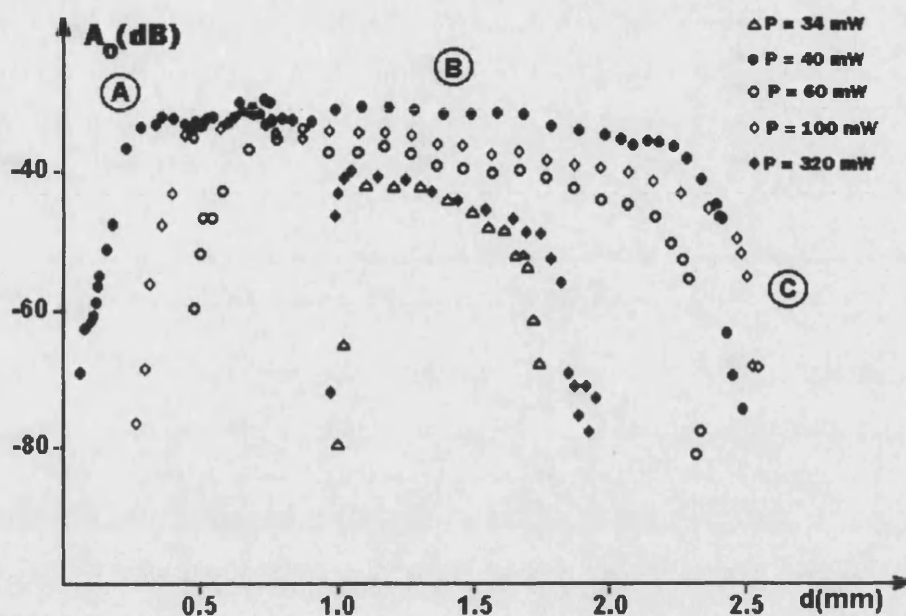


Figura V.7.- Amplitud del pico fundamental, A_0 , en función de la distancia, para diversos valores de P.

V.2.- Parte experimental

a) *Instrumentación y reactivos*

Se utilizó el primero de los instrumentos de ELT construidos en el LESP, descrito en el capítulo III, apartado b. Se hizo uso de los siguientes colorantes: 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN, Scharlau, Barcelona), rojo de metilo (Scharlau) y rojo organol (ICI FRANCOLOR, Francia), y los siguientes disolventes: aceite de silicona (Rhodorsil Silicones, Rhones-Poulenc, Francia), tetracloruro de carbono, cloroformo, acetona y etanol de calidad para análisis (Prolabo). También se utilizó dodecilsulfato sódico (SDS, Merck, Darmstadt, Alemania).

Los colorantes se disolvieron en la mínima cantidad posible de etanol y se diluyeron luego con el disolvente a utilizar. Para la realización del estudio de la influencia de la concentración en los parámetros de interés, se preparó una disolución madre de PAN en aceite de silicona, de concentración $8,1 \times 10^{-4}$ M.

b) Procedimientos

Las experiencias se realizaron en una habitación interior cerrada, que mantenía la temperatura casi constante. En esta habitación se hallaba instalado el espectrómetro de lente térmica. Para conseguir el equilibrio térmico con el ambiente, se introdujeron las disoluciones de los colorantes en la habitación, al menos 30 min antes de realizar las medidas. Además, la celda de medida de 0,5 cm de paso óptico x 1 cm, se mantuvo cerrada durante varios minutos, antes y durante las medidas.

Se tomó como cero de distancias el punto en el que el haz láser, a una potencia próxima a cero, comenzaba a reflejarse en la superficie del líquido. Una vez fijado el cero, la distancia se variaba con el microposicionador que controla la posición de la celda en sentido vertical. La potencia del láser de Ar^+ se fijó, cada vez, con el medidor de potencia antes de realizar las medidas. En la mayoría de las experiencias, la potencia se mantuvo fija y se hizo un barrido de distancias. Una vez que se producían las oscilaciones, se medía la frecuencia y la amplitud de las mismas con un analizador de espectros de transformadas rápidas de Fourier. En otras experiencias, también se visualizó la señal temporal mediante un programa de ordenador, y se almacenaron los datos para ser tratados posteriormente.

V.3.- Resultados y discusión

a) Estudio previo de la variación de los parámetros de interés con la concentración de especie absorbente

En primer lugar, con el fin de buscar el disolvente o disolventes más adecuados, para realizar los estudios posteriores sobre la influencia de la concentración en los parámetros de interés, se llevó a cabo un estudio cualitativo de las oscilaciones de lente térmica en distintos disolventes. Para ello, se utilizaron diferentes disoluciones de colorantes orgánicos en aceite de silicona, tetracloruro de carbono, cloroformo, acetona, etanol y disoluciones micelares de dodecilsulfato sódico; como colorantes se utilizaron PAN, rojo de metilo y rojo organol.

Las disoluciones de rojo de metilo en etanol y acetona no presentaron ninguna oscilación, para ninguna de las potencias de bombeo ensayadas (de 0 a 300 mW). Con las disoluciones de rojo de metilo y PAN, en cloroformo y tetracloruro de carbono, se obtuvieron algunas ligeras oscilaciones, pero éstas se detenían segundos después de comenzar a irradiar la muestra, y parecían estar más favorecidas a potencias de bombeo bajas (mayor duración de las oscilaciones). Sin embargo, en ningún caso se pudieron obtener oscilaciones claras y reproducibles.

Las pruebas con las disoluciones micelares acuosas de SDS de los colorantes resultaron muy interesantes, ya que pusieron de manifiesto la posible relación entre el fenómeno y algunas propiedades físicas de los disolventes. Aunque no se consiguieron oscilaciones de lente térmica permanentes, se observaron algunas oscilaciones durante unos pocos segundos, al iluminar la muestra por primera vez; sin embargo, si se cortaba el haz momentáneamente y, posteriormente, se volvía a irradiar, la duración de las oscilaciones era menor. Al aumentar la concentración de SDS y, por tanto, modificar más las propiedades físicas de la disolución, la duración de las oscilaciones fue mayor, pero no se consiguieron oscilaciones permanentes, ni siquiera para concentraciones muy altas de SDS. También se observó que las oscilaciones se favorecían a potencias de bombeo elevadas.

Sólo al utilizar las disoluciones en aceite de silicona el fenómeno se presentó de forma clara y reproducible, por lo que se decidió realizar el estudio completo de la influencia de la concentración sobre los diferentes parámetros de interés, utilizando disoluciones de distinta concentración de PAN en aceite de silicona. En este caso, las oscilaciones también se vieron favorecidas a potencias altas.

b) Variación de la frecuencia y de la amplitud del pico fundamental en función de la distancia a la superficie y de la concentración, para disoluciones de PAN en aceite de silicona

Se realizó un estudio de la variación de la frecuencia de las oscilaciones y de la amplitud del pico fundamental de las mismas, al modificar la distancia del haz a la superficie de la disolución, y la concentración de la especie absorbente, para una potencia de 200 mW. El intervalo de concentraciones de PAN en aceite de silicona fue de $1,3 \times 10^{-4}$ - $3,2 \times 10^{-4}$ M, y la distancia fue modificada entre 1,4 y 3,0 mm (de 0,2 en 0,2 mm), tomándose como cero el punto en el que el haz láser, a una potencia próxima a cero, comienza a reflejarse en la superficie del líquido.

En la Figura V.8 se muestra la variación de la frecuencia del pico fundamental con la distancia, para distintas concentraciones de PAN en aceite de silicona. Para una misma concentración, la frecuencia del pico fundamental disminuye con la distancia, más bruscamente en la zona próxima a la superficie. Si se comparan estas experiencias con las presentadas en la Figura V.6, se puede apreciar, como era de esperar, que el aumento de concentración tiene el mismo efecto sobre las oscilaciones que el aumento de la potencia del láser, ya que de las dos maneras se incrementa la absorción de radiación por parte de la disolución.

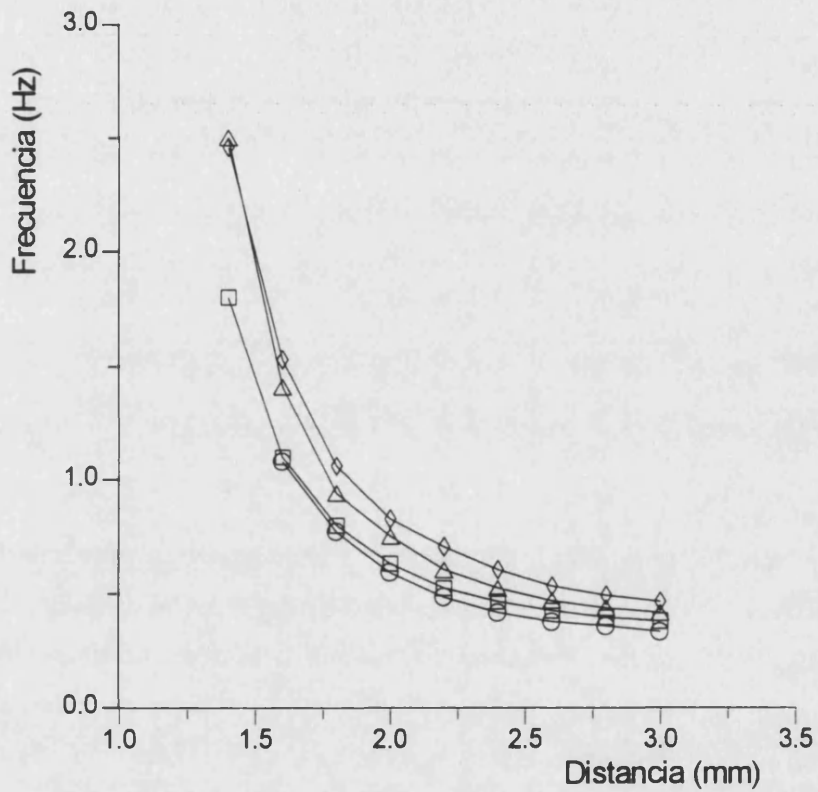


Figura V.8.- Variación de la frecuencia del pico fundamental con la distancia, a una potencia de 200 mW, para distintas concentraciones de PAN en aceite de silicona: ○, $1,30 \times 10^{-4}$ M; ◻, $1,95 \times 10^{-4}$ M; △, $2,95 \times 10^{-4}$ M y ◊, $3,24 \times 10^{-4}$ M.

Para todas las distancias, la frecuencia de las oscilaciones aumentó de forma aproximadamente lineal, al incrementarse la concentración del colorante, siendo mayor la sensibilidad para distancias pequeñas (Figura V.9). Para cada distancia, la frecuencia en función de la concentración se ajustó por mínimos cuadrados a una recta:

$d=1,6$ mm	$f_0 = 0,70 + 2600$ [PAN]	$r=0,95$
$d=1,8$ mm	$f_0 = 0,54 + 1600$ [PAN]	$r=0,97$
$d=2,0$ mm	$f_0 = 0,41 + 1300$ [PAN]	$r=0,98$
$d=2,2$ mm	$f_0 = 0,32 + 1200$ [PAN]	$r=0,98$
$d=2,4$ mm	$f_0 = 0,28 + 970$ [PAN]	$r=0,99$
$d=2,6$ mm	$f_0 = 0,27 + 790$ [PAN]	$r=0,997$
$d=2,8$ mm	$f_0 = 0,27 + 690$ [PAN]	$r=0,996$
$d=3,0$ mm	$f_0 = 0,25 + 670$ [PAN]	$r=0,998$

En la Figura V.10, se muestra la variación de la amplitud del pico fundamental (altura del pico fundamental del espectro de transformada de Fourier) con la distancia, para distintas concentraciones de PAN en aceite de silicona. En general, la amplitud disminuyó al aumentar la distancia. Además, la amplitud del pico fundamental disminuyó, en líneas generales, al aumentar la concentración en el intervalo de concentraciones estudiado (Figura V.11), excepto para algún pequeño intervalo de concentraciones y de distancias. Al comparar las Figuras V.8 y V.10, se observa que, para la amplitud, el comportamiento es menos regular que para la frecuencia.

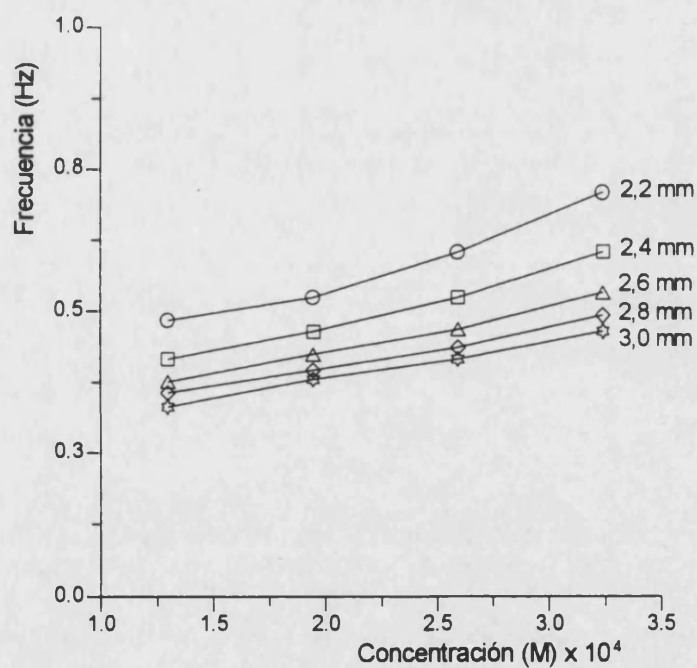
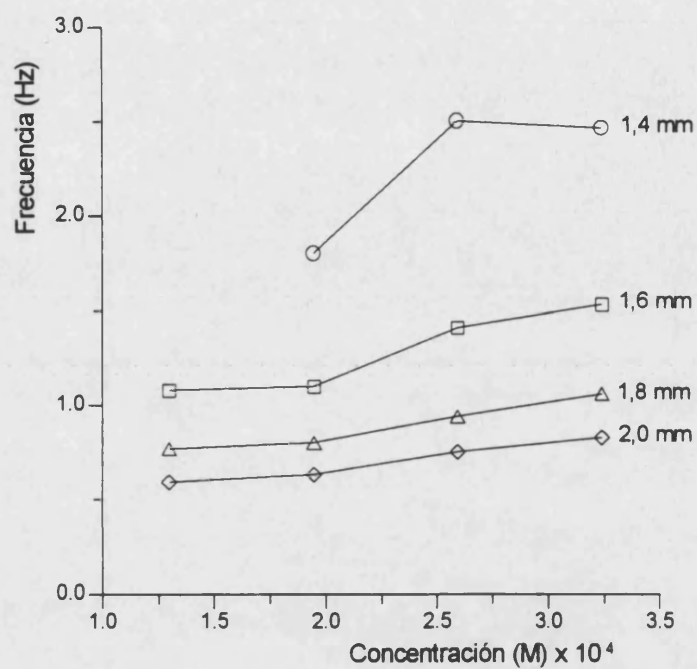


Figura V.9.- Variación de la frecuencia del pico fundamental con la concentración, para disoluciones de PAN en aceite de silicona, y diferentes distancias (indicadas junto a cada línea), para una potencia de 200 mW.

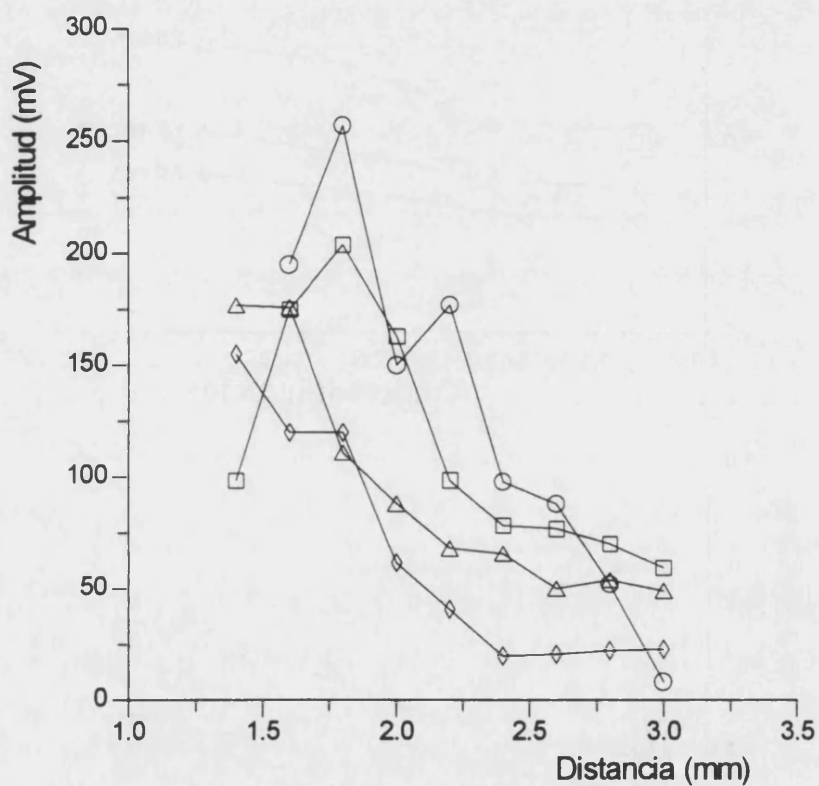


Figura V.10.- Variación de la amplitud del pico fundamental con la distancia, a una potencia de 200 mW, para distintas concentraciones de PAN en aceite de silicona: \circ , $1,30 \times 10^{-4}$ M; \square , $1,95 \times 10^{-4}$ M; \triangle , $2,95 \times 10^{-4}$ M y \diamond , $3,24 \times 10^{-4}$ M.

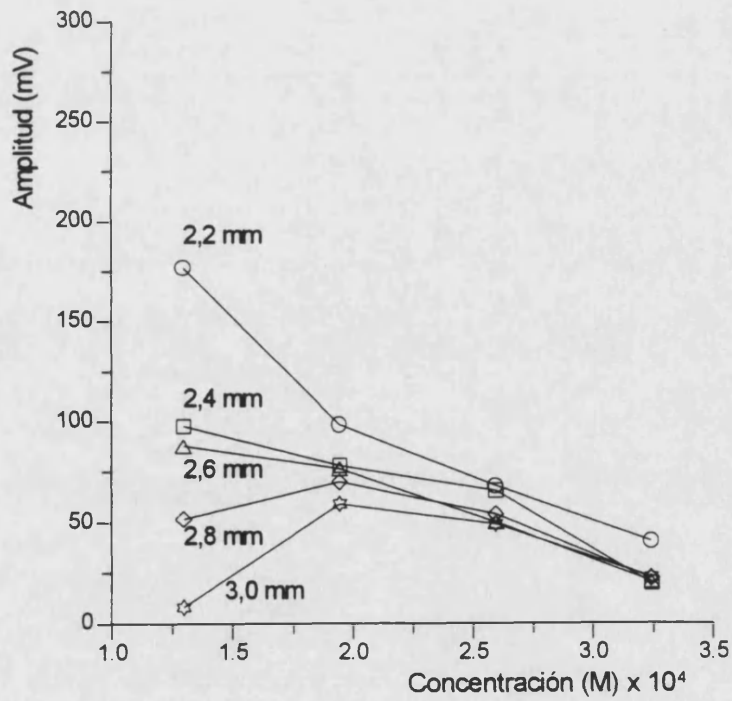
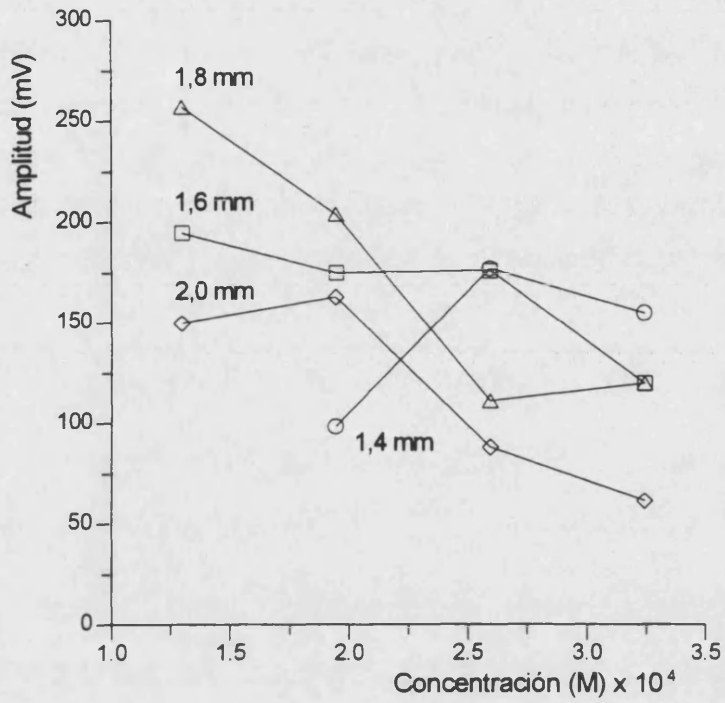


Figura V.11.- Variación de la amplitud del pico fundamental con la concentración para disoluciones de PAN en aceite de silicona, y diferentes distancias (indicadas junto a cada línea), para una potencia de bombeo de 200 mW.

La variación, tanto de la frecuencia como de la amplitud con la distancia, fue más acusada al aumentar la potencia de bombeo (Figuras V.12 y V.13). El aumento de potencia desde 50 mW a 200 mW produjo un aumento de la frecuencia y de la amplitud del pico fundamental, para la mayoría de las distancias estudiadas. Al aumentar la potencia, también se incrementó el intervalo de distancias en el que se producían las oscilaciones.

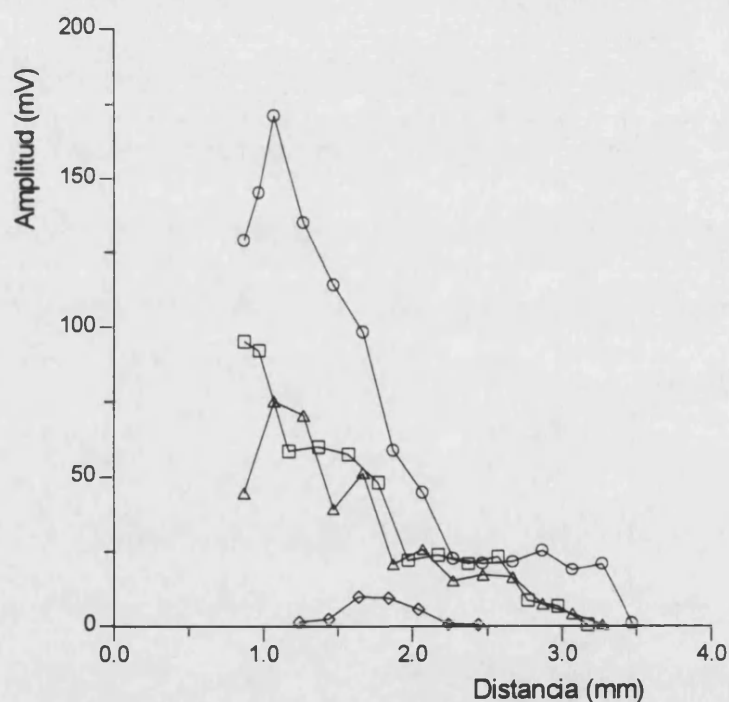


Figura V.12. - Variación de la amplitud del pico fundamental con la distancia, para varias potencias de bombeo: ○, 200 mW; □, 150 mW; △, 100 mW; ◇, 50 mW. Concentración de PAN: $3,24 \times 10^{-4}$ M.

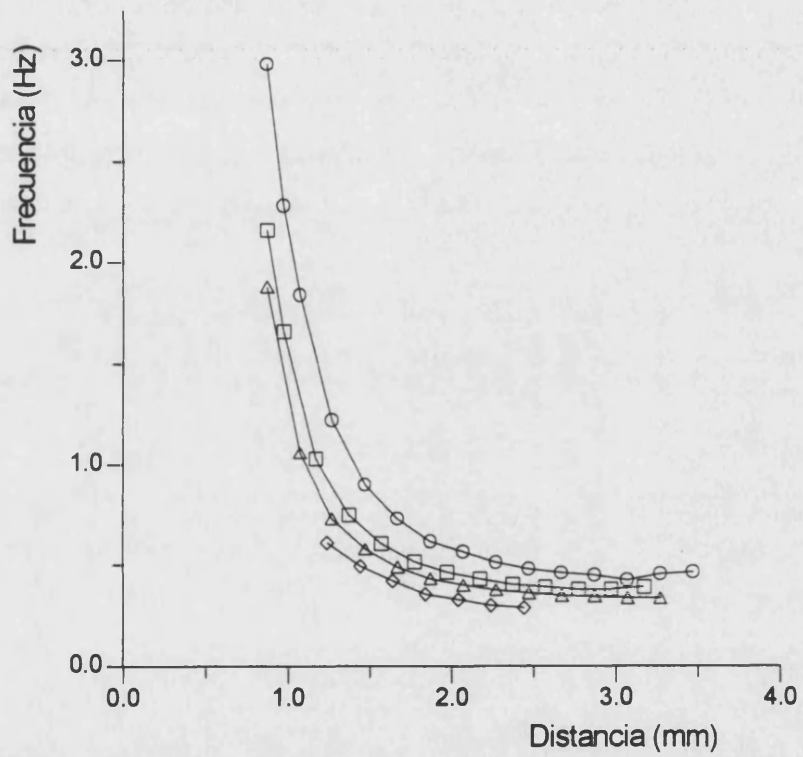


Figura V.13.- Variación de la frecuencia fundamental con la distancia, para varias potencias: ○, 200 mW; □, 150 mW; ▲, 100 mW; ◇, 50 mW. Concentración de PAN: $3,24 \times 10^{-4}$ M.

c) Variación de la distancia con la concentración para una frecuencia fija

Utilizando una potencia fija de 200 mW, se buscó la distancia a la que la frecuencia de las oscilaciones era de 0,40 , 0,45 , 0,50 , 0,55 y 0,60 Hz, para cada una de las concentraciones estudiadas. Se eligió este intervalo de frecuencias, por ser la zona en la que se requiere un cambio mayor en la distancia para obtener un pequeño cambio en la frecuencia y, por tanto, en esta zona serán mayores las diferencias entre las distintas concentraciones (ver Figura V.8). En la Figura V.14 aparecen los valores de la distancia necesaria para obtener una frecuencia dada, en función de la concentración, para todas las frecuencias ensayadas. Ajustando los datos por mínimos cuadrados, se obtiene:

$f_0=0,60$ Hz	$d = 2,8 + 2700$ [PAN]	$r=0,97$
$f_0=0,55$ Hz	$d = 2,8 + 3100$ [PAN]	$r=0,97$
$f_0=0,50$ Hz	$d = 2,8 + 3900$ [PAN]	$r=0,98$
$f_0=0,45$ Hz	$d = 2,6 + 6000$ [PAN]	$r=0,99$
$f_0=0,40$ Hz	$d = 2,5 + 8300$ [PAN]	

Por tanto, la sensibilidad aumentó al disminuir la frecuencia. La sensibilidad encontrada mediante este método, en el que se relaciona la distancia a la que las oscilaciones tienen una frecuencia dada con la concentración, fue ligeramente mayor que cuando se relacionó directamente la frecuencia de las oscilaciones con la concentración. Estos resultados son interesantes desde el punto de vista del posible desarrollo de procedimientos analíticos, dada la gran precisión con que puede medirse la distancia y fijarse la frecuencia, lo que permitiría medir pequeñas diferencias de concentración. La dificultad estriba en que las oscilaciones desaparecen a concentraciones bajas, por lo que los límites de detección resultarían muy altos.

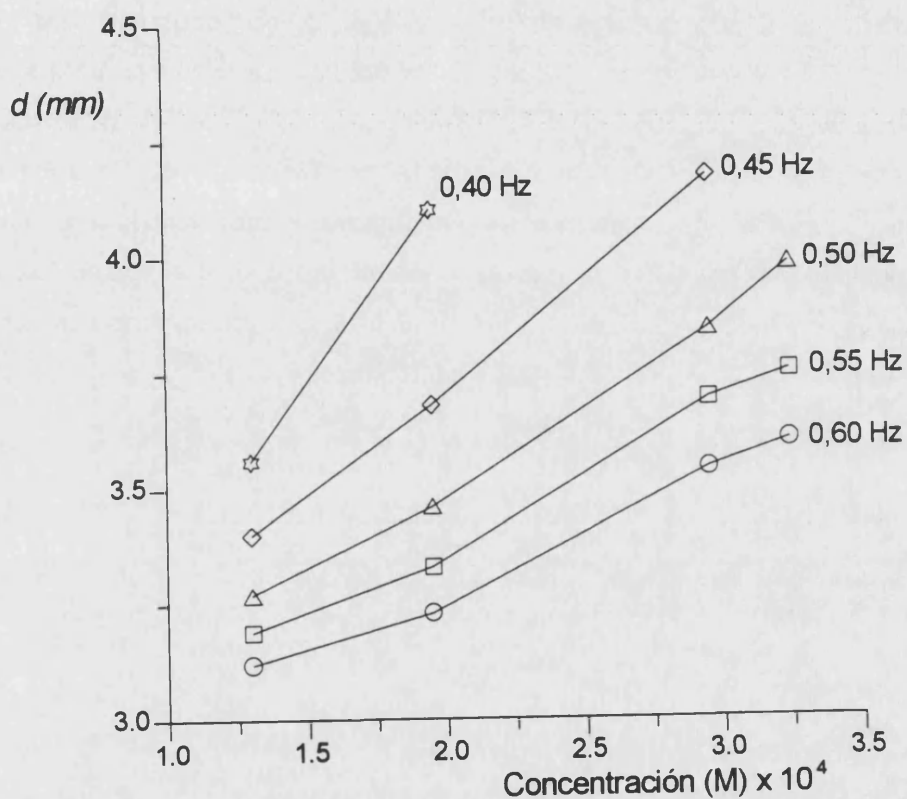


Figura V.14.- Variación de la distancia necesaria para obtener una frecuencia dada (indicada junto a cada línea), con la concentración de PAN en aceite de silicona, para una potencia de bombeo de 200 mW.

d) Estudio de la variación de la potencia total del espectro de transformada de Fourier con la concentración y la distancia

Para un intervalo de concentraciones de PAN en aceite de silicona de $1,30 \times 10^{-4}$ - $3,24 \times 10^{-4}$ M y una potencia de bombeo de 200 mW, se obtuvo una serie de medidas, que posteriormente tratadas con un programa de cálculo de transformadas de Fourier, proporcionaron la señal total de las oscilaciones, para distancias comprendidas entre 2,8 y 5,2 mm. La señal total es la integral de la amplitud en función de la frecuencia sobre la transformada y, por lo tanto, es una medida global de la intensidad de las oscilaciones, considerando todas las frecuencias a la vez. En la Figura V.15 se puede contemplar la variación de la potencia total del espectro, en función de la concentración. Para todas las concentraciones estudiadas, la potencia es máxima cuando la distancia del haz de bombeo a la superficie es de 3,0 mm, reduciéndose rápidamente para distancias mayores y menores.

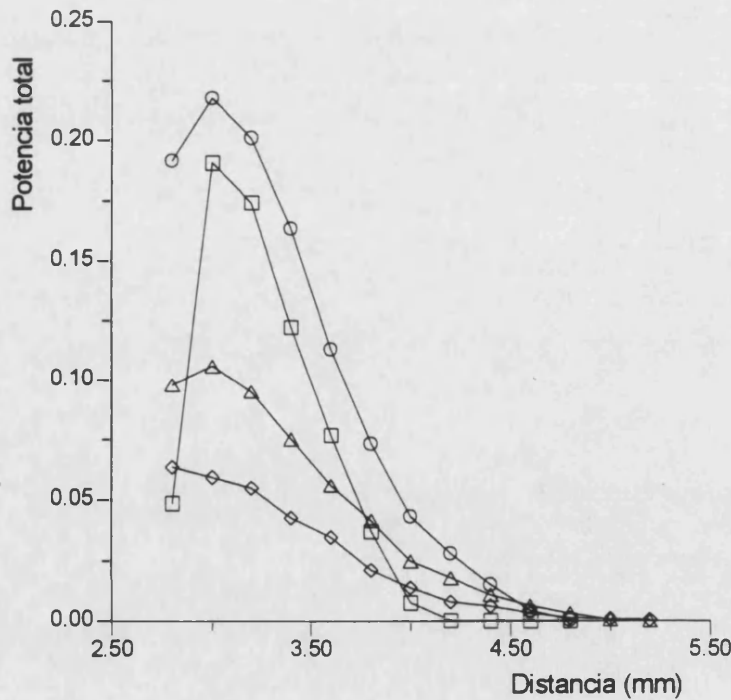


Figura V.15. - Variación de la potencia total del espectro con la distancia, para diversas concentraciones de PAN en aceite de silicona: □, $1,30 \times 10^{-4}$ M; ○, $1,95 \times 10^{-4}$ M; △, $2,59 \times 10^{-4}$ M; ◇, $3,24 \times 10^{-4}$ M.

En la Figura V.16 se muestra la variación de la potencia total del espectro con la concentración de PAN, para diversas distancias. Se observó un comportamiento bastante complejo que, en líneas generales, consistió en que la potencia total aumentó hasta alcanzar un valor máximo, que corresponde a una concentración de PAN $1,95 \times 10^{-4}$ M y disminuyó a concentraciones mayores de colorante.

Dado que la potencia total del espectro aumentó en el intervalo $1,30 \times 10^{-4}$ - $1,95 \times 10^{-4}$ M, con un máximo en torno a este último valor, se realizó una segunda serie de experiencias utilizando disoluciones con una concentración de PAN dentro del intervalo anterior y en torno al máximo. El intervalo estudiado fue $1,13 \times 10^{-4}$ - $2,11 \times 10^{-4}$ M, la potencia de bombeo de 200 mW, y la distancia varió entre 2,8 y 5,0 mm. En la Figura V.17 se muestra la variación de la potencia total del espectro con la concentración para este intervalo de concentraciones. El comportamiento es similar al caso anterior, observándose que para todas las concentraciones ensayadas, la potencia total presenta un máximo a una distancia de 3,0 mm.

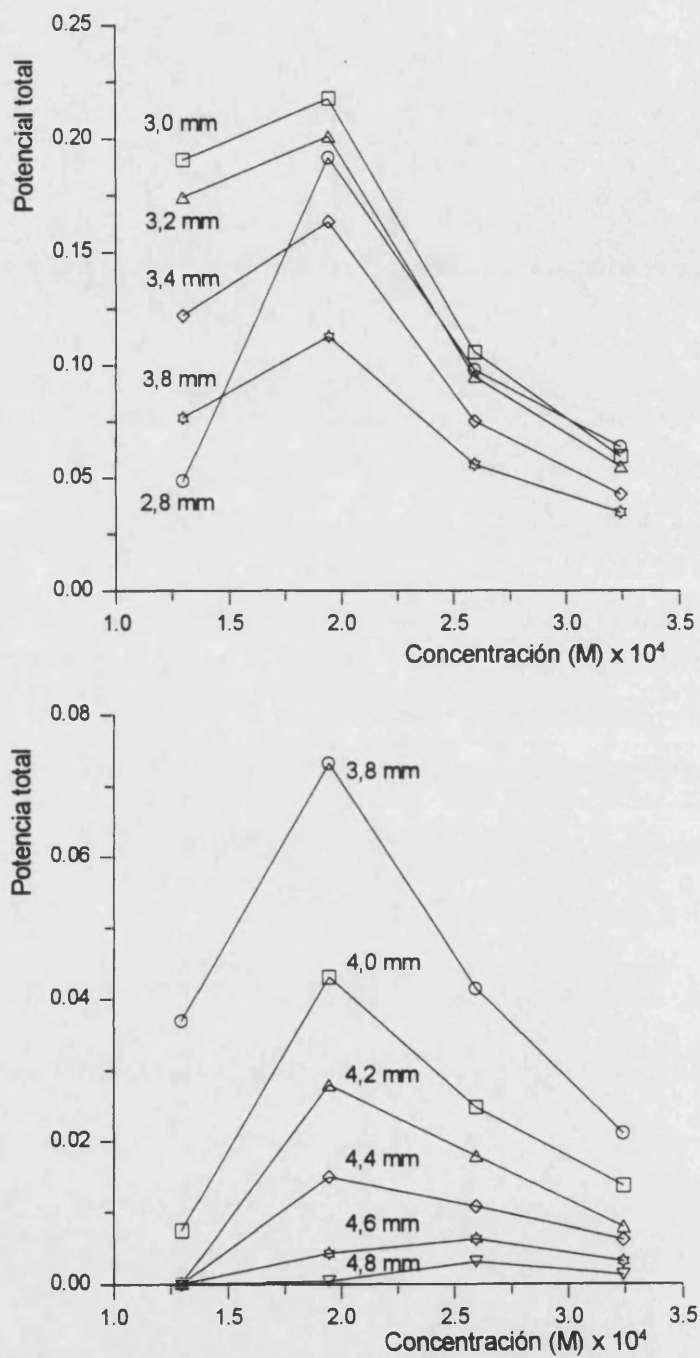


Figura V.16.- Variación de la potencia total con la concentración de PAN en aceite de silicona, para diversas distancias (indicadas junto a cada línea).

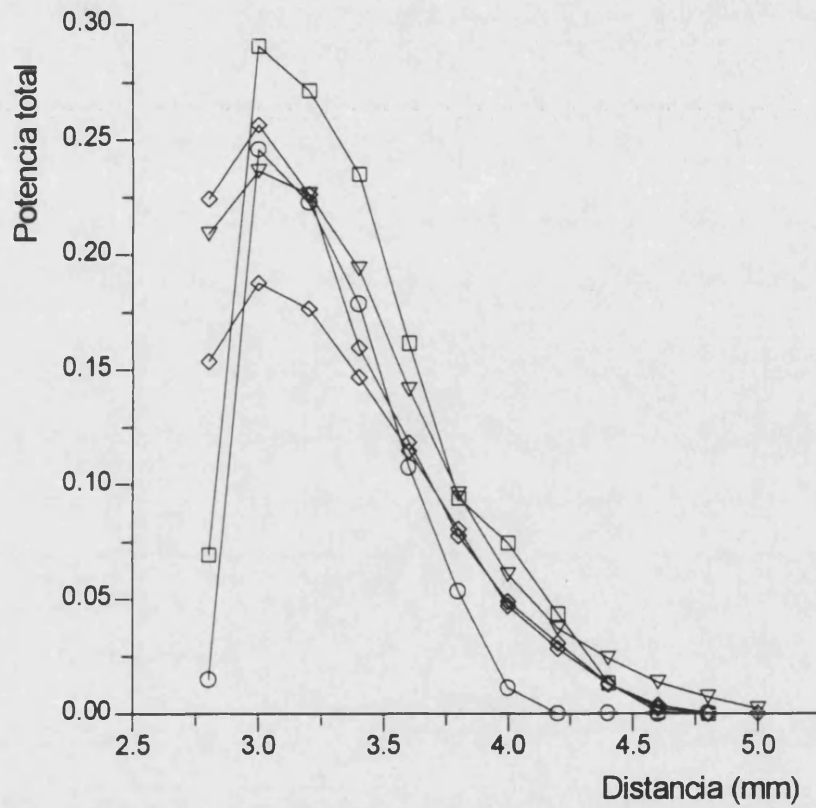


Figura V.17.- Variación de la potencia total del espectro para varias concentraciones de PAN en aceite de silicona: ○, $1,13 \times 10^{-4}$ M; □, $1,46 \times 10^{-4}$ M; ◇, $1,62 \times 10^{-4}$ M; △, $1,78 \times 10^{-4}$ M; ▽, $2,11 \times 10^{-4}$ M.

En la Figura V.18 se representa la variación de la potencia total con la concentración, para diversas distancias. El comportamiento observado es muy complejo, quizá debido al paso de unas zonas a otras, dentro del plano de los parámetros de control (un aumento de concentración equivaldría a un aumento en la potencia de bombeo), es decir, a los cambios en el comportamiento oscilatorio de la lente térmica (periodicidad, cuasiperiodicidad, etc.).

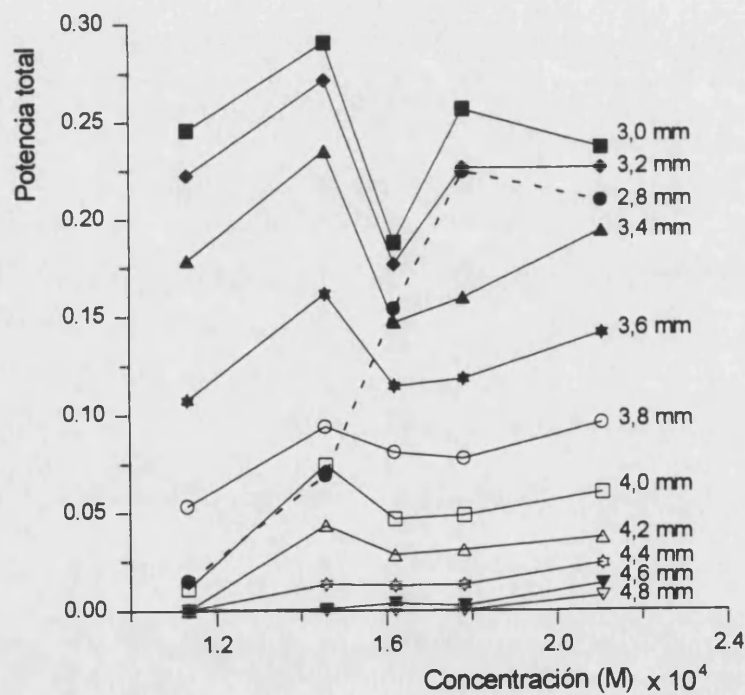


Figura V.18. - Variación de la potencia total del espectro con la concentración para diversas distancias (indicadas junto a cada línea).

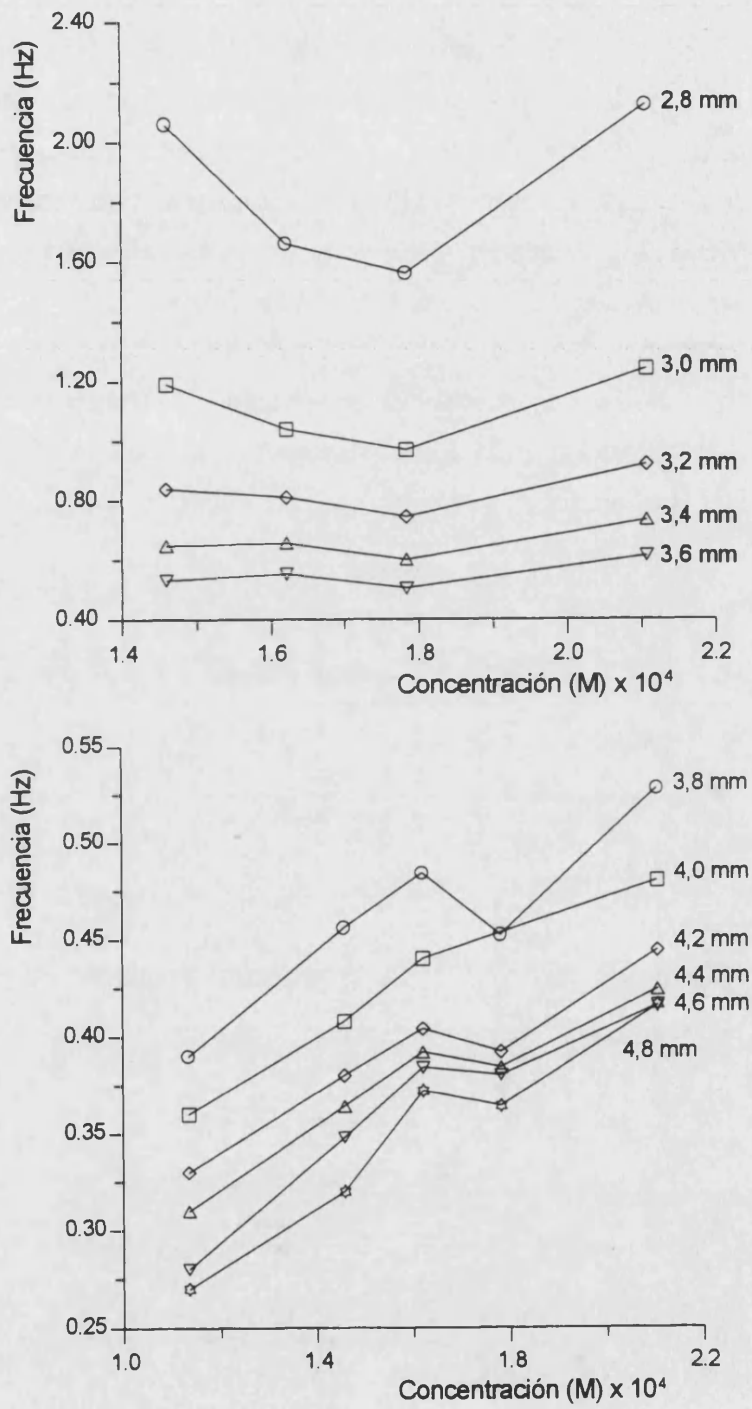


Figura V.19.- Variación de la frecuencia con la concentración de PAN en aceite de silicona, en el intervalo de concentraciones $1,13 \times 10^{-4}$ - $2,11 \times 10^{-4}$ M, para diversas distancias (indicadas junto a cada línea).

En la Figura V.19 se ha representado la variación de la frecuencia con la concentración de PAN, para el último intervalo de concentraciones estudiado ($1,13 \times 10^{-4}$ - $2,11 \times 10^{-4}$ M). Si se compara esta figura con la Figura V.9, donde se representa la variación de la frecuencia con la concentración para el primer intervalo ($1,30 \times 10^{-4}$ - $3,24 \times 10^{-4}$ M), se pueden apreciar algunas diferencias. Para el primer intervalo, la frecuencia aumenta al aumentar la concentración, mientras que en el segundo caso, el comportamiento es más complejo. Como ya hemos comentado, este comportamiento podría ser debido a cambios en la naturaleza oscilatoria de la lente térmica.

En la Figura V.20 se muestra la variación de la frecuencia con la distancia, para el intervalo de concentraciones $1,13 \times 10^{-4}$ - $2,11 \times 10^{-4}$ M. El comportamiento de la frecuencia al aumentar la distancia es el mismo que para el caso anterior: se observa una disminución brusca para distancias pequeñas y más suave para distancias mayores.

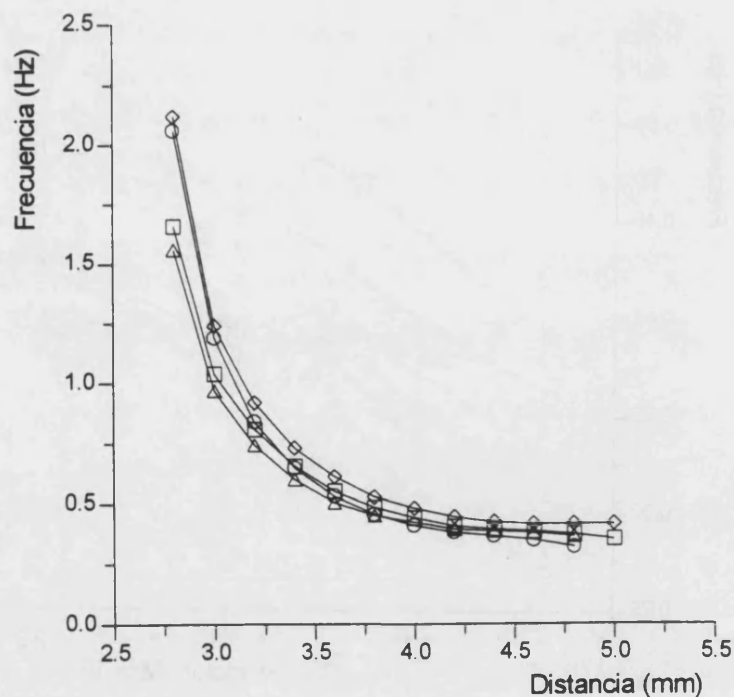


Figura V.20.- Variación de la frecuencia con la distancia para varias concentraciones de PAN en aceite de silicona: ○, $1,46 \times 10^{-4}$ M; □, $1,62 \times 10^{-4}$ M; △, $1,78 \times 10^{-4}$ M; ◇, $2,11 \times 10^{-4}$ M.

e) Estudio de la potencia mínima necesaria para que se produzcan las oscilaciones, para diferentes concentraciones y distancias

Se buscó la potencia mínima (valor crítico) a la que se producían las oscilaciones, para las disoluciones de PAN en aceite de silicona. Se utilizaron varias concentraciones de PAN en el intervalo $1,13 \times 10^{-4}$ - $2,11 \times 10^{-4}$ M, y se varió la distancia del haz de bombeo a la superficie libre del líquido. Se tomó como potencia mínima aquélla a la que las oscilaciones eran apreciables, para una ganancia de 4 en el amplificador, y no desaparecían al pasar unos minutos. En la Figura V.21 se ha representado la potencia mínima necesaria para la aparición de las oscilaciones en función de la distancia, para varias concentraciones. Para una distancia dada, la potencia mínima de bombeo disminuyó al aumentar la concentración, y esta disminución fue mayor para distancias grandes (Figura V.22). Para una misma concentración, la potencia mínima disminuyó con la distancia hasta los 3,0-3,4 mm y después aumentó, necesiéndose potencias elevadas para distancias mayores de 4,0 mm. Estas curvas coinciden con la curva límite que separa el estado estable y el inestable (Figura V.3). Como es lógico, al aumentar la concentración, la zona donde se producen las oscilaciones fue mayor, siendo predecible la existencia de una concentración límite, para una potencia de bombeo fija, por debajo de la cual no se produzcan las oscilaciones. De hecho, se probaron algunas concentraciones para las que fue imposible obtener oscilaciones.



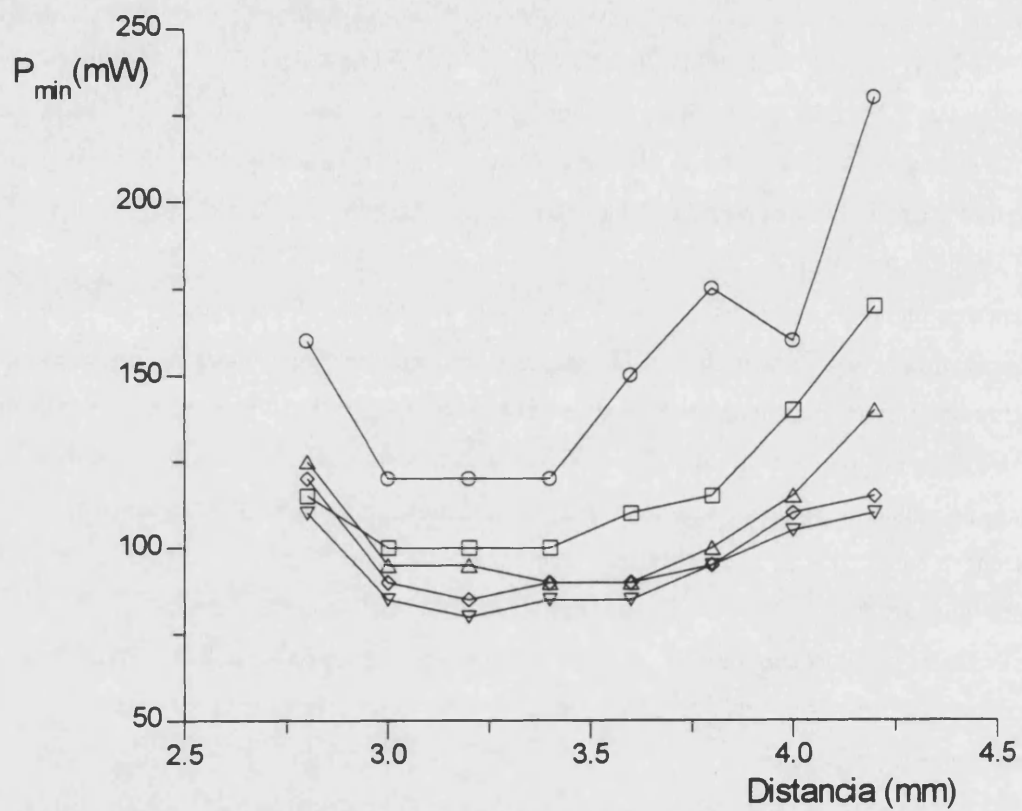


Figura V.21. - Variación de la potencia mínima necesaria para la aparición de las oscilaciones, para varias concentraciones de PAN en aceite de silicona: ○, $1,13 \times 10^{-4}$ M; □, $1,46 \times 10^{-4}$ M; △, $1,62 \times 10^{-4}$ M; ◇, $1,78 \times 10^{-4}$ M; ▽, $2,11 \times 10^{-4}$ M.

En la Figura V.22 se puede ver la dependencia respecto a la concentración, de la potencia mínima necesaria para la aparición de las oscilaciones, para diversas distancias. Como ya se ha visto, la variación es mayor para distancias grandes. La sensibilidad fue del orden de la encontrada en la experiencia anterior. Así, por ejemplo, ajustando por mínimos cuadrados la potencia mínima en mW, en función de la concentración molar, para una distancia de 4,2 mm (sin tomar el último punto), se tiene:

$$P_{\min} = 430 + 1,79 \times 10^6 [\text{PAN}] \quad r = 0.9993$$

Debe tenerse en cuenta que la medida de la potencia no es muy precisa, siendo la desviación estándar del orden de ± 5 mW.

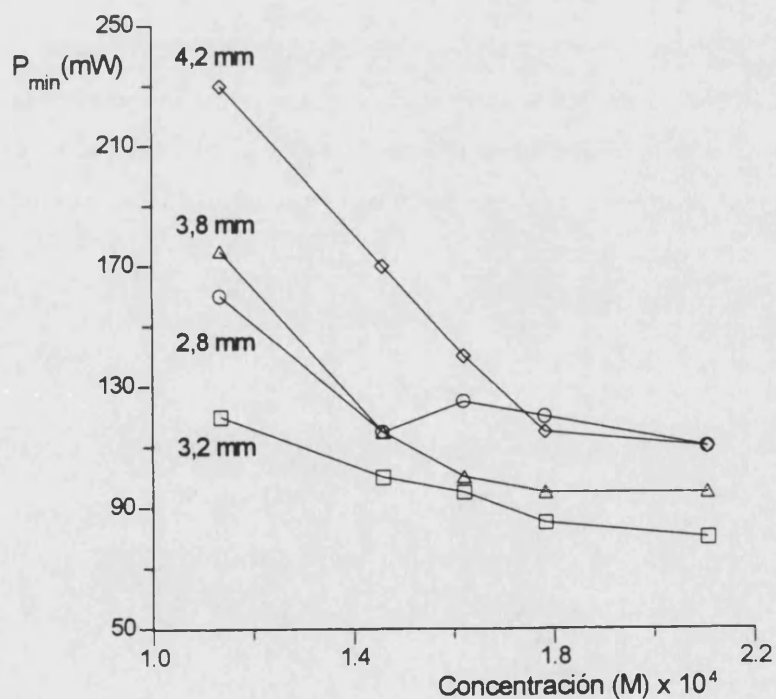


Figura V.22.- Variación con la concentración de la potencia mínima necesaria para la aparición de las oscilaciones, para diversas distancias (indicadas junto a cada línea).

f) Conclusiones

La relación entre la concentración y los parámetros de interés de las oscilaciones es, en ocasiones, bastante compleja. La existencia de diversos comportamientos oscilatorios de la lente térmica produce una variación poco regular de los distintos parámetros, dependiendo del intervalo de concentraciones estudiado. Por otro lado, se ha visto que en los casos en los que sí existe una relación más o menos regular entre algún parámetro y la concentración, la sensibilidad no es muy elevada. Estos factores, junto con el hecho de que, para obtener las oscilaciones se requieren disolventes poco habituales y concentraciones altas de especie absorbente, dificultan el desarrollo de alguna aplicación analítica del fenómeno. Únicamente la relación entre la distancia necesaria para obtener una frecuencia dada y la concentración podría resultar prometedora, dada la gran precisión con que puede medirse la distancia y fijarse la frecuencia, lo que permitiría medir pequeñas diferencias de concentración entre concentraciones relativamente grandes.

Aunque el fenómeno no tenga interés desde el punto de vista del desarrollo de aplicaciones analíticas, sí que lo tiene el estudio fundamental del mismo y su influencia en las medidas de lente térmica. Por otra parte, este estudio sirvió de base para abordar el trabajo presentado en el capítulo siguiente, en el que se establece una relación entre las oscilaciones de la lente térmica, en condiciones de bombeo modulado a una frecuencia fija, como es habitual en ELT, y el ruido de fondo.

**VI.- MODELIZACIÓN DEL RUIDO DE BAJA FRECUENCIA EN
ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA**

VI.- MODELIZACIÓN DEL RUIDO DE BAJA FRECUENCIA EN ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA

VI.1.- Introducción

En la segunda parte del trabajo, realizado en colaboración con el *Laboratoire d'Energétique des Systèmes et Procédés*, se estudió la posible relación entre las oscilaciones de la lente térmica y el ruido de fondo de baja frecuencia, característico de la espectrometría de lente térmica. En el capítulo IV, se hizo un estudio sobre el ruido de fondo en diversos disolventes, observándose diferencias entre ellos, y se discutieron sus posibles causas. La magnitud de este ruido y la naturaleza de los disolventes que presentaron más ruido, que son precisamente aquéllos en los que tiene lugar el fenómeno de las oscilaciones de lente térmica, así como la frecuencia de bombeo utilizada, 4 Hz, del orden de la frecuencia de las oscilaciones, nos hizo pensar que podría existir una relación entre el ruido de baja frecuencia que afecta a las medidas de ELT y las oscilaciones de la lente térmica. En el capítulo IV, no se llegó a establecer un modelo que describiera el ruido de baja frecuencia en ELT.

A partir del estudio que se expone a continuación, se intentó comprobar si se producen oscilaciones en las condiciones habituales de trabajo, qué frecuencia tienen, cuál es su causa y si están correlacionadas o no con la dispersión de las medidas de ELT. Se pretende también explicar la naturaleza de una de las fuentes de ruido en ELT, comprender las diferencias de ruido para distintos disolventes, y buscar las condiciones más adecuadas de medida (principalmente, la frecuencia óptima de modulación del haz de bombeo), para mejorar la relación señal/ruido y reducir los límites de detección.

VI.2.- Fundamento teórico

En el capítulo IV se ha constatado que el ruido en ELT está relacionado con los movimientos convectivos en el seno del líquido. Por ello, es razonable suponer que existe una relación entre la convección y las oscilaciones de la lente térmica. Por otro lado, en el capítulo V se ha visto que en el fenómeno de las oscilaciones de la lente térmica intervienen las fuerzas de Arquímedes y las fuerzas

de tensión superficial. Sin embargo, en las condiciones habituales de medida en ELT (lejos de la superficie del líquido), únicamente actuarían las fuerzas de Arquímedes, que empujan hacia arriba el paquete de líquido caliente generado por la absorción del haz de bombeo. El calor se disiparía más o menos rápidamente al entorno en función de la conductividad térmica del disolvente, antes o después de que el paquete de líquido caliente alcance la superficie. En una primera aproximación, supondremos que la posible llegada de líquido caliente a la superficie no afecta a las medidas tomadas lejos de la superficie.

El movimiento convectivo de la columna de líquido caliente es, probablemente, la causa del ruido de baja frecuencia. En nuestra opinión, que contrastaremos a continuación con los datos experimentales, el líquido caliente y la corriente convectiva asociada oscilan a su propia frecuencia natural, ν_0 . Para demostrar este hecho, definiremos en primer lugar, los límites geométricos de la columna de líquido caliente, y luego analizaremos las causas que, a nuestro entender, la convierten en un oscilador armónico. Las dimensiones de la columna de líquido caliente vendrán impuestas por la distribución energética del haz de bombeo. En principio, la columna de líquido caliente ocupará toda la celda entre las ventanas de entrada y salida de la radiación (Figura VI.1). El radio de la columna debe ser mínimo en la cintura del haz, mantenerse relativamente estrecho antes de la cintura, y ensancharse más rápidamente después de la misma.

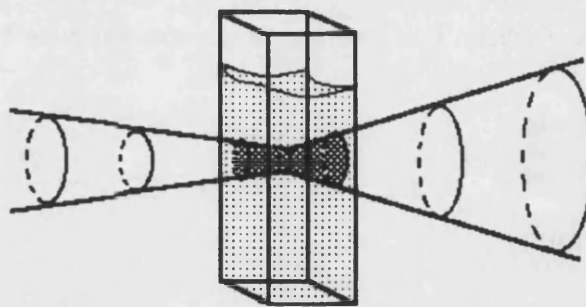


Figura VI.1. - Distribución energética del haz de bombeo al atravesar la celda. El diámetro del haz ha sido exagerado

Desde el punto de vista temporal, el bombeo modulado hace que el gradiente térmico aumente y disminuya a la frecuencia de modulación. Sin embargo, y salvo a frecuencias muy bajas, la desaparición del gradiente térmico hacia el final de los semiciclos de bombeo en los que el haz está cortado, no implica desaparición de la convección. La observación directa indica que la convección no desaparece hasta varios segundos después de cortar el haz de bombeo.

La oscilación de la columna de líquido caliente se producirá como consecuencia del desplazamiento periódico del equilibrio entre las distintas variables implicadas: el comienzo y las irregularidades del bombeo, la densidad y el coeficiente térmico de la densidad, que originan la corriente de convección, y la disipación térmica, la viscosidad y el coeficiente térmico de la viscosidad, que limitan la convección. Cabe la posibilidad de que las oscilaciones no se produzcan sólo en sentido vertical, como si se debieran a variaciones de intensidad de la corriente convectiva, sino también en sentido horizontal, esto es, en el sentido en el que actuarían los cambios de dirección de la corriente convectiva.

La discusión que sigue y, en especial, el tratamiento matemático posterior, están basados en buena medida en la teoría de las vibraciones y ondas, para lo que se hará referencia al texto de Frech [117]. Supondremos que el sistema se comporta como un oscilador de frecuencia ν_0 (frecuencia natural de oscilación), el cual a su vez está bombeado externamente a una frecuencia distinta ν (frecuencia del modulador del haz). Se trata así, de un experimento de vibración forzada, correspondiendo en concreto a un oscilador con impulsión armónica. La modulación del bombeo introduce, por tanto, una variable más, que no existe cuando el bombeo es continuo, por lo que no es de extrañar que se presenten fenómenos oscilatorios que no se observaron con bombeo continuo, como los estudiados en el capítulo V. Por otro lado, y para mayor simplicidad, con bombeo periódico sería conveniente evitar estados oscilatorios, observados en muchos de los experimentos de capítulo anterior, y que han sido explicados como fenómenos en los que la oscilación debida a las fuerzas de Arquímedes interacciona con la oscilación de la superficie del líquido debida al efecto Marangoni. Para evitar este tipo de oscilaciones, bastará con alejarse de la superficie libre del líquido, utilizar disolventes apropiados, potencias bajas, o cualquier otro medio para no alcanzar las condiciones críticas que ya se han comentado. Sin embargo, hay que señalar que los experimentos que se mostrarán más adelante, no fueron diseñados con esta finalidad, por lo que en algunos de ellos se observa además del movimiento

del oscilador con impulsión armónica, que obedece a las fuerzas de Arquímedes, cierta participación del efecto Marangoni.

Consideremos ahora la forma en la que la oscilación natural del líquido caliente, y de la corriente convectiva asociada, interaccionan con la señal de lente térmica. Se puede describir la señal de lente térmica como la resultante de dos oscilaciones superpuestas:

- i) La oscilación térmica, debida a la formación y disipación alternadas del gradiente térmico, producida por la absorción del haz de bombeo, y que constituye precisamente el fenómeno que queremos producir y medir.
- ii) La oscilación mecánica, debida al equilibrio entre las fuerzas de Arquímedes y los diversos parámetros físicos implicados en la convección.

Supongamos que en ausencia de oscilación mecánica, esto es, sin modular el bombeo, se ha centrado la lente térmica, de modo que existe una diferencia máxima de intensidades entre la formación y la disipación del gradiente térmico. Si existe oscilación mecánica, ésta produce el «descentrado» del efecto, generando una señal «mecánica» que se superpone a la puramente térmica. Por sencillez, supondremos que la oscilación térmica viene descrita por una onda sinusoidal perfecta:

$$I = I_0 [\cos(\nu t) + x] \quad (\text{VI.1})$$

donde x representa el efecto superpuesto de la oscilación mecánica. Esta es una aproximación muy grosera, pero perfectamente válida para nuestro propósito, que no es otro que describir el efecto de la oscilación mecánica superpuesta a la oscilación térmica.

El movimiento de un oscilador armónico amortiguado, sometido a impulsión armónica externa, viene descrito por la siguiente ecuación:

$$x = \frac{A}{\nu' \left[\left(\frac{1}{\nu'} - \nu' \right)^2 + \frac{1}{Q^2} \right]^{1/2}} \cos(\nu t) + F \cos(\nu_0 t) \quad (\text{VI.2})$$

donde A es el cociente entre la fuerza impulsora externa y la masa del oscilador. En la discusión que sigue, supondremos que A es una constante, lo que probablemente es cierto para una potencia de bombeo fija, en un punto dado de la celda, y para un medio y concentración de cromóforo dados. Por otra parte, ν' es la frecuencia impuesta en unidades de frecuencia natural del oscilador mecánico, esto es:

$$\nu' = \frac{\nu}{\nu_0} \quad (\text{VI.3})$$

El parámetro de calidad del sistema oscilante, Q , evalúa la magnitud del efecto disipativo de energía del oscilador, y tiene un valor bastante mayor que la unidad cuando el sistema está poco amortiguado. Se tiene:

$$Q = \frac{\nu_0}{\gamma} \quad (\text{VI.4})$$

donde γ es la inversa del tiempo necesario, cuando cesa la impulsión externa, para que la energía del sistema oscilante se reduzca a $1/e$ de su valor inicial. Finalmente, el término $F \cos(\nu_0 t)$ tiene en cuenta los efectos transitorios que afectan al oscilador débilmente amortiguado, cuando éste inicia su movimiento bajo el impulso externo, o cuando se cambian las condiciones en las que se produce la oscilación.

Un oscilador armónico amortiguado, movido por impulsión externa sinusoidal, tiende a moverse a la frecuencia impuesta, si bien, al comienzo de la oscilación, o cuando se produce algún cambio en las condiciones experimentales, aparecen oscilaciones transitorias a la frecuencia natural del oscilador, ν_0 . Si el oscilador mecánico está poco amortiguado (Q es bastante mayor que la unidad), los efectos transitorios se alargan considerablemente en el tiempo.

Combinando ahora las ecuaciones VI.1 y VI.2 se obtiene:

$$I = I_0 \left[1 + \frac{A}{v' \left[\left(\frac{1}{v'} - v' \right)^2 + \frac{1}{Q^2} \right]^{1/2}} \right] \cos(vt) + I_0 F \cos(v_0 t) \quad (\text{VI.5})$$

Simplificando la escritura, se tiene:

$$I = I_0 [(1 + A') \cos(vt) + F \cos(v_0 t)] \quad (\text{VI.6})$$

La amplitud de la oscilación mecánica depende de A' y de F ; este último coeficiente describe las variaciones temporales o transitorias de la amplitud,. Estas últimas tienden a desaparecer con mayor o menor rapidez, dependiendo de que el oscilador esté fuertemente o débilmente amortiguado, respectivamente. Por tanto, A' y F representan un incremento de origen mecánico, positivo o negativo, de la señal de lente térmica, y el hecho de que A' y F tiendan a reforzar o a debilitar la señal de lente térmica depende, probablemente, del punto de observación o centrado del efecto sobre la ventana de entrada al detector.

Por otro lado, A' posee un máximo en $v' = 1$, tanto más acusado cuanto mayor es Q , lo que se puede observar en la representación mostrada en la Figura VI.2, para diversos valores de Q . En principio, es posible exaltar la sensibilidad de las medidas de ELT centrando la lente térmica, de modo que A' sea positivo, y que las oscilaciones mecánicas de la lente refuercen el efecto de reducción de intensidad en el centro del haz de prueba, que se produce al formarse el gradiente térmico. Por otra parte, si $v' = 1$, se tiene $F=0$, por lo que la resonancia debe implicar un aumento importante de la relación señal/ruido.

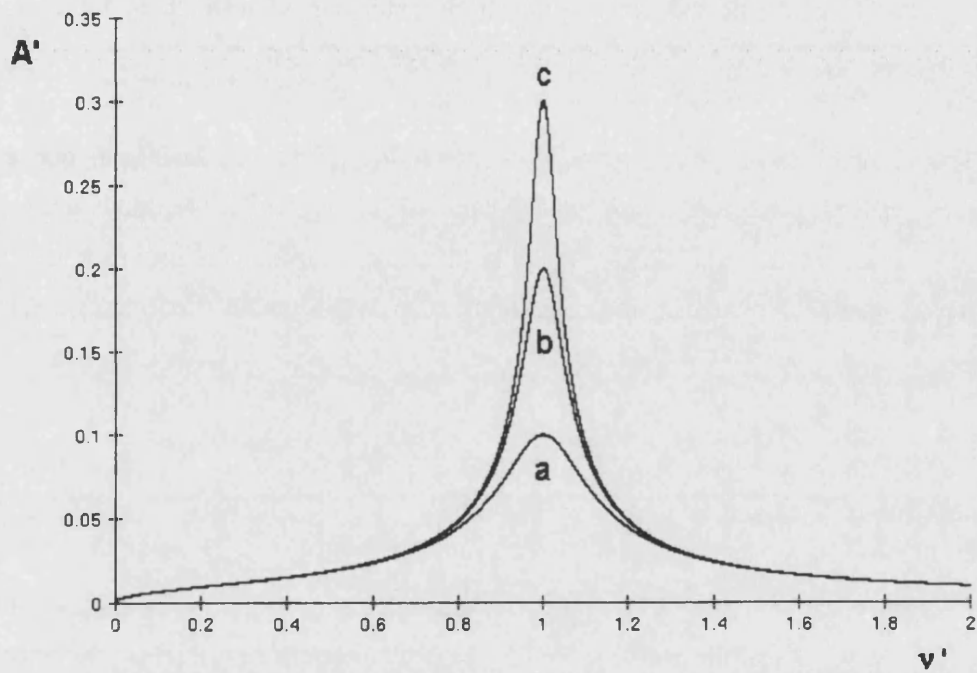


Figura VI.2.- Representación de A' en función de v' , para tres valores de Q : (a) 5, (b) 10 y (c) 15. Para la obtención de A' se ha tomado el valor $A=0,02$.

VI.3.- Parte experimental

a) Instrumentación y reactivos

Para estudiar la posible relación entre el ruido de las medidas de ELT y las oscilaciones de la lente térmica, se reprodujo en el LESP el montaje utilizado en el Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, insertando un obturador rotatorio en el haz de bombeo, e introduciendo un láser de He-Ne como haz de prueba (ver capítulo III).

Se utilizó como colorante 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN, Scharlau, Barcelona), que se disolvió en la mínima cantidad posible de etanol (calidad para análisis, Prolabo), y se diluyó posteriormente con aceite de silicona (Rhodorsil Silicones, Rhones-Poulenc, Francia). La disolución de medida se preparó a partir de una disolución madre de PAN en aceite de silicona, de concentración $8,1 \times 10^{-4}$ M.

b) Procedimiento

Como en el capítulo anterior, las experiencias se realizaron en una habitación interior cerrada, donde se encontraba el espectrómetro de ELT, y cuya temperatura se mantenía casi constante. La disolución de medida se introdujo en la habitación, al menos 30 min antes de realizar las medidas, lo que aseguró el equilibrio térmico con el ambiente. Además, la celda de medida de 0,5 cm de paso óptico x 1 cm de anchura, se mantuvo cerrada en todo momento, antes y durante las medidas.

La medida del cero de distancias se realizó como se ha descrito en el capítulo V (apartado V.2.b). La potencia del láser de Ar^+ se fijó con el medidor de potencia, a 50 mW. La señal temporal se visualizó mediante un programa de ordenador, elaborado por miembros del LESP, y se almacenó a razón de 2000 lecturas por segundo, para ser tratada posteriormente.

Se realizaron varias series de medidas con una disolución de PAN $1,62 \times 10^{-4}$ M en aceite de silicona. En estas series, se tomaron medidas de lente térmica para distintas frecuencias de modulación del haz, a distancias crecientes del haz de bombeo a la superficie del líquido. Una vez tomadas las

medidas de la señal temporal, se obtuvieron las señales de lente térmica como la diferencia media entre los primeros veinte máximos y mínimos de la intensidad. Como medida del ruido (σ), se tomó la desviación estándar de las diferencias entre máximos y mínimos de intensidad consecutivos. A partir de las señales obtenidas en el dominio del tiempo, se obtuvo también el espectro de transformada de Fourier en el dominio de la frecuencia.

VI.4.- Resultados y discusión

a) Relación entre las oscilaciones de la lente térmica y la viscosidad

Bazhenov y col. estudiaron el fenómeno de las oscilaciones de la lente térmica en función de la viscosidad del disolvente y del diámetro de la celda [118]. Utilizaron para este estudio una celda cilíndrica y los siguientes disolventes: metanol, etanol, alcohol alílico, *n*-propanol, *n*-butanol y ciclohexano. En la Tabla VI.1, se recogen los valores numéricos de algunas propiedades físicas de diversos disolventes, junto a los valores de ruido de los disolventes en ELT en ausencia de especies absorbentes, σ_0^* , obtenidos en el estudio mostrado en el capítulo IV.

Tabla VI.1.- Viscosidad, conductividad térmica y valore medio de σ_0^* , para algunos disolventes.

Disolvente	η (cP) ^a	κ (mW cm ⁻¹ °C ⁻¹) ^b	σ_0^* (mV)	$k \times 10^3$
Agua	0,89	5,95	3,9	9,2
Metanol	0,55	2,02	7,4	13,7
Etanol	1,10	1,67	7,4	9,1
<i>n</i> -Propanol	2,256	1,56	-	-
Alcohol alílico	1,363	1,795	-	-
<i>n</i> -Butanol	2,948	1,53	13,1	13,3
<i>n</i> -Pentanol	4,65	1,62	17,7	6,7
Ciclohexano	1,02	1,23	-	-

^a Ref. [106]; ^b ref. [12].

Bazhenov y col. observaron que para el metanol las oscilaciones sólo duraban unos pocos ciclos [118]. Para ciclohexano, etanol y alcohol alílico, las oscilaciones tenían lugar para un intervalo limitado de diámetros de celda, mientras que para el *n*-propanol y el *n*-butanol observaron las oscilaciones para todos los diámetros de celda estudiados. De estos resultados, se deduce que las oscilaciones se favorecen al aumentar la viscosidad del disolvente, mientras que el efecto desaparece al aumentar su conductividad térmica. Así, la viscosidad del agua favorecería la aparición de oscilaciones, pero no se observa ningún efecto debido a su elevada conductividad térmica. En la serie de alcoholes, las oscilaciones se favorecen al aumentar la cadena del alcohol. Los estudios realizados por nosotros y mostrados en el capítulo IV indicaron que el aumento del ruido también se ve favorecido en este sentido, lo que puede apreciarse en la Tabla VI.1.

b) Modelización del ruido

Para estudiar el efecto transitorio debido a la superposición de las oscilaciones térmica y mecánica, se pueden suponer valores fijos de los parámetros de la ecuación VI.5, A, F y Q. La oscilación mecánica es, probablemente, de menor amplitud que la oscilación térmica. Para reflejar este extremo supondremos que A' y F son, en valor absoluto, bastante menores que la unidad. Por otra parte, es probable que A' sea menor que cero, si bien, este extremo puede depender de cómo se haya centrado la lente térmica. En cualquier caso, en los ejemplos que siguen se han supuesto para la frecuencia natural de oscilación y para los parámetros A, F y Q, los valores arbitrarios que figuran al pie de los gráficos de la Figura VI.3. Para valores de $v \neq v_0$ ($v' \neq 1$), la ecuación VI.5 predice un ruido de baja frecuencia superpuesto a la oscilación de la lente térmica. El aspecto de las representaciones es idéntico al observado en multitud de medidas experimentales (Figuras VI.4 a VI.6).

A valores bajos de la frecuencia de bombeo (Figura VI.3a, $\nu=0,3$ Hz, $\nu_0=2$ Hz, $\nu'=0,3/2$), puede observarse la oscilación mecánica superpuesta a la térmica. Como ya se ha comentado, el ruido es nulo para $\nu=\nu_0$ (Figura VI.3f); éste también desaparece para $\nu=1$ Hz, subarmónico de la frecuencia natural de oscilación (Figura VI.3c). Para $\nu=4$ y 6 Hz (armónicos $2\nu_0$ y $3\nu_0$) (Figura VI.3h y VI.3i), la señal de lente térmica presenta un valor máximo cada 2 o 3 máximos relativos, dependiendo del orden del armónico. Para armónicos de orden mayor, el máximo de la señal también aparece cada n máximos relativos y, además, los valores intermedios y mínimos de la señal se repiten también cada n máximos relativos (Figura VI.3j).

En la Figura VI.3b, VI.3d, VI.3e y VI.3g, también se han representado frecuencias de bombeo cercanas a la de resonancia y a las de los armónicos. Se puede observar que para estos valores, aunque la señal también presenta un comportamiento periódico, la dispersión de la señal de lente térmica, tomada como la diferencia entre máximos y mínimos consecutivos, es mayor que para los casos comentados anteriormente. Por lo tanto, al ser menor el ruido obtenido a la frecuencia de resonancia y a la de los armónicos, la relación señal/ruido será mayor, lo que permitirá la obtención de menores límites de detección.

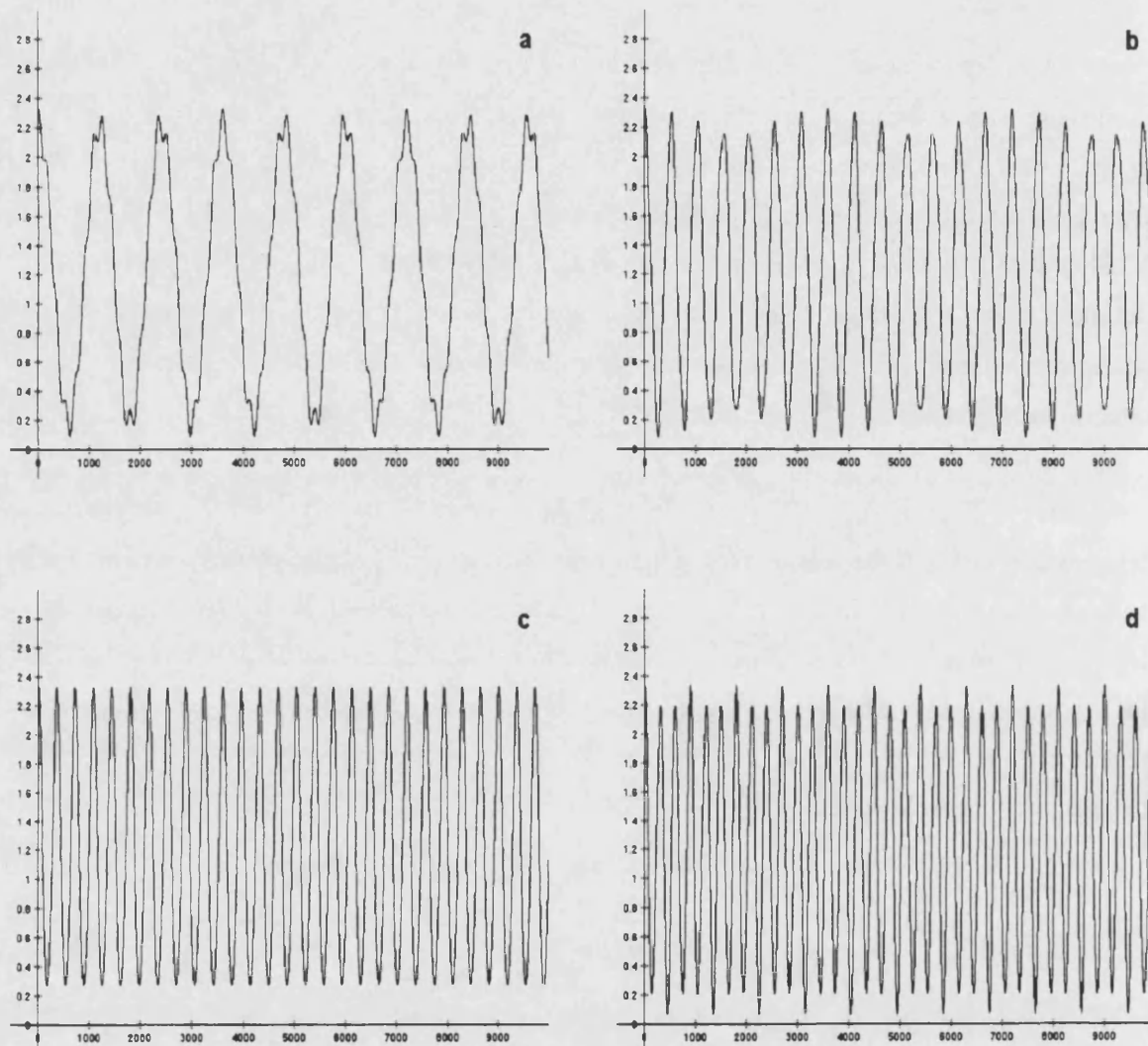
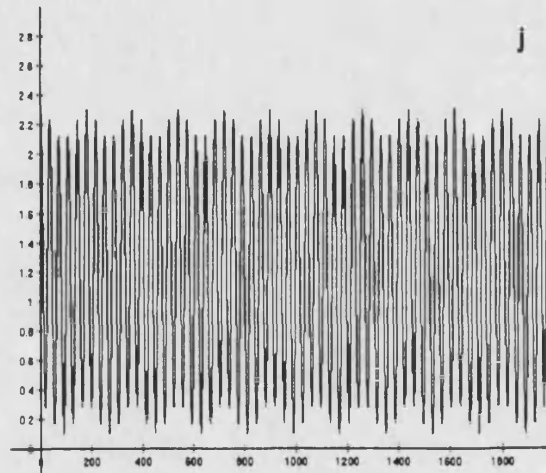
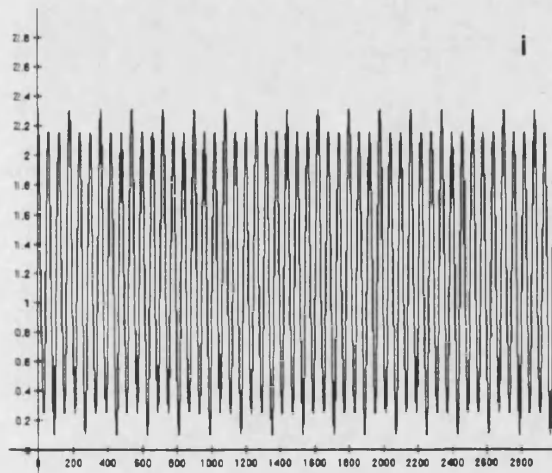
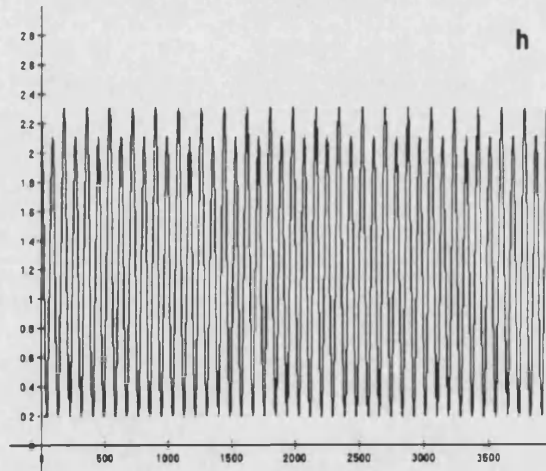
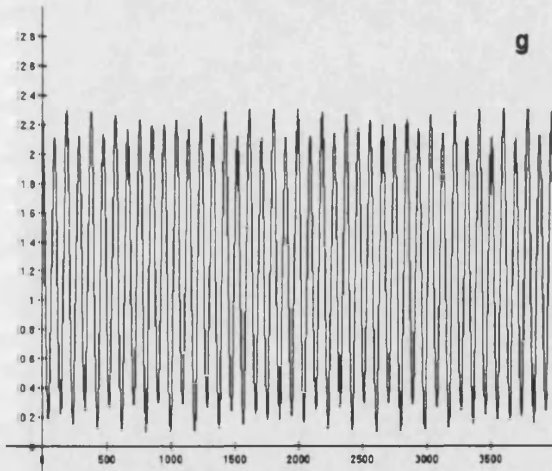
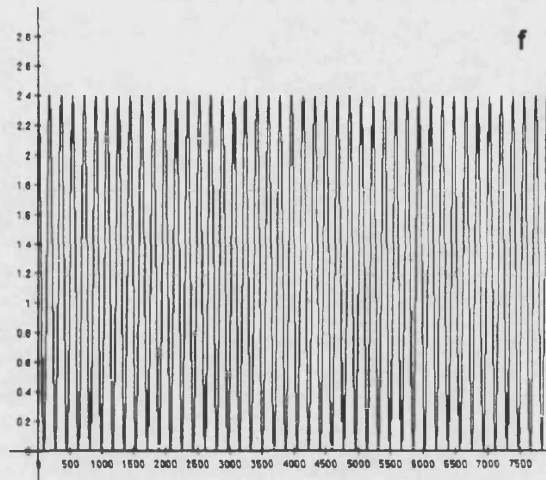
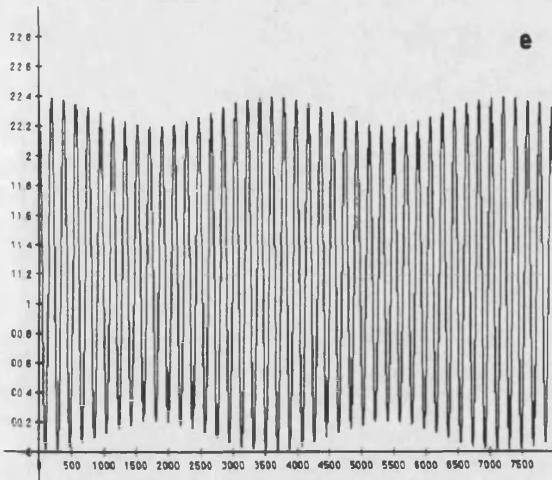


Figura VI.3. - Representación de la ecuación VI.5. En todos los casos los parámetros toman los valores $A=0,02$, $F=0,1$, $v_0=2$ Hz y $Q=5$. La frecuencia de bombeo es: (a) 0,3 Hz, (b) 0,7 Hz, (c) 1 Hz, (d) 1,2 Hz, (e) 1,9 Hz, (f) 2 Hz, (g) 3,8 Hz, (h) 4 Hz, (i) 6 Hz, y (j) 10 Hz.



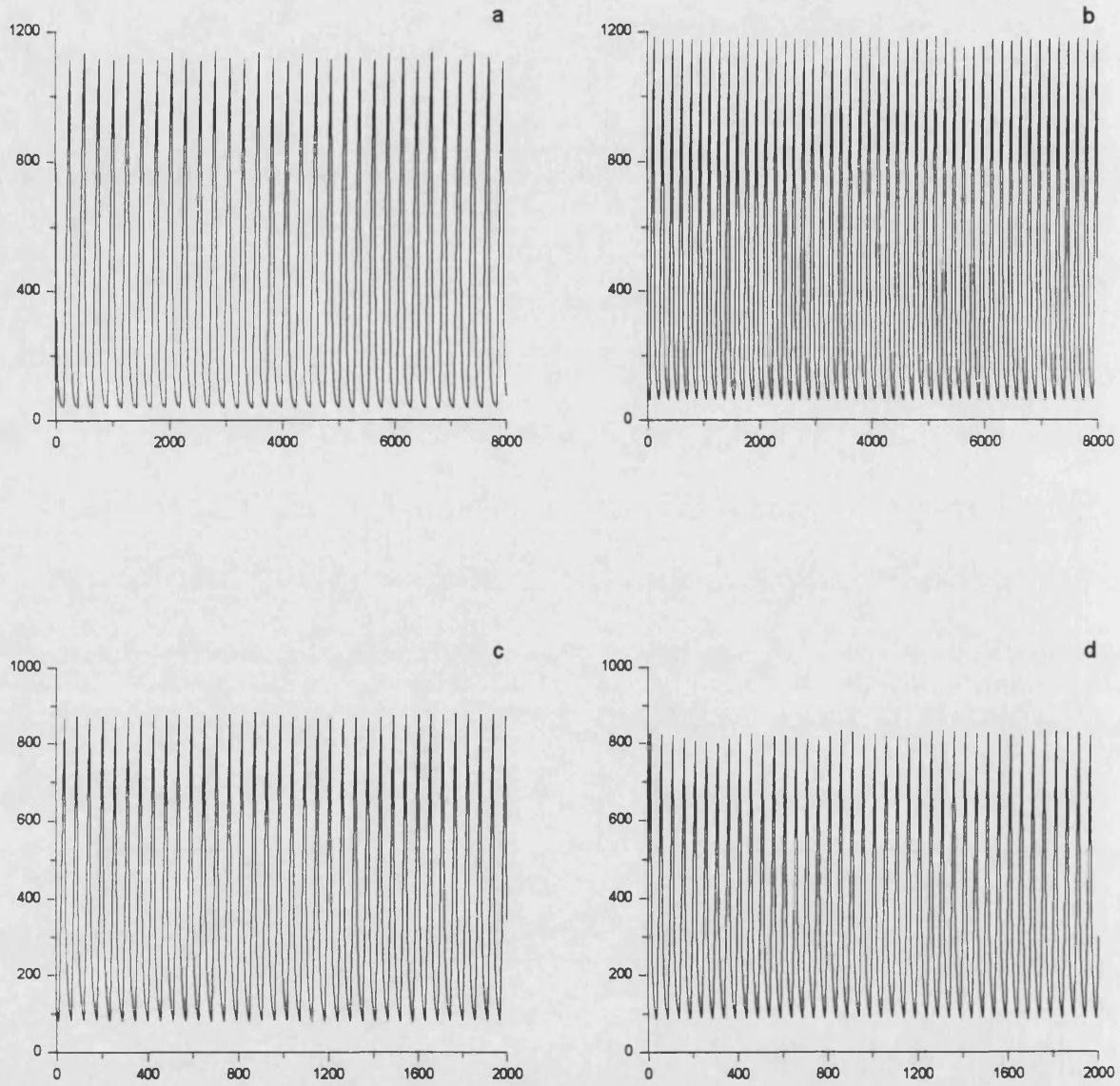


Figura VI.4.- Valores experimentales de intensidad frente al tiempo para $d = 10,0$ mm, y varias frecuencias de bombeo: (a) 2 Hz, (b) 3 Hz, (c) 9 Hz y (d) 10 Hz.

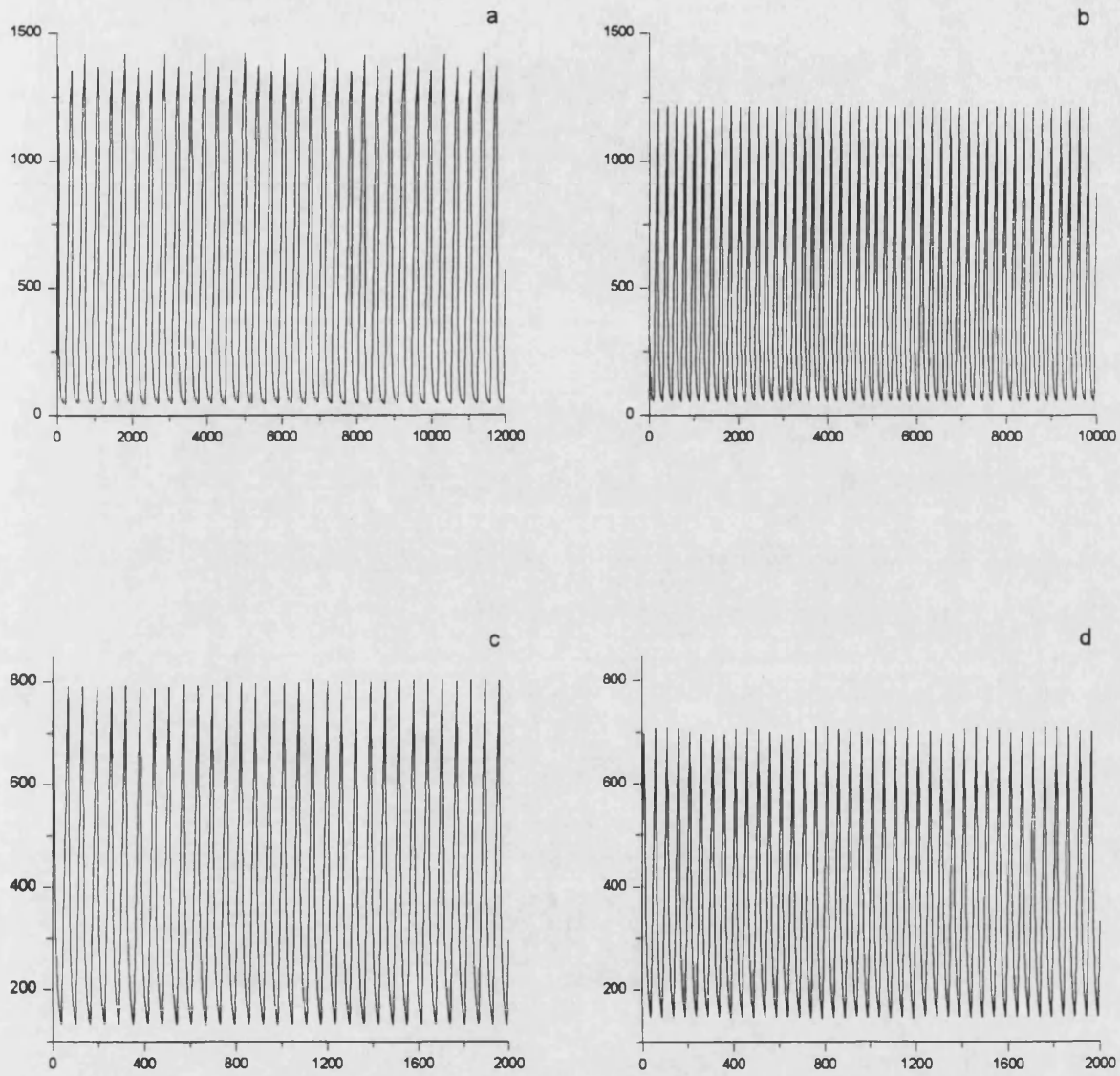


Figura VI.5.- Valores experimentales de intensidad frente al tiempo para $d = 3,0$ mm, y varias frecuencias de bombeo: (a) 1,5 Hz, (b) 2,5 Hz, (c) 8 Hz y (d) 10 Hz.

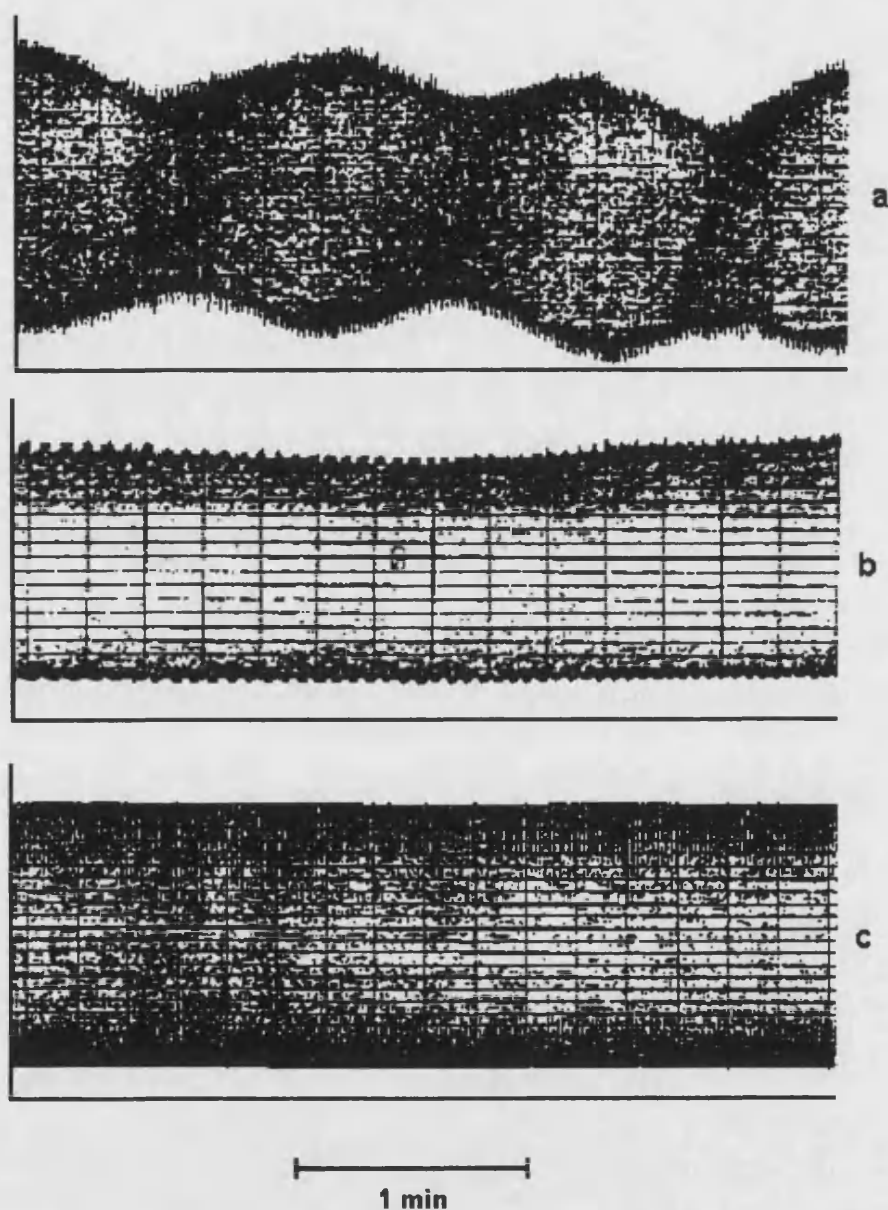


Figura VI.6.- Señales de lente térmica, obtenidas con el espectrómetro de lente térmica del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, para una disolución de rojo de metilo $1,8 \times 10^{-6}$ M en una mezcla etanol-agua 1:1. La línea de 514,5 nm del láser de Ar^+ se moduló a 2 Hz, y la potencia se fijó a 200 mW. La velocidad del papel registrador fue de 40 mm min^{-1} . Las señales muestran el ruido de baja frecuencia: (a) ruido de gran amplitud, raramente observado; (b) ruido de baja amplitud; (c) reducción del ruido a un nivel inapreciable sustituyendo en el detector la máscara de orificio por una rendija horizontal.

c) Variación del ruido con la frecuencia de bombeo

Algunos ejemplos de series temporales experimentales de valores de la lente térmica para $d = 10,0$ mm y $3,0$ mm, y diversas frecuencias de bombeo, se muestran en la Figuras VI.4 y VI.5. Superpuesto a la oscilación térmica producida por el modulador de haz, se observa el ruido de baja frecuencia característico. La amplitud de este ruido es pequeña para los casos representados, lo que indica que el valor de F de la ecuación VI.5 es pequeño en las condiciones en que se tomaron las medidas. En otras experiencias, tal como la mostrada en el Figura VI.6, se han observado amplitudes mayores.

Para ciertos valores de la frecuencia de bombeo, el ruido es mínimo, tal como para $\nu=3$ Hz, donde resulta inapreciable (Figura VI.4b). Como hipótesis de trabajo podemos suponer que la desaparición del ruido de baja frecuencia cuando $\nu=\nu_0=3$ Hz, se produciría al estar el sistema mecánico en resonancia con la frecuencia de impulsión externa. En resonancia no se pueden observar desplazamientos de la lente térmica debidos a la frecuencia natural del oscilador mecánico, por lo que la ecuación VI.5 predice un máximo de la relación señal/ruido cuando $\nu=\nu_0$. Dada la naturaleza no sinusoidal de la oscilación mecánica, es de esperar también, que se produzcan máximos relativos de la misma en $\nu = n\nu_0$ ($n=1, 2, 3, \dots$), esto es, para los armónicos, en los que el ruido de baja frecuencia disminuirá con el consiguiente aumento de la relación señal/ruido. En las Figuras VI.7 a VI.9, se ha representado la relación señal/ruido y el ruido, en función de ν , para una distancia del haz a la superficie libre del líquido de $d=10, 3$ y $2,5$ mm, respectivamente.

Comenzaremos por comentar la figura obtenida con $d=10$ mm (Figura VI.7), que con toda probabilidad está exenta de participación del efecto Marangoni. Se observa un máximo de la relación S/σ para $\nu=3$ Hz, coincidiendo con un mínimo del ruido. Según se ha indicado, es probable que ésta sea la frecuencia natural del oscilador, lo que se confirmaría por la presencia de máximos a 6 Hz (menos acusado) y 9 Hz (más acusado), armónicos de ν_0 que aparecerían debido a la naturaleza no sinusoidal de la señal.

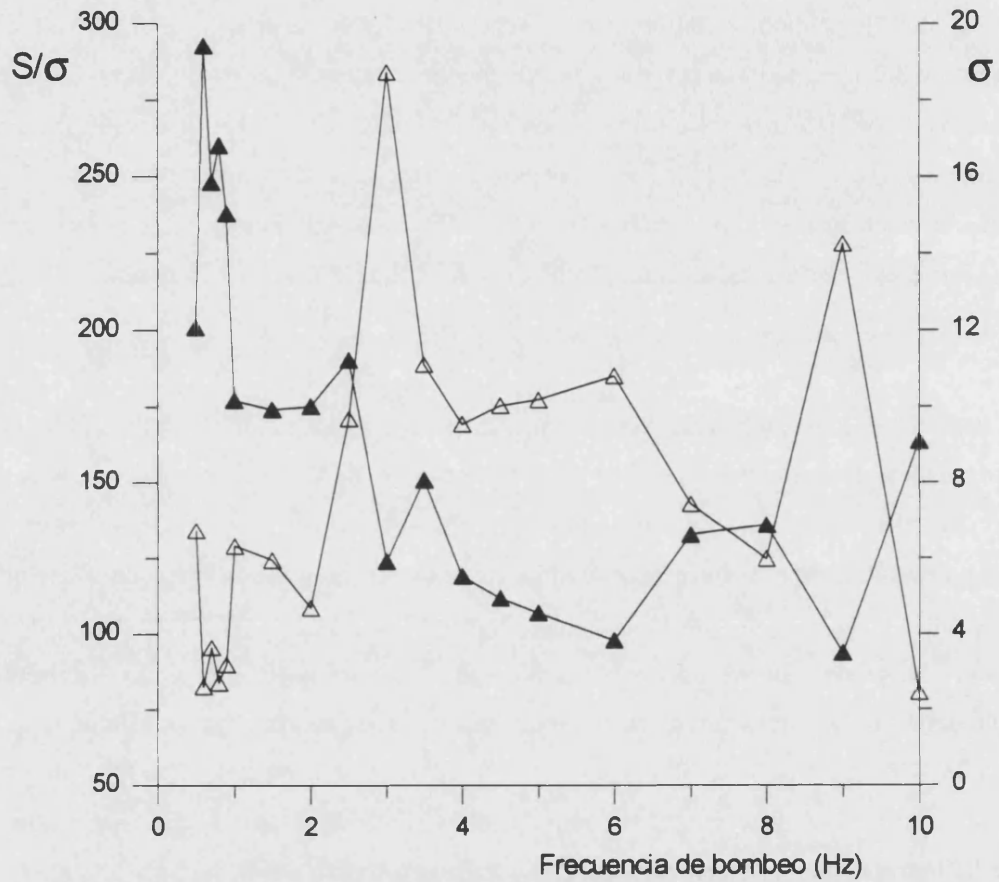


Figura VI.7.- Variación del ruido, σ (▲) y de la relación señal/ruido, S/σ (Δ), en función de la frecuencia de bombeo, para una distancia del haz de bombeo a la superficie libre del líquido de 10,0 mm.

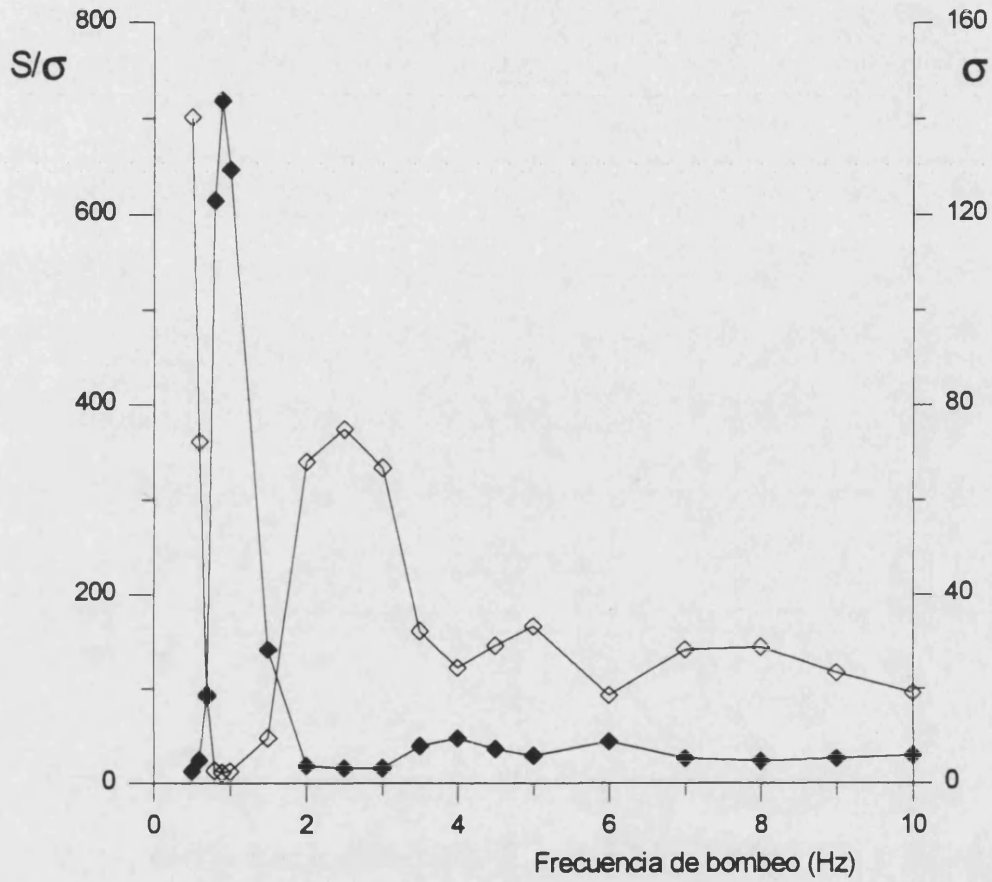


Figura VI.8. - Variación del ruido σ (\blacklozenge) y de la relación señal/ruido, S/σ (\diamond), en función de la frecuencia de bombeo, para una distancia del haz de bombeo a la superficie libre del líquido de 3,0 mm.

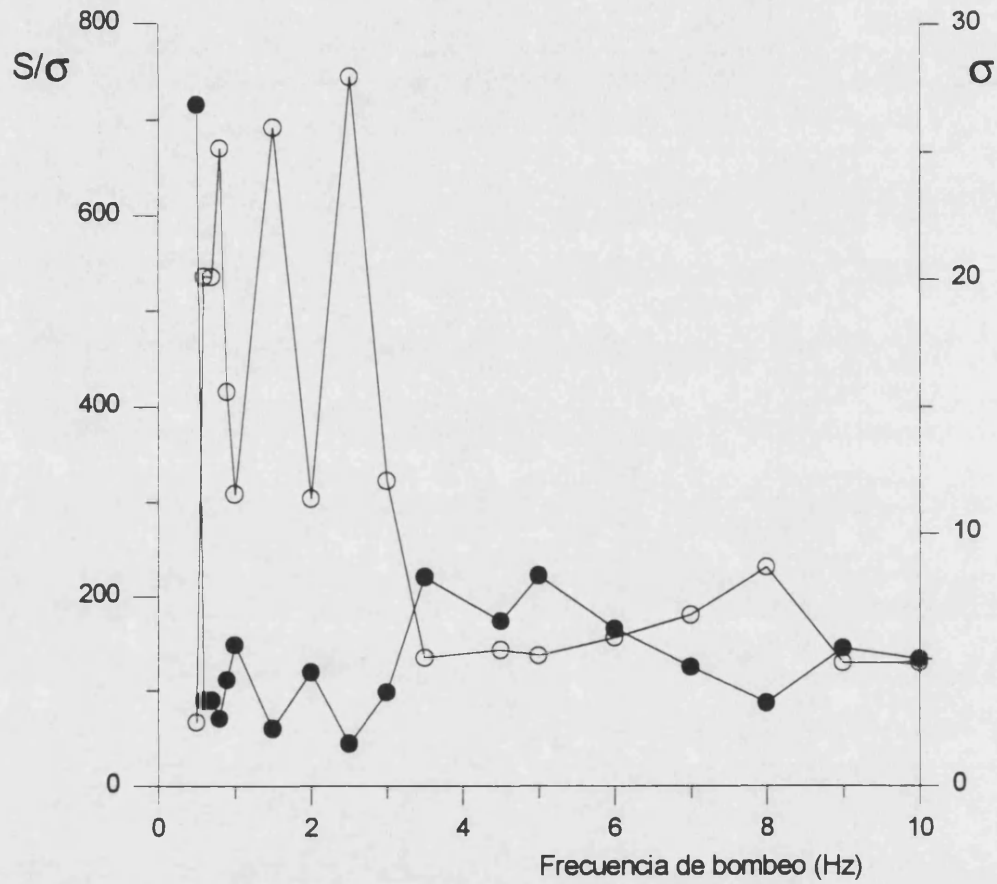


Figura VI.9.- Variación del ruido, σ (●) y de la relación señal/ruido, S/σ (○), en función de la frecuencia de bombeo, para una distancia del haz de bombeo a la superficie libre del líquido de 2,5 mm.

Examinemos ahora las Figuras VI.8 y VI.9, obtenidas a $d=3,0$ y $2,5$ mm, respectivamente. Se observan máximos de S/σ a $\nu=2,5$ Hz, acompañados de armónicos poco acusados hacia 5 Hz (no se observa en la serie obtenida para $d=2,5$ mm), y $7,5$ Hz. Por lo tanto, los resultados coinciden satisfactoriamente con lo observado a $d=10$ mm, teniendo en cuenta que las diferencias pueden explicarse por la proximidad a la superficie.

Nos referiremos ahora al espectro de potencia de la transformada de Fourier. En las Figuras VI.10 y VI.11, se observan las representaciones correspondientes a las series temporales de las Figuras VI.7 y VI.8, respectivamente. En los espectros, aparece un máximo a la frecuencia de bombeo, acompañado de sus correspondientes armónicos y subarmónicos. Sin embargo, el ruido de baja frecuencia, que se observa muy bien sobre el registro directo de la intensidad frente al tiempo, da lugar a picos inapreciables sobre el espectro de transformada de Fourier. Debe tenerse en cuenta que en el registro directo, la amplitud de las oscilaciones mecánicas es de escasa intensidad, en comparación con las oscilaciones generadas a la frecuencia impuesta, ν , lo que es probablemente, la causa de su insignificante incidencia sobre el espectro de la transformada. Aquí cabe concluir que la transformada de Fourier de las señales intensidad-tiempo no es una herramienta apropiada para la observación y el estudio del ruido de baja frecuencia.

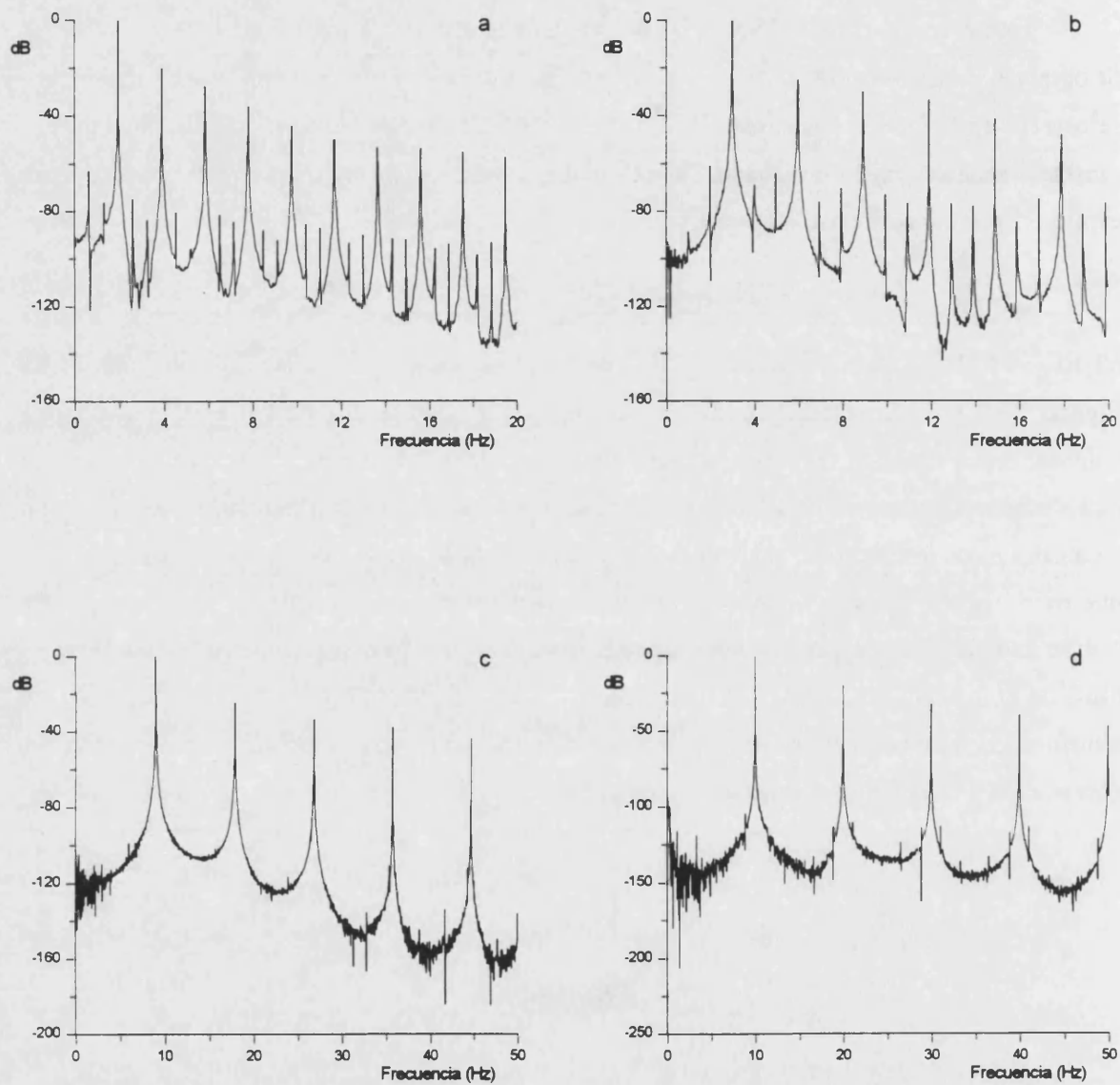


Figura VI.10.- Espectros de potencia de transformada de Fourier, para $d = 10,0$ mm, y varias frecuencias de bombeo: (a) 2 Hz, (b) 3 Hz, (c) 9 Hz y (d) 10 Hz.

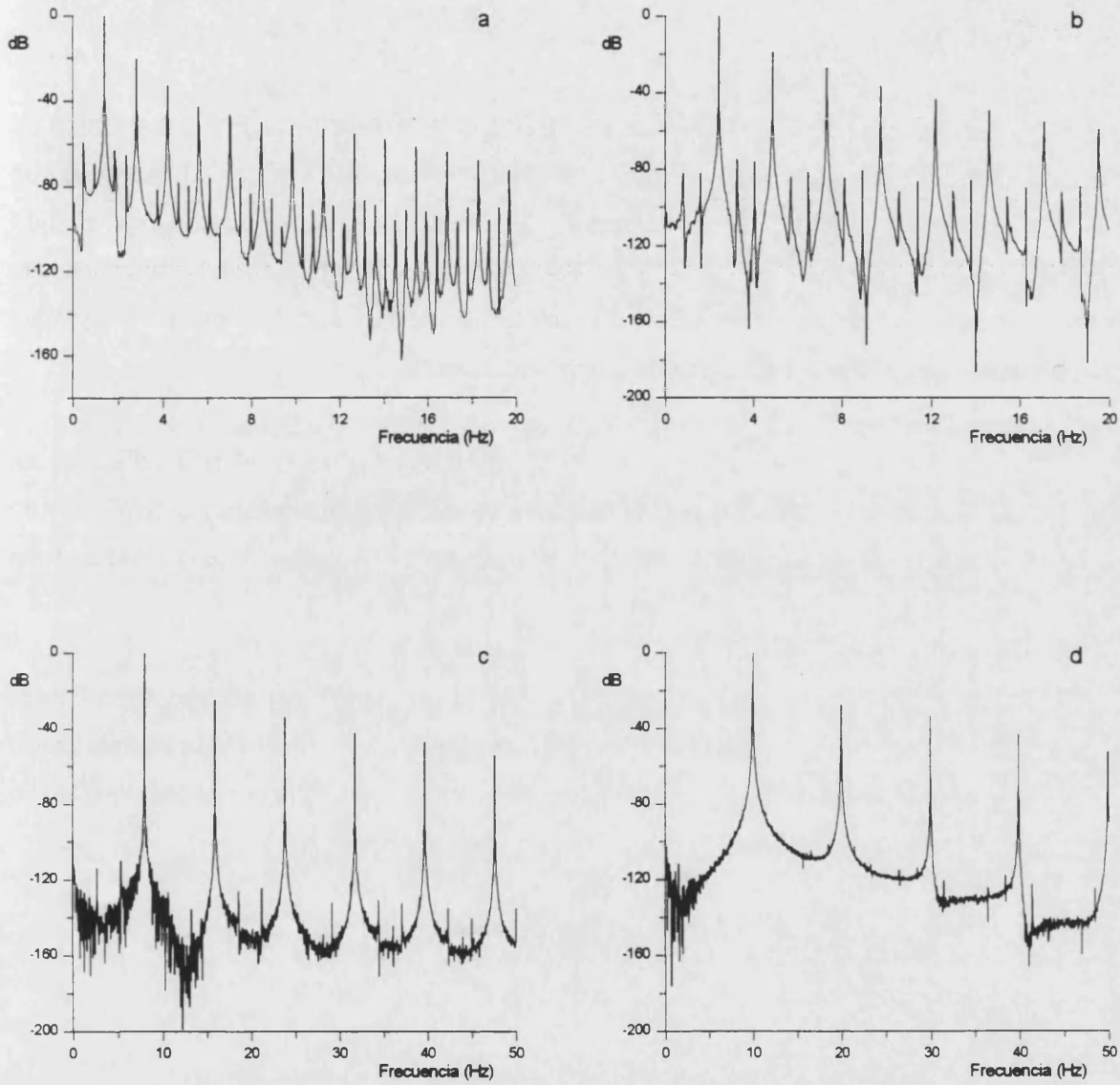


Figura VI.11.- Espectros de potencia de transformada de Fourier, para $d = 3,0$ mm, y varias frecuencias de bombeo: (a) 1,5 Hz, (b) 2,5 Hz, (c) 8 Hz y (d) 10 Hz.

VI.5.- Conclusiones

Para evitar el ruido de baja frecuencia, debe hallarse el valor de la frecuencia natural de oscilación mecánica de la disolución de medida, mediante un cuidadoso barrido de la frecuencia de bombeo. Las medidas de la señal de lente térmica deberían realizarse a $\nu = n\nu_0$. Cuando $n=1$, el ruido de la señal será mínimo. Aunque de esta forma se disminuiría de forma importante el ruido, hay que destacar la dificultad de encontrar para cada una de las disoluciones el valor de ν_0 , ya que probablemente será diferente para cada concentración del analito.

Hay que destacar también que el ruido de baja frecuencia no se elimina utilizando un amplificador sincrónico, ya que la oscilación mecánica se encuentra superpuesta a la térmica, y no puede ser discriminada por el amplificador. Éste la interpreta como variación de la señal de lente térmica.

El ruido será reducido para aquellos disolventes en los que el valor del parámetro F de la ecuación VI.5 sea muy bajo. Sería necesario realizar más experiencias para relacionar este parámetro con las propiedades físicas de los disolventes y con los parámetros de ruido que se han obtenido en el capítulo IV, ya que posiblemente haya una estrecha relación entre F , σ_0^* y k .

**VII.- UN MODELO QUE DESCRIBE LA SATURACIÓN ÓPTICA EN
ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA**

VII.- UN MODELO QUE DESCRIBE LA SATURACIÓN ÓPTICA EN ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA

VII.1.- Introducción

Como se ha indicado en el capítulo II, se han propuesto dos modelos que describen el efecto de lente térmica: el modelo parabólico [1,23] y el aberrante [24-27]. Según el modelo parabólico, la señal de ELT viene dada por:

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{I(0) - I(\infty)}{I(\infty)} = \theta + \frac{\theta^2}{2} \quad (\text{VII.1})$$

donde:

$$\theta = \frac{2,303 P (-dn/dT) A}{\lambda_{prueba} \kappa} \quad (\text{VII.2})$$

siendo P la potencia de bombeo, (dn/dT) el coeficiente de temperatura del índice de refracción, A la absorbancia, λ_{prueba} la longitud de onda del láser de prueba, y κ la conductividad térmica del medio. Con frecuencia, el término cuadrático de la ecuación VII.1 se desprecia para valores bajos de la señal. Con el fin de hacer concordar los datos experimentales y la teoría, Dovichi [12], y Carter y Harris [25] introdujeron un coeficiente de corrección en los términos de la ecuación VII.1:

$$\frac{\Delta I}{I} = 0,52\theta + 0,13\theta^2 \quad (\text{VII.3})$$

Por otra parte, se ha encontrado que los coeficientes de la ecuación VII.3 varían con la naturaleza del soluto [119]. Para racionalizar las diferencias encontradas al estudiar el comportamiento de diversos compuestos, Ramis Ramos y col. [120] estudiaron la posibilidad de que se alcanzara la saturación óptica. Cerca de la saturación óptica, los estados excitados se pueblan significativamente, disminuyendo la población del estado fundamental en una cantidad equivalente. En las técnicas absorciométricas, la sensibilidad es proporcional a la población del estado fundamental y, por lo tanto, es de esperar que cerca de la saturación óptica la sensibilidad sea menor.

Se ha demostrado que al utilizar un láser pulsado como fuente de excitación, en las técnicas de emisión atómica y de fluorescencia molecular se alcanza la saturación óptica [121]. Sin embargo, hasta el momento no se ha planteado la posibilidad de que se produzca saturación óptica en las técnicas absorciométricas. Para alcanzar las condiciones de saturación óptica, se requieren intensidades de radiación elevadas y, por lo tanto, la espectrofotometría, que se basa en la medida de la diferencia entre dos intensidades de radiación, no puede utilizarse en dichas condiciones. En cambio, la espectroscopía fototérmica, incluyendo la ELT y la espectroscopía fotoacústica, ofrece la posibilidad de demostrar que puede alcanzarse la saturación óptica en una técnica absorciométrica.

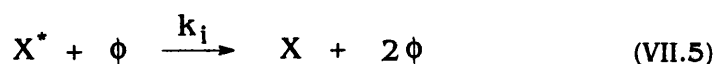
Ramis Ramos y col. [120] desarrollaron un modelo para ELT, en condiciones de saturación óptica parcial. El modelo sugiere que, en muchas experiencias de ELT citadas en la bibliografía, se ha alcanzado la saturación óptica en un grado significativo, y puede alcanzarse en un alto grado con los láseres y la tecnología óptica actualmente disponibles. De este modelo se pueden derivar importantes consecuencias para el desarrollo futuro de las técnicas espectrométricas fototérmicas. En este capítulo se expone y comenta dicho modelo, lo que servirá de base para el modelo modificado que se desarrolla en el capítulo VIII.

VII.2.- Teoría

a) Modelo cinético para espectrometría de lente térmica

Tanto en espectrofotometría como en ELT, la energía radiante disponible es transformada parcialmente en energía electrónica por las especies absorbentes, siendo liberada al medio como energía térmica. En espectrometría fotoacústica, parte de la energía se disipa como un frente de ondas mecánicas. En ELT, una parte de la energía térmica se acumula dentro de la región irradiada, para formar el gradiente térmico, y otra parte se disipa por conducción térmica y convección. El aumento de temperatura producido, cuando se utiliza un haz de bombeo gaussiano, se caracteriza por una constante de tiempo que, para los líquidos, oscila entre 200-300 ms y 2-3 μ s, cuando el tamaño de la región iluminada varía entre 100 y 1 μ m, respectivamente [12]. Después de un período de tiempo proporcional al cuadrado del radio del haz de bombeo, se alcanza un equilibrio dinámico, y toda la energía absorbida se comunica al entorno.

En todos los casos, la energía térmica se genera mediante un proceso de absorción-relajación que se puede describir como:



donde X y X* son los estados fundamental y excitado de las especies absorbentes, respectivamente, ϕ representa la concentración molar de fotones (mol dm^{-3}), q es la energía térmica, k_a es la constante de velocidad del proceso de absorción, y k_s y k_i son las constantes de velocidad de los procesos de emisión espontánea e inducida, respectivamente. Tal como demostró Einstein, las constantes de velocidad de los procesos de absorción y emisión inducida son iguales ($k_a = k_i$) [121-123]. Para simplificar el tratamiento, no se han incluido en el modelo de las ecuaciones VII.3-VII.6 los posibles cambios fotoquímicos, y tampoco serán considerados en el desarrollo que sigue.

La constante de velocidad de relajación, k_q , representa todos los procesos de relajación no radiativa que contribuyen a:

- (i) la degeneración de las energías electrónica y vibracional, como energía traslacional o térmica,
- (ii) el desdoblamiento del estado excitado, y
- (iii) la regeneración de la población del estado fundamental.

Estos procesos incluyen la conversión externa, la conversión interna y el cruzamiento entre sistemas. Las constantes de velocidad de estos procesos dependen fuertemente de la estructura y del entorno de la molécula. La constante de velocidad para la conversión interna al estado fundamental varía, generalmente, entre 10^5 y 10^7 s^{-1} . Para moléculas orgánicas, la constante de velocidad para el cruzamiento entre sistemas es generalmente de 10^6 a 10^9 s^{-1} , y aumenta en presencia de átomos pesados [121-123].

Se plantea ahora la cuestión de cuál es el valor de k_q que debe utilizarse en el modelo de ELT, cuando las condiciones de las experiencias se aproximen a las de saturación óptica. En las técnicas de emisión, la señal es función de la población del estado excitado y, por lo tanto, en el modelo que describe las experiencias, debe emplearse la constante de velocidad del proceso de relajación más rápido, el más competitivo de entre todos los procesos capaces de despoblar el estado excitado. Sin embargo, la ELT es una técnica absorciométrica y la sensibilidad es proporcional a la población del estado fundamental. Por lo tanto, cuando la saturación óptica se halla próxima, el paso más lento del proceso secuencial de relajación limitará la sensibilidad, y será el que deba utilizarse para modelizar el fenómeno. Teniendo en cuenta que el cruzamiento entre sistemas puede combinarse con la conversión interna para regenerar la población del estado fundamental, esta última debe ser la etapa más lenta del proceso de relajación. Por lo tanto, en la discusión que sigue se supondrá que k_q varía entre 10^5 y 10^7 s^{-1} , del mismo modo que lo hace la constante de velocidad del proceso de conversión interna.

b) Interpretación cinética del proceso de absorción

Mediante las ecuaciones VII.4 y VII.5, pueden relacionarse k_a y la absorptividad molar, ϵ . En la dirección del haz, el balance de fotones es:

$$\frac{d\phi}{dt} = -k_a (x - x^*) \phi \quad (\text{VII.7})$$

donde x y x^* son las concentraciones molares de X y X^* , respectivamente. Los fotones emitidos espontáneamente han sido antes absorbidos y, por lo tanto, en su inmensa mayoría producen una disminución de la intensidad en la dirección del haz. Estos fotones y los fotones que han sido absorbidos y transformados en energía térmica, no pueden distinguirse entre sí mediante un detector absorciométrico. Ambos tipos de fotones contribuyen positivamente al valor de k_a . Sólo una pequeña fracción de fotones son emitidos espontáneamente en la dirección del haz y puede alcanzar el detector. Esta pequeña contribución negativa a k_a ha sido despreciada en la ecuación VII.7.

La ecuación VII.7 indica que la concentración de fotones que se mueven a lo largo de la dirección del haz, disminuye con una velocidad proporcional a la diferencia de población entre los estados fundamental y excitado, y a la concentración de fotones. En un tiempo diferencial, dt , los fotones se mueven a lo largo de un camino óptico diferencial, dz ; algunos de ellos son absorbidos y otros inducen la emisión de otros fotones. La relación entre dt y dz viene dada por:

$$dt = \frac{n}{c} dz \quad (\text{VII.8})$$

donde n es el índice de refracción del medio y c la velocidad de la luz en el vacío; c/n es la velocidad de la luz en el medio considerado. Sustituyendo dt en la ecuación VII.7 y reordenando:

$$\frac{d\phi}{\phi} = -\frac{k_a(x-x^*)n dz}{c} \quad (\text{VII.9})$$

En las condiciones utilizadas en espectrofotometría, la concentración de especies excitadas, x^* , es extremadamente pequeña y puede despreciarse. La integración de la ecuación VII.9 desde ϕ_0 (concentración de los fotones incidentes) hasta ϕ (concentración de los fotones emergentes), a lo largo del camino óptico, b , conduce a:

$$\ln \frac{\phi}{\phi_0} = -\frac{k_a x n b}{c} \quad (\text{VII.10})$$

A partir de la ecuación VII.10 y de la ley de Lambert-Beer, puede deducirse que:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = -\log \frac{\phi}{\phi_0} = \epsilon x b = \frac{k_a x n b}{(\ln 10)c} \quad (\text{VII.11})$$

donde I_0 e I son las intensidades de los haces incidente y emergente, respectivamente. Finalmente:

$$k_a = \frac{(\ln 10) \epsilon c}{n} \quad (\text{VII.12})$$

que es una ecuación de gran interés desde un punto de vista teórico, puesto que indica que la absorptividad molar es la constante de velocidad del proceso de absorción dividida por la velocidad de la luz en el medio y por $\ln 10$:

$$\epsilon = \frac{k_a}{(\ln 10)(c/n)} \quad (\text{VII.13})$$

c) Potencia disipada como energía térmica por unidad de volumen y unidad de tiempo

A partir de las ecuaciones VII.4-VII.6 puede derivarse el siguiente modelo cinético del proceso de absorción-relajación:

$$\frac{dx}{dt} = -k_a \phi(x-x^*) + k_s x^* + k_q x^* \quad (\text{VII.14})$$

Teniendo en cuenta que la concentración total del cromóforo se puede expresar como $x_0 = x + x^*$, la ecuación VII.14 puede reordenarse de la forma:

$$\frac{dx}{dt} + (2k_a \phi + k_d) x = (k_a \phi + k_d) x_0 \quad (\text{VII.15})$$

donde $k_d = k_r + k_q$ (suma de las constantes de velocidad de los procesos de relajación radiativo y no radiativo, respectivamente). Para mayor simplicidad, en la discusión siguiente se supone que los procesos radiativos de relajación son despreciables, es decir, $k_d \approx k_q$. Considerando que la concentración total del cromóforo es constante, la integración de la ecuación VII.15 es inmediata:

$$x = x_0 \frac{k_a \phi + k_d}{2k_a \phi + k_d} \left[1 + \frac{k_a \phi}{k_a \phi + k_d} \exp[-(2k_a \phi + k_d) t] \right] \quad (\text{VII.16})$$

Reordenando la ecuación VII.16 resulta:

$$x^* = x_0 \frac{k_a \phi}{2k_a \phi + k_d} [1 - \exp[-(2k_a \phi + k_d) t]] \quad (\text{VII.17})$$

La ecuación VII.17 indica que x^* aumenta desde 0 (cuando $t = 0$) hasta un valor asintótico. A un valor de t suficientemente grande, se establece un estado de equilibrio dinámico y el término exponencial puede despreciarse. Debido al valor elevado de k_d (ver más arriba), el estado estacionario puede alcanzarse en un alto grado por debajo de los microsegundos, tiempo despreciable comparado con el requerido por un espectrofotómetro para medir la absorbancia, o con el necesario para que se pueda formar una lente térmica en un grado suficientemente alto para poderla medir (del orden del milisegundo). En el estado estacionario, el término exponencial de la ecuación VII.17 es nulo, y x^* se mantiene constante. En el estado estacionario, el modelo cinético de la ecuación VII.6 se reduce a:

$$\frac{dq}{dt} = k_q x^* = x_0 \frac{k_q k_a \phi}{2k_a \phi + k_d} \quad (\text{VII.18})$$

donde dq/dt es el número de moles de fotones que son absorbidos y transformados en energía térmica, por unidad de volumen y unidad de tiempo. Para transformar moles de fotones en unidades de energía, debemos hacer uso de diversas constantes físicas bien conocidas:

$$\frac{dq}{dt} = x_0 \frac{k_q k_a \phi}{2k_a \phi + k_d} \frac{hcN_A}{\lambda_{\text{bombeo}}} \quad (\text{VII.19})$$

donde h es la constante de Planck, λ_{bombeo} es la longitud de onda de la radiación de bombeo y N_A , el número de Avogadro. La concentración de fotones, ϕ , puede expresarse como una función de la potencia de bombeo, de la forma:

$$\phi = \frac{P \lambda_{\text{bombeo}} n}{hc^2 N_A \pi \omega_{\text{bombeo}}^2} \quad (\text{VII.20})$$

donde ω_{bombeo} es el radio medio (distancia desde el eje al punto de intensidad $1/e^2$) del haz de bombeo, en la posición donde se sitúa la celda. Sustituyendo en la ecuación VII.19 los valores de ϕ y k_q dados por las ecuaciones VII.20 y VII.12, respectivamente, se tiene:

$$\frac{dq}{dt} = x_0 B \frac{(\ln 10) \epsilon P}{\pi \omega_{\text{bombeo}}^2} \quad (\text{VII.21})$$

donde:

$$B = \frac{\frac{k_q}{2(\ln 10) \epsilon \lambda_{\text{bombeo}} P}}{\frac{\pi \omega_{\text{bombeo}}^2}{hcN_A} + k_d} = \frac{\frac{k_q}{0,1226 \epsilon \lambda_{\text{bombeo}} P}}{\frac{\omega_{\text{bombeo}}^2}{\text{cm}^2} + k_d} \quad (\text{VII.22})$$

y donde el coeficiente 0,1226 viene dado en $\text{J}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mol}$. Cuando las unidades de ϵ son $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{dm}^3$, la λ_{bombeo} se expresa en nm, P en mW y ω_{bombeo} en mm, el coeficiente toma el valor $1,226 \times 10^{-6}$.

d) Modificación del modelo parabólico en ELT

Las ecuaciones VII.21 y VII.22 proporcionan el valor de la energía que es absorbida y disipada como energía térmica, por unidad de volumen y unidad de tiempo. Ramis Ramos y col. [120] utilizaron la ecuación VII.20, en combinación con el modelo parabólico clásico referido a la configuración coaxial de doble haz, cuando los dos haces tienen diámetros similares [1, 24-26], para obtener la intensidad de la lente térmica en condiciones de saturación óptica parcial. Se supuso que una cantidad de energía significativa estaría siempre presente en el centro del haz de prueba en el campo lejano, esto es, que en todos los casos el sistema de detección se hallaría lejos de las

condiciones de saturación del mismo. Considerando la distribución gaussiana de la energía, a través del perfil del haz TEM₀₀ [24-26], se puede escribir:

$$Q(r,t) = x_0 B \frac{(\ln 10) \epsilon P}{\pi \omega_{\text{bombero}}^2} \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega_{\text{bombero}}^2}\right) \quad (\text{VII.23})$$

donde r es la variable radial. La única diferencia entre la ecuación VII.23 y la expresión correspondiente, empleada en el desarrollo del modelo clásico parabólico en ELT, es la introducción de B , que tiene en cuenta la posible influencia de las constantes de velocidad del modelo expresado en las ecuaciones VII.4-VII.6. La integración de la ecuación VII.23, para conocer el cambio de temperatura a través de la variable radial, es bien conocida [1, 24-26]. Se obtiene:

$$\Delta T(r,t) = -x_0 B \frac{(\ln 10) \epsilon P r^2}{4\kappa \pi \omega_{\text{bombero}}^2} \left(1 + \frac{t_c}{2t}\right) \quad (\text{VII.24})$$

donde t_c es la constante de tiempo de la lente térmica [12], que viene dada por:

$$t_c = \frac{\omega_{\text{bombero}}^2 \rho c_p}{4\kappa} \quad (\text{VII.25})$$

donde ρ y c_p son la densidad y el calor específico del medio, respectivamente. Siguiendo el modelo parabólico, la distancia focal de la lente térmica, f , viene dada por:

$$\frac{1}{f} = \frac{dn}{dT} \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} b \quad (\text{VII.26})$$

donde b es el espesor de la muestra. La distancia focal se relaciona con la intensidad del efecto de lente térmica de la forma:

$$\frac{\Delta I}{I} = -\frac{2z}{f} + \frac{z_c + z^2}{f^2} \quad (\text{VII.27})$$

siendo z la distancia desde la cintura del haz de prueba a la celda. La sensibilidad es máxima cuando esta distancia es igual a la distancia confocal, z_c , que viene dada por:

$$z_c = \frac{\pi \omega^2}{\lambda_{\text{prueba}}} \quad (\text{VII.28})$$

siendo ω el radio del haz de prueba en la cintura. Teniendo en cuenta que:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial r^2} = \frac{\partial^2 \Delta T}{\partial r^2} = -2x_0 B \frac{(\ln 10) \epsilon P}{4\kappa \pi \omega_{\text{bombeo}}^2} \quad (\text{VII.29})$$

sustituyendo en las ecuaciones VII.26 a VII.28, e introduciendo la corrección de Carter y Harris [12, 25], se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta I}{I} = 0,52 B \theta + 0,13 B^2 \theta^2 \quad (\text{VII.30})$$

La ecuación VII.30 coincide con la ecuación VII.3 cuando $B = 1$, esto es, cuando:

$$\frac{0,1226 \epsilon \lambda_{\text{bombeo}} P}{\omega_{\text{bombeo}}^2} \ll k_d \approx k_q \quad (\text{VII.31})$$

e) Efectos de la aproximación a la saturación óptica en ELT

A partir de las ecuaciones VII.16 y VII.17, y suponiendo que se ha alcanzado el estado estacionario, se puede escribir:

$$B = \frac{x-x^*}{x_0} = \frac{1-x^*/x}{1+x^*/x} \quad (\text{VII.32})$$

La ecuación VII.32 indica que B es la diferencia entre las poblaciones de los estados fundamental y excitado, dividido por la concentración total de especies absorbentes. Por lo tanto, cuando B = 1, se tiene que $x^* \ll x$. Como se indica en la ecuación VII.32, la variable B también puede escribirse como una función del grado de saturación óptica, x^*/x , que varía entre 0 y 1.

A partir de las ecuaciones VII.22 y VII.32, se obtiene la expresión:

$$\frac{x^*}{x} = \frac{1}{\frac{2k_q \omega_{\text{bombeo}}^2}{0,1226 \epsilon \lambda_{\text{bombeo}} P} + 1} \quad (\text{VII.33})$$

que puede utilizarse para predecir el grado de saturación óptica que puede alcanzarse para unas determinadas condiciones experimentales. Así, por ejemplo, la potencia necesaria para alcanzar el 50% de saturación óptica viene dada por:

$$P_{0,5} = \frac{2\omega_{\text{bombeo}}^2 k_q}{1,226 \times 10^{-6} \epsilon \lambda_{\text{bombeo}}} \quad (\text{VII.34})$$

La ecuación VII.34 indica que para un haz de $\omega_{\text{bombeo}} = 0,1$ mm y una especie absorbente con $\epsilon = 2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, y $\lambda_{\text{bombeo}} = 488$ nm, $P_{0,5}$ varía desde 167 mW a 16,7 W, cuando k_q se encuentra en el intervalo $10^5 - 10^7 \text{ s}^{-1}$. Además, se puede comprobar que $P_{0,5}$ disminuye en un factor de 1:100, cuando el enfoque del haz aumenta en un factor de $\times 10$ ($\omega_{\text{bombeo}} = 0,01$ mm). Por lo tanto, la ecuación VII.33 indica que en muchas experiencias de ELT descritas en la bibliografía, se alcanzó la saturación óptica en un grado significativo.

En la Figura VII.1 se ha simulado el efecto de la aproximación a la saturación óptica sobre un espectro de ELT. De forma similar, en la Figura VII.2 se muestra el efecto del aumento de la potencia de bombeo en la señal de ELT, para experiencias simuladas con especies que poseen valores de k_q crecientes. La ecuación VII.30 también predice que, en presencia de un grado significativo de saturación óptica, tanto la sensibilidad como el coeficiente del término cuadrático de la curva de calibrado, serán menores de lo esperado.

Finalmente, Ramis Ramos y col. [120] consideraron la posibilidad de alcanzar un alto grado de saturación óptica. De la ecuación VII.33 se deduce que para que x^*/x se acerque a la unidad, debe utilizarse un haz láser de bombeo muy potente y muy bien enfocado, y bombearse compuestos no fluorescentes, con un valor elevado de la absortividad molar y un valor de k_q relativamente pequeño. En estas condiciones, de la ecuación VII.22 se tiene:

$$\frac{0,1226 \varepsilon \lambda_{\text{bombeo}} P}{\omega_{\text{bombeo}}^2} \gg k_d \approx k_q \quad (\text{VII.35})$$

y de las ecuaciones VII.2, VII.30 y VII.35, resulta;

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{9,77 (-dn/dT) b \omega_{\text{bombeo}}^2}{\lambda_{\text{prueba}} \lambda_{\text{bombeo}} \kappa} x_0 k_q \quad (\text{VII.36})$$

donde, para mayor simplicidad, no se ha escrito el término cuadrático y el coeficiente 9,77 se expresa en J cm mol^{-1} . Debe utilizarse el valor $9,77 \times 10^{12}$ cuando ε esté expresado en $\text{cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, (dn/dT) en $^{\circ}\text{C}^{-1}$, b en cm , ω_{bombeo} en nm , la longitud de onda en nm , κ en $\text{mW cm}^{-1} ^{\circ}\text{C}^{-1}$, x_0 en mol dm^{-3} y k_q en s^{-1} .

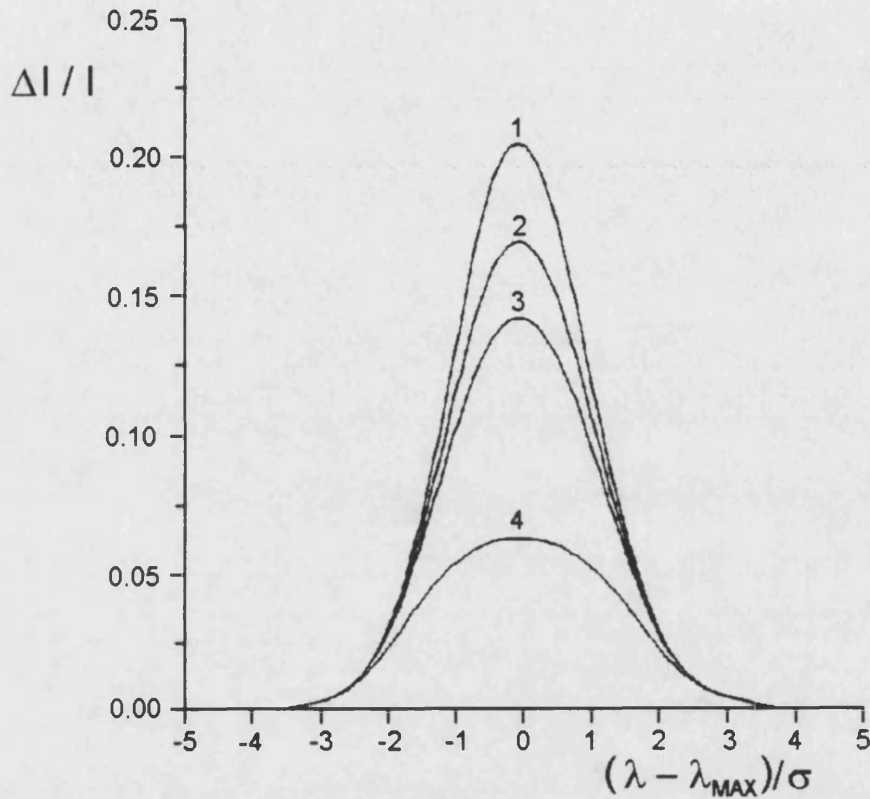


Figura VII.1.- Variación de la señal de ELT con la longitud de onda de la radiación de bombeo predicha por la ecuación VII.30. El eje x viene dado en unidades de desviación estándar para una banda de absorción gaussiana. En la ecuación se han utilizado los siguientes datos: $x_0 = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, $e_{\text{max}} = 2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$, $\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$, $\sigma = 10 \text{ nm}$ (desviación estándar de la banda), $\kappa = 5,95 \text{ mW cm}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ (agua), $(-dn/dT) = 0,81 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ (agua), $\lambda_{\text{prueba}} = 633 \text{ nm}$, $\omega_{\text{bombeo}} = 0,1 \text{ mm}$, $P = 100 \text{ mW}$. Valores de k_1 : (1) 10^7 s^{-1} , (2) 10^6 s^{-1} , (3) $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, y (4) 10^5 s^{-1} . Valores de x^*/x cuando $\lambda_{\text{bombeo}} = \lambda_{\text{max}}$: (1) 1%, (2) 10%, (3) 19%, y (4) 55%.

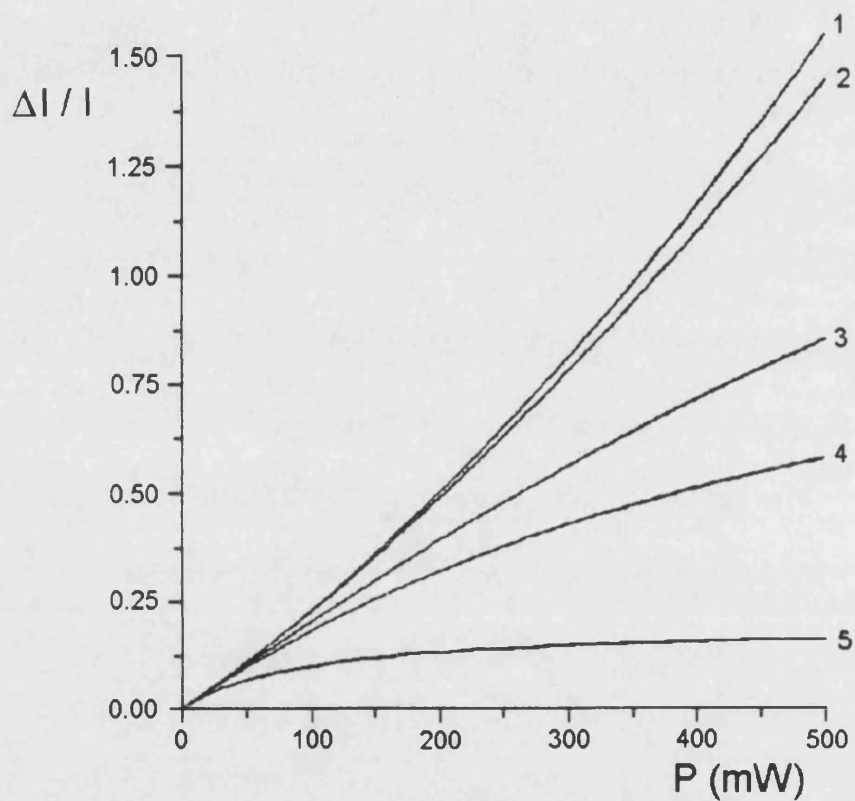


Figura VII.2.- Variación de la señal de ELT con la potencia de bombeo predicha por la ecuación VII.30. Para el cálculo se utilizaron los siguientes datos: $x_0 = 4 \times 10^{-7} \text{ M}$, $\lambda_{\text{bombeo}} = \lambda_{\text{max}}$. Otros valores son los mismos que los utilizados para obtener la Figura VII.1. Valores de $k_q = (1) 10^8 \text{ s}^{-1}$, (2) 10^7 s^{-1} , (3) 10^6 s^{-1} , (4) $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, y (5) 10^5 s^{-1} . Valores de x^*/x cuando $P = 500 \text{ mW}$: (1) 0,3 %, (2) 3%, (3) 23%, (4) 37%, y (5) 75%.

VII.3.- Discusión

Sobre la base de la ecuación VII.36, la espectrometría de lente térmica de saturación óptica (ELTSO) aparece como una técnica diferente a la espectrofotometría de absorción convencional y a la ELT. En primer lugar, si se alcanza un valor elevado de x^*/x , la señal de ELT no dependerá de la potencia de bombeo, ni de ϵ y, por lo tanto, tampoco dependerá de la absorbancia, pero será directamente proporcional a la concentración de especies absorbentes y a k_q . Por lo tanto, la ELTSO puede utilizarse para estudiar la etapa más lenta del proceso de relajación secuencial de las especies electrónicamente excitadas.

En segundo lugar, a través de k_q , la señal de ELTSO presenta una dependencia con la naturaleza del soluto y del medio más compleja que la que predice la teoría clásica de ELT. De este modo, la ecuación VII.36 indica que la señal de ELTSO se verá influida por aquellos factores que modifiquen la velocidad de la etapa más lenta del proceso de relajación, tales como la temperatura, la rigidez de las especies absorbentes y la naturaleza del medio. Por lo tanto, en ELTSO, puede utilizarse un cromóforo como soluto de prueba, para medir las variaciones de los factores que modifican el valor de k_q . De esta manera, sería posible monitorizar cambios locales en sistemas complejos, tales como moléculas bioquímicas, o microentornos específicos en sistemas biológicos.

También puede ser de interés el control de las variables que modifican k_q , con el fin de mejorar la sensibilidad y selectividad de la ELT, incluyendo el desarrollo de procedimientos de ELT-ELTSO multicomponente. Es interesante también observar que la sensibilidad en ELTSO depende no sólo de la longitud de onda del haz de prueba, sino también de la longitud de onda de la radiación de bombeo, aumentando la sensibilidad cuando se utilizan láseres de prueba y de bombeo de longitudes de onda más cortas. Finalmente, la señal de ELTSO sería insensible al ruido y deriva de la potencia de bombeo.

Sin embargo, debe tenerse presente que otros fenómenos que no han sido considerados en el modelo, tales como la difusión y convección de las moléculas «calientes» o intermedias en gases y líquidos, y la volatilización en líquidos, pueden impedir que se alcance un alto grado de saturación óptica. Sobre este particular trata el siguiente capítulo.

**VIII.- DIFUSIÓN Y CONVECCIÓN EN CONDICIONES DE SATURACIÓN
ÓPTICA PARCIAL**

VIII.- DIFUSIÓN Y CONVECCIÓN EN CONDICIONES DE SATURACIÓN ÓPTICA PARCIAL

VIII.1.- Introducción

Para estimar cuánto se exalta la sensibilidad en ELT respecto a la espectrofotometría convencional, se utiliza el factor de exaltación, E. Con fines comparativos, los valores de E se refieren generalmente a una potencia de bombeo de 1 mW y a una longitud de onda de prueba de 632,8 nm. Para señales de ELT débiles, puede despreciarse el término cuadrático, por lo que el factor de exaltación teórico en las condiciones de referencia es:

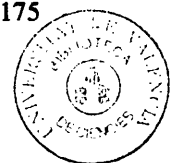
$$E_t = \frac{(0,52) (2,303) (-dn/dT)}{\kappa (632,8)} \tag{VIII.1}$$

donde (dn/dT) es el coeficiente térmico del índice de refracción y κ la conductividad térmica del medio. El factor de exaltación puede obtenerse experimentalmente como:

$$E_e = \frac{(\Delta I/I)/x_0}{A/x_0} \times \frac{\lambda_{prueba}}{P (632,8)} \tag{VIII.2}$$

donde P viene dado en mW y λ_{prueba} en nm, x_0 es la concentración del cromóforo, y $(\Delta I/I)/x_0$ y A/x_0 = ϵb son las pendientes de las curvas de calibrado en ELT y espectrofotometría, respectivamente, siendo b el camino óptico. El cociente entre los factores de exaltación experimental y teórico, $f = E_e / E_t$, ha sido utilizado como una medida del buen funcionamiento de un instrumento de ELT.

Como se deduce de la ecuación VIII.1, para un mismo instrumento, E_e debería depender únicamente de las propiedades termoópticas del disolvente, esto es, del cociente $(dn/dT)/\kappa$, y no debería variar con la absorptividad molar y con la naturaleza del soluto. Sin embargo, hemos observado que los valores de E_e varían de forma significativa, al medir las señales de ELT y las absorbancias de disoluciones acuosas de diferentes colorantes orgánicos fotoestables.



Terazima y col. [119] también observaron variaciones de los valores esperados de E_c , al utilizar diferentes solutos en disolventes apolares. Estos autores sugirieron que algunas moléculas mostraban cierta dificultad para comunicar la energía a las moléculas circundantes del disolvente. Según esta hipótesis, si la velocidad de transferencia no es lo suficientemente alta, parte de la energía escapa a la detección en forma de energía electrónica o vibracional. La energía puede ser transportada fuera de la región de observación por las especies excitadas intermedias, lo que requeriría que los procesos de difusión y convección compitieran eficazmente con los procesos de relajación.

Como se ha visto en el capítulo anterior, Ramis Ramos y col. [120] ofrecieron otra interpretación no excluyente respecto a la anterior, que planteaba la posibilidad de la aproximación a la saturación óptica. Cuando se alcanza la saturación óptica en un grado significativo, la población del estado fundamental se reduce y, por lo tanto, la absorbancia y la sensibilidad también disminuyen. Se desarrolló un modelo y se dedujo la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta I}{I} = 0,52 B\theta + 0,13 B^2\theta^2 \quad (\text{VIII.3})$$

siendo:

$$B = \frac{k_q}{(12,26) e \lambda_{\text{bombero}} P \frac{\omega_{\text{bombero}}^2}{\omega_{\text{bombero}}^2} + k_q} \quad (\text{VIII.4})$$

donde el coeficiente numérico viene dado en $J^{-1} m^{-1} mol$, k_q es la constante de velocidad del proceso de relajación, λ_{bombero} es la longitud de onda de la radiación de bombeo, y ω_{bombero} es el radio medio (intensidad en el punto $1/e^2$) del haz de bombeo. Si los procesos de relajación radiativa son significativos, como ocurre con las especies fluorescentes, se deben adicionar otros términos al denominador. Dado que la ELT es una técnica absorciométrica, la sensibilidad depende de la concentración del cromóforo en el estado fundamental, y k_q será la constante de velocidad de la etapa más lenta del proceso de relajación secuencial, la conversión externa y, de este modo, k_q variará entre 10^5 y $10^7 s^{-1}$ [121].

Se puede obtener una evidencia experimental de esta teoría, obteniendo valores de E_e para diferentes cromóforos, en diversas condiciones experimentales, y comparando los resultados con los correspondientes valores teóricos, E_t , que vendrán dados por:

$$E_t = \frac{(0,52)(2,303)(-dn/dT) B}{\kappa (632,8)} \quad (\text{VIII.5})$$

en lugar de por la ecuación VIII.1. Esta teoría predice que, cuando el producto ϵP aumenta o cuando ω_{bombeo} disminuye, los valores de B y E decrecen asintóticamente hasta anularse, mientras que la señal de ELT tiende a un valor constante que es proporcional a k_q :

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{(9,77)(-dn/dT) b \omega_{\text{bombeo}}^2}{\lambda_{\text{prueba}} \lambda_{\text{bombeo}} \kappa} x_0 k_q \quad (\text{VIII.6})$$

donde el coeficiente 9,77 viene expresado en J cm mol^{-1} . En cambio, a valores bajos de ϵP , o cuando ω_{bombeo} es elevado, el grado de saturación óptica es despreciable, $B = 1$, y E y las señales de ELT son las predichas por la teoría clásica.

Como se muestra en este capítulo, el modelo descrito por las ecuaciones VIII.3 y VIII.4 no explica las diferencias observadas entre los valores de E_e obtenidos para diferentes solutos, en distintas condiciones experimentales. En un intento de alcanzar una mejor concordancia entre la teoría y los datos experimentales, el modelo se modificó con el fin de tener también en cuenta los posibles efectos de la difusión y convección sobre la señal de ELT. De acuerdo con el modelo aquí propuesto, la teoría de saturación óptica [120] y la hipótesis de la difusión de Terazima y col. [119], no se excluyen entre sí, al contrario, son complementarias. De este modo, para que la energía absorbida se pierda mediante difusión y convección, el estado excitado intermedio debe hallarse significativamente poblado, y la pérdida de sensibilidad en ELT puede a la vez explicarse tanto por la pérdida de energía debido a la difusión y convección, como por el despoblamiento del estado fundamental.

VIII.2.- Fundamento teórico

a) Los efectos de la difusión y de la convección en la señal de ELT

Los procesos de absorción-relajación, que tienen lugar en una experiencia de ELT, han sido descritos mediante el siguiente modelo cinético [120]:

$$\frac{dx}{dt} = (k_a \phi + k_d) x_0 - (2k_a \phi + k_d) x \quad \text{(VIII.7)}$$

donde ϕ representa la concentración molar de fotones (mol m^{-3}), x es la concentración del cromóforo en el estado fundamental, y k_a es la constante cinética de velocidad del proceso de absorción. Si se tiene en cuenta que $x^* = x_0 - x$, donde x^* es la concentración de las especies excitadas intermedias, y se sustituye en la ecuación VIII.7, x por x^* , se tiene:

$$\frac{dx^*}{dt} = k_a \phi x_0 - (2k_a \phi + k_d) x^* \quad \text{(VIII.8)}$$

En condiciones de saturación óptica parcial, tanto x^* como x son significativas. Puede suponerse que la distribución radial de x^* y x en la región de excitación-observación se modifica por el efecto de la difusión y convección. En el caso usual, en el que se utiliza un haz de bombeo con distribución TEM_{00} , x^* y x tendrán una distribución gaussiana y gaussiana inversa, respectivamente. Por otra parte, la difusión hará disminuir x^* y aumentar x en el centro del haz; por tanto, el efecto de la convección es estrechar ambas distribuciones. De modo similar, en el centro del haz, un aumento de la convección hará disminuir x^* , y aumentar x . Por lo tanto, los efectos de la difusión y convección trabajan en el mismo sentido y no se cancelan uno al otro.

Para introducir los efectos de la difusión en el modelo de las ecuaciones VIII.7 y VIII.8, puede aplicarse la segunda ley de Fick de la difusión. Si además se tiene en cuenta que existe convección, se puede escribir [124,125]:

$$\frac{dx}{dt} = (k_a \phi + k_d) x_0 - (2k_a \phi + k_d) x + D \frac{\partial^2 x}{\partial r^2} + k_c \frac{\partial x}{\partial r} \quad \text{(VIII.9)}$$

y alternativamente:

$$\frac{dx^*}{dt} = k_a \phi x_0 - (2k_a \phi + k_d) x^* + D^* \frac{\partial^2 x^*}{\partial r^2} + k_c \frac{\partial x^*}{\partial r} \quad (\text{VIII.10})$$

siendo D y D^* los coeficientes de difusión de las especies en el estado fundamental y de las especies excitadas intermedias con una población significativa, respectivamente, r es la variable radial, y k_c es una función de r , con dimensiones de velocidad de flujo lineal multiplicada por la distancia, y que tiene en cuenta el efecto de la convección. La distribución radial de x^* puede expresarse como:

$$x^* = x_{\max}^* e^{-\frac{2r^2}{\omega_{\text{bombeo}}^2}} \quad (\text{VIII.11})$$

donde x_{\max}^* es el valor de x^* en el centro del haz. Si se supone que $D \approx D^*$, la distribución radial de x vendrá dada por:

$$x = x_0 - x_{\max}^* e^{-\frac{2r^2}{\omega_{\text{bombeo}}^2}} \quad (\text{VIII.12})$$

Si se deriva la ecuación VIII.12 y se tiene en cuenta el valor de x^* dado por la ecuación VIII.11 y por $x^* = x_0 - x$, se tiene:

$$\frac{\partial x}{\partial r} = \frac{4}{\omega_{\text{bombeo}}^2} (x_0 - x) \quad (\text{VIII.13})$$

y también:

$$\frac{\partial^2 x}{\partial r^2} = \frac{4}{\omega_{\text{bombeo}}^2} \left(1 - \frac{4r^2}{\omega_{\text{bombeo}}^2} \right) (x_0 - x) \quad (\text{VIII.14})$$

Mediante la sustitución de las derivadas dadas por las ecuaciones VIII.13 y VIII.14 en la ecuación VIII.9, y reagrupando, se llega a la expresión:

$$\frac{dx}{dt} = \left[k_a \phi + k_d + \frac{4}{\omega_{bombeo}^2} (k_D + k_C) \right] x_0 - \left[2 k_a \phi + k_d + \frac{4}{\omega_{bombeo}^2} (k_D + k_C) \right] x \quad (\text{VIII.15})$$

donde:

$$k_D = D \left(1 - \frac{4r^2}{\omega_{bombeo}^2} \right) \quad (\text{VIII.16})$$

Si se compara con la ecuación VIII.7, se han añadido dos términos a la ecuación VIII.15 que tienen en cuenta los efectos de difusión y convección. Tanto k_D como k_C son funciones de la variable radial, r , y k_C es una función de la velocidad del fluido en sentido vertical, y debe incrementarse con la señal de ELT. Sin embargo, para integrar la ecuación VIII.15, k_D y k_C se considerarán constantes. Esta aproximación simplifica mucho el modelo. La integración de la ecuación VIII.15, de la misma manera que se integró la ecuación VIII.7, proporciona un valor modificado de B:

$$B = \frac{k_q}{\frac{1,226 \times 10^{-5} e \lambda_{bombeo} P + 4(k_D + k_C)}{\omega_{bombeo}^2} + k_q} \quad (\text{VIII.17})$$

b)) Comentarios a la ecuación VIII.17

En el denominador de la ecuación VIII.17 pueden distinguirse tres términos con las dimensiones de constantes de velocidad de primer orden (inversa del tiempo):

(i) el término de absorción-excitación:

$$\frac{1,226 \times 10^{-5} \epsilon \lambda_{\text{bombee}} P}{\omega_{\text{bombee}}^2} \quad (\text{VIII.18})$$

(ii) el término de difusión-convección:

$$\frac{4(k_D + k_C)}{\omega_{\text{bombee}}^2} \quad (\text{VIII.19})$$

(iii) la constante de relajación, k_q .

La ecuación VIII.17 puede interpretarse de la forma siguiente: para valores bajos de ω_{bombee} y valores elevados del producto ϵP , se absorbe y se concentra mucha energía en un pequeño volumen y, por lo tanto, el sistema se aproxima a la saturación óptica. Además, existen dos mecanismos que compiten para reducir la población del estado excitado intermedio, y para regenerar la población del estado fundamental en la región de observación: los mecanismos de difusión-convección y la relajación vibracional. El grado de saturación óptica alcanzado viene determinado, principalmente, por el más rápido de estos dos procesos.

En la ecuación VIII.17, la importancia relativa de los tres términos del denominador puede variar enormemente para distintas condiciones experimentales. Así, si se emplea un haz de bombeo débilmente enfocado, el término de difusión-convección será siempre pequeño en comparación con k_q . Por otro lado, serán necesarios valores elevados del producto ϵP , para alcanzar un grado de

saturación óptica significativo. Por lo tanto, si se utiliza un haz de bombeo débilmente enfocado, B se aproximará a la unidad, y tanto E como la señal de ELT seguirán el comportamiento predicho por la teoría clásica.

En cambio, con un haz de bombeo fuertemente enfocado, el valor de ω_{bombeo} será muy bajo, y el término de difusión-convección puede ser mayor que k_q . En cualquier caso, el término de saturación óptica igualará a la suma de los otros dos términos cuando:

$$(\epsilon P)_{\text{crit}} = \frac{\omega_{\text{bombeo}}^2}{1,226 \times 10^{-5} \lambda_{\text{bombeo}}} \left[\frac{4(k_D + k_C)}{\omega_{\text{bombeo}}^2} + k_q \right] \quad (\text{VIII.20})$$

A este valor crítico del producto ϵP , el efecto de la saturación óptica igualará a los efectos combinados de los procesos de difusión-convección y de relajación, y un incremento en los valores de ϵ o de P puede aumentar significativamente el grado de saturación óptica. Con ello, se observará una reducción de B y E. A valores altos de ϵP , B se aproxima a:

$$B_{\text{límite inferior}} = \frac{\omega_{\text{bombeo}}^2 k_q}{1,226 \times 10^{-5} \epsilon \lambda_{\text{bombeo}} P} \quad (\text{VIII.21})$$

que tiende a cero cuando ϵP aumenta. En este caso, E tiende también a cero, mientras que la señal de ELT se hace proporcional a k_q y tiende al límite dado por la ecuación VIII.6. Además, para un valor constante de ω_{bombeo} , si el producto ϵP disminuye, B y E aumentan y la señal de ELT decrece; sin embargo, B tiende asintóticamente a un límite que es menor que la unidad:

$$B_{\text{límite superior}} = \frac{k_q}{\frac{4(k_D + k_C)}{\omega_{\text{bombeo}}^2} + k_q} \quad (\text{VIII.22})$$

Por lo tanto, si el término de difusión-convección es grande en comparación con k_q , B puede ser mucho menor que la unidad. Esto supone una importante pérdida de sensibilidad para las experiencias realizadas con haces de bombeo fuertemente enfocados. Además, a valores bajos de ϵ ,

o a bajas potencias de bombeo, el límite superior de B afectará de forma constante a todas las medidas de ELT, lo que sugiere que el factor de corrección introducido por Carter y Harris, 0,52 [12,25], puede de hecho, ser un límite superior de B en las condiciones utilizadas por estos autores. Si esto es cierto, este factor sería diferente para otras experiencias en las que se utilizaran valores de ω_{bombeo} distintas, u otros disolventes y cromóforos con otros valores de D y k_q . En la discusión que se expone a continuación, no se emplea el factor de corrección de Carter y Harris, y las diferencias entre los valores experimentales de la señal y el modelo clásico de la ecuación VII.1 (Capítulo VII) son atribuidos exclusivamente a B. Se tiene:

$$\frac{dq}{dt} = x_0 B \frac{(2,303) \epsilon P}{\pi \omega_{\text{bombeo}}^2} \quad (\text{VIII.23})$$

donde dq/dt es el calor generado por unidad de volumen y tiempo. Los modelos de ELT parabólico y aberrante pueden obtenerse basándose en la ecuación VIII.23. Si se emplea el modelo parabólico clásico, referido a la configuración coaxial con dos haces de radios similares [1,24-26], resulta:

$$\frac{\Delta I}{I} = B \theta + \frac{1}{2} B^2 \theta^2 \quad (\text{VIII.24})$$

c) Evaluación experimental de B

A valores bajos de la señal de ELT, cuando el término cuadrático de la ecuación VIII.24 puede despreciarse, y considerando las ecuaciones VIII.2 y VIII.5, puede obtenerse experimentalmente B a partir de la pendiente inicial de la curva de calibrado en ELT, $(\Delta I/I)/x_0$, como:

$$B_{\text{pendiente}} = \frac{[(\Delta I/I)/x_0] \kappa \lambda_{\text{prueba}}}{(2,303)(-dn/dT) \epsilon b P} \quad (\text{VIII.25})$$

Además, si las curvas de calibrado se extienden en un amplio intervalo de concentraciones, los datos pueden ajustarse a la expresión cuadrática:

$$\frac{\Delta I}{I} = \alpha + \beta x_0 + \gamma x_0^2 \quad (\text{VIII.26})$$

donde, si se compara con el modelo de la ecuación VIII.24, se ha añadido el término independiente α , para considerar la contribución del disolvente a la señal de ELT. El valor de B puede estimarse a partir de la relación entre los coeficientes de los términos cuadrático y lineal, es decir, de la curvatura de las curvas de calibrado. De las ecuaciones VIII.24 y VIII.26, se obtiene:

$$\frac{\gamma}{\beta} = \frac{B_{forma} \theta}{2 x_0} \quad (\text{VIII.27})$$

Si se sustituye por el valor de θ dado por la ecuación VII.2 (Capítulo VII), y se reordena, resulta:

$$B_{forma} = \frac{2 \kappa \lambda_{prueba} \gamma}{(2,303)(-dn/dT) \epsilon b P \beta} \quad (\text{VIII.28})$$

VIII.3.- Parte experimental

a) *Instrumentación y reactivos*

Se utilizó el instrumento de ELT construido en nuestro Departamento y descrito en el capítulo III. También se empleó un espectrofotómetro de fila de diodos de Hewlett-Packard, y cubetas de 1 cm de paso óptico.

Se utilizaron los siguientes colorantes de ftaleína: rojo fenol (RF, Probus, Barcelona), azul de bromofenol (ABF, Scharlau, Barcelona), azul de timol (AT, Merck, Darmstadt, Alemania), púrpura de bromocresol (PBC, Panreac, Barcelona) y azul de bromotimol (ABT, Riedel, Seelze, Alemania). También se hizo uso de los siguientes azocolorantes: amarillo de metilo, tropaeolina 00, amarillo de metanilo, rojo de metilo, tartrazina, 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR) (Riedel), y 1-(2-

piridilazo)-2-naftol (PAN) (Scharlau). Se utilizó además ácido fosfórico, ácido clorhídrico, hidróxido sódico, etanol (Panreac), dihidrógenofosfato sódico, cloruro amónico (Probus), y agua desionizada ultrapura.

Los colorantes se disolvieron en una mezcla agua/etanol 4:1 (v/v), que contenía HCl en concentración 0,08 M (pH = 1,1); se prepararon disoluciones madre 1×10^{-3} M. Las diluciones se realizaron con la misma mezcla. Se llevaron a cabo otras dos series de experiencias, disolviendo los colorantes en la mínima cantidad posible de etanol, y diluyendo en gran medida las disoluciones con tampón $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,125 M de pH 3, o con tampón $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ 0,25 M de pH 9,1.

b) Procedimiento

Se midieron series de disoluciones con concentraciones crecientes de colorante (10 puntos), preparadas para cubrir la mayor parte del intervalo dinámico de ELT. Las curvas se ajustaron a la ecuación VIII.26, y los valores de B_{forma} se calcularon a partir de la relación entre los coeficientes cuadrático y lineal, γ/β , tal como se indicó en la ecuación VIII.28.

La sensibilidad inicial en ELT, $(\Delta I/I)/x_0$, se obtuvo ajustando a una recta los datos correspondientes a valores bajos de x_0 , para los cuales puede despreciarse el término cuadrático (primeros cuatro puntos). También se realizaron experiencias en las que sólo se cubrió la parte baja del intervalo dinámico de ELT (cuatro puntos).

Las curvas de calibrado en espectrofotometría se obtuvieron con series de seis disoluciones, preparadas para cubrir el intervalo de absorbancia 0,1-2. Posteriormente, a partir de estas curvas se calcularon los correspondientes valores de absorptividad molar. Finalmente, los valores de $B_{\text{pendiente}}$ se obtuvieron como se indica en la ecuación VIII.25, a partir de los cocientes $[(\Delta I/I)/x_0]/(eb)$.

Para el agua se empleó el valor de $(dn/dT)/\kappa = 1,36 \times 10^{-5} \text{ mW}^{-1} \text{ cm}$ [12]. En el caso de la mezcla agua:etanol 4:1, los valores de dn/dT y de κ se calcularon como interpolaciones ponderadas de valores tomados de la bibliografía. Los coeficientes de peso fueron las fracciones volumétricas. El resultado obtenido fue $(dn/dT)/\kappa = 5,89 \times 10^{-5} \text{ mW}^{-1} \text{ cm}$.

VIII.4.- Resultados y discusión

a) Los colorantes de ftaleína

En la Tabla VIII.1 se muestran los valores de $B_{pendiente}$ y B_{forma} , obtenidos para la serie de colorantes de ftaleína a pH = 1,1, utilizando diferentes líneas del láser de Ar^+ para el bombeo. En la Tabla VIII.2 se muestran los mismos parámetros obtenidos en agua a pH 9,1 y 3,0. Con la ayuda de la Tabla VIII.3 se pueden correlacionar estos valores con las estructuras moleculares de los colorantes. El estudio se centró en la identificación de la fuente principal de la varianza de los valores de $B_{pendiente}$ y B_{forma} , entre unos y otros cromóforos.

En la Tabla VIII.1 se observa que, para cada longitud de onda de bombeo, los valores de $B_{pendiente}$ siguen el orden:

$$RF > ABF > AT > PBC > ABT$$

Los valores de $B_{pendiente}$ obtenidos en agua fueron mayores que los obtenidos en la mezcla agua:etanol (ver Tablas VIII.1 y VIII.2). La teoría expuesta anteriormente no puede explicar los elevados valores, mayores que la unidad, obtenidos con rojo fenol a pH 9,1. Sin embargo, se confirma el orden indicado más arriba, con las excepciones de AT y ABF para las series realizadas a pH 9,1 y 3,0, respectivamente, que proporcionaron valores bajos de $B_{pendiente}$, para estos dos colorantes.

Los valores de B_{forma} muestran una mayor dispersión, sin embargo, se confirma el orden observado para $B_{pendiente}$ con la mayoría de los compuestos estudiados. De este modo, en el medio agua/etanol de pH 1,1 y a 514,5 nm, RF y ABF mostraron valores bajos, pero los otros colorantes presentaron el orden $AT > PBC > ABT$. En el mismo medio a 458 nm, RF y AT también proporcionaron valores bajos, pero los otros compuestos siguieron el orden $ABF > PBC > ABT$. En agua a pH 9,1, no pudo obtenerse el valor correspondiente a ABF, y AT originó un valor bajo, mientras que los otros colorantes siguieron de nuevo el orden $RF > PBC > ABT$. Finalmente, a pH 3,0, ABF proporcionó un valor bajo, y los otros colorantes cumplieron el orden $RF > AT > PBC > ABT$.

Tabla VIII.1.- Sensibilidades en ELT y en espectrofotometría, y valores de B, para los colorantes de ftaleína, en una mezcla agua/etanol 4:1 (v/v) que contenía HCl 0,08 M.

Compuesto	λ (nm)	$(\Delta I/I)/x_0^a$ (mol ⁻¹ dm ³ x 10 ⁴)	ϵ (mol ⁻¹ m ²)	β (mol ⁻¹ dm ³ x 10 ⁴)	γ (mol ⁻² dm ⁶ x 10 ⁹)	B _{pendiente}	B _{forma}
Rojo fenol	514,5	92	2710 ± 10	80,1	525	0,198	0,28
	488	82	2100 ± 100	-	-	0,228	-
	458	21	1250 ± 5	14,6	21,9	0,098	0,42
Azul de bromofenol	514,5	8,0	270 ± 4	6,5	2,3	0,173	0,16
	488	18	670 ± 50	-	-	0,157	-
	458	7,8	1300 ± 20	12,6	42,0	0,080	0,89
Azul de tímol	514,5	32	1180 ± 10	29,6	216	0,158	0,73
	488	15,0	610 ± 50	-	-	0,143	-
	458	6,3	560 ± 6	6,1	-	0,066	- ^b
Púrpura de bromocresol	514,5	6,1	270 ± 5	8,3	12,2	0,132	0,65
	488	17,2	840 ± 10	-	-	0,119	-
	458	20	1920 ± 10	12,1	50,6	0,060	0,77
Azul de bromotímol	514,5	7,6	360 ± 6	14,0	81,9	0,123	0,51
	488	16,3	880 ± 15	-	-	0,108	-
	458	15,8	1560 ± 15	16,4	32,9	0,059	0,45

^a Obtenidos en una misma sesión de trabajo, las desviaciones estándar relativas variaron entre el 5 y el 9%.

^b No se pudo calcular por ser γ negativo.

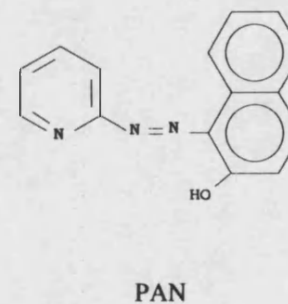
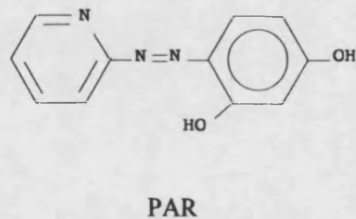
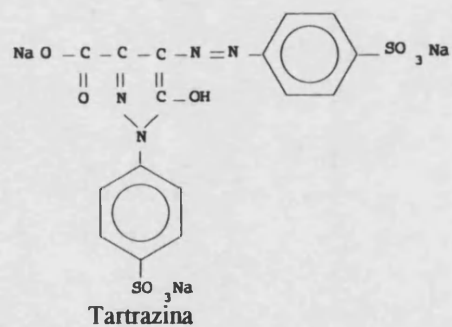
Tabla VIII.2.- Sensibilidades en ELT y en espectrofotometría, y valores de B, para las ftalesínas en agua, a dos valores de pH.

Longitud de onda y pH	Compuesto	$(\Delta I/I)/x_0$ ($\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \times 10^4$)	ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{m}^2$)	β ($\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \times 10^4$)	γ ($\text{mol}^2 \text{dm}^6 \times 10^9$)	$B_{\text{pendiente}}$	B_{forma}
514,5 nm pH = 9,1	Rojo fenol	52,5	680	44,6	428	1,94	1,64
	Azul de bromofenol	32,1	1160	28,3	148	0,70	0,53
	Azul de timol	10,9	610	8,41	28,7	0,45	0,65
	Púrpura de bromocresol	34,3	1580	28,3	182	0,55	0,47
	Azul de bromotimol	16,5	895	15,9	11,1	0,47	0,091
488 nm pH = 3,0	Rojo fenol	6,26	205	5,18	9,38	0,77	1,03
	Azul de bromofenol	8,98	823	10,6	-	0,28	-
	Azul de timol	10,54	606	11,1	9,28	0,44	0,160
	Púrpura de bromocresol	10,97	887	9,19	31,7	0,31	0,45
	Azul de bromotimol	8,08	904	8,60	7,64	0,23	0,115

Tabla VIII.3.- Estructura molecular de las ftalefnas y azocolorantes utilizados.

Compuesto	Ftalefnas			Compuesto	Azocolorantes			
	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Rojo fenol	-H	-H	-H	Amarillo de metilo	-N(CH ₃) ₂	-H	-H	-H
Azul de bromofenol	-Br	-Br	-H	Tropeolina 00	-SO ₃ Na	-H	-H	-NH-Ph ^a
Azul de tímol	-H	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	Amarillo de metanilo	-H	-SO ₃ Na	-H	-NH-Ph ^a
Púrpura de bromocresol	-Br	-CH ₃	-H	Rojo de metilo	-N(CH ₃) ₂	-H	-COOH	-H
Azul de bromotímol	-Br	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃					

Otros azocolorantes



^a Ph = fenilo

Para explicar el orden observado, debe evaluarse la importancia relativa de los tres términos del denominador de la ecuación VIII.17, lo que puede hacerse utilizando datos bibliográficos. De este modo, para una gran variedad de moléculas orgánicas e iones, las difusibilidades de los electrolitos y no electrolitos orgánicos están comprendidas en un estrecho intervalo, entre $D = 0,52$ y $1,1 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para sacarosa y glicolamida, respectivamente [106]. Como se indica en la ecuación VIII.16, k_D es proporcional a D y, probablemente, también es algo menor que D . El valor de k_C es también desconocido, pero probablemente es pequeño a los valores bajos de la señal utilizados para obtener $B_{\text{pendiente}}$. Por lo tanto, los valores típicos de $4(k_D + k_C)$ podrían encontrarse en el intervalo de $0,5$ a $5 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Además, el término de difusión-convección también debe oscilar dentro de un intervalo muy pequeño, para todos los cromóforos en un disolvente dado.

Para calcular el término de difusión-convección (ecuación VIII.19), se debe estimar el radio del haz de bombeo en su cintura. Para ello, se puede emplear la siguiente expresión [126]:

$$(\omega_{\text{bombeo}})_{\text{cintura}} = \frac{\lambda_{\text{bombeo}} F}{d} \quad \text{(VIII.29)}$$

donde F es la distancia focal de la lente utilizada para enfocar el haz de bombeo, y d es el diámetro del haz incidente. En nuestro caso, $F = 100 \text{ mm}$ y $d = 1,4 \text{ mm}$ (valor dado por el fabricante del láser), lo que proporciona los valores $(\omega_{\text{bombeo}})_{\text{cintura}} = 3,7$, $3,5$ y $3,3 \text{ }\mu\text{m}$ a $514,5$, 488 y 458 nm , respectivamente. Así, el término de difusión-convección de la ecuación VIII.19 oscilará dentro del intervalo $3,7 \times 10^6 - 4,5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$.

Si k_q varía entre 1×10^5 y $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ (procesos de conversión externa), el término de difusión-convección será del mismo orden o algo mayor que k_q , y los procesos de difusión-convección competirán eficazmente con el proceso no radiativo de relajación, en la reducción de la señal de ELT. Si el término de saturación óptica no predominara y el término de difusión-convección fuera aproximadamente el mismo para todos los solutos sometidos a estudio, un aumento de k_q provocaría también un aumento en B . En una situación extrema, en la que el valor del término de difusión-convección fuera $3,7 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ y $k_q = 1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, resulta $B = 0,73$. En cambio, para un valor de $4,5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ para el término de difusión-convección, y $k_q = 1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, el valor de B será $0,02$.

Los colorantes más fuertemente asociados a las moléculas de disolvente deberán poseer valores de k_q mayores y, por lo tanto, también B tendrá valores altos. A la vista de las estructuras moleculares de las ftaleínas, el grupo fenólico puede jugar un papel importante, facilitando los procesos de conversión externa mediante la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas del disolvente polar. La fuerza de los enlaces de hidrógeno aumentará con la polaridad del grupo, y disminuirá, si existe un impedimento estérico producido por la presencia de grupos apolares en posición *orto*.

De acuerdo con esto y en comparación con las otras ftaleínas, el rojo fenol, que tiene dos grupos fenol *para*, fuertemente polares, y que no posee sustituyentes en posición *meta* (*orto* respecto a los grupos fenol), debería presentar el valor más alto de k_q . Esto está de acuerdo con los elevados valores de B obtenidos para este compuesto. Siguiendo el orden de los valores de B, los sustituyentes *meta* son: H,H (RF) > Br,Br (ABF) > H,isopropilo (AT) > Br,metilo (PBC) > Br,isopropilo (ABT). El impedimento estérico de los sustituyentes fenol en posición *para*, la hidrofobicidad del entorno, y la menor polaridad debilitan progresivamente, a lo largo de la serie de colorantes, los puentes de hidrógeno establecidos con las moléculas polares del disolvente. Conforme a esto, tanto k_q como B deberían disminuir, como efectivamente ocurre.

Los valores de los parámetros estimados pueden utilizarse en el cálculo de $(\epsilon P)_{\text{crit}}$, tal como se indica en la ecuación VIII.20. De esta forma, por ejemplo, a 488 nm y empleando los valores calculados anteriormente, la suma del término de difusión-convección y k_q puede variar entre $4,2 \times 10^6$ y $4,2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. De ahí que, $(\epsilon P)_{\text{crit}}$ se encuentre en el intervalo entre 8,6 y 86 $\text{W mol}^{-1} \text{ m}^2$. Por lo tanto, para 80 mW el valor crítico de ϵ al cual comienzan a ser significativos los efectos de la saturación óptica variará entre 110 y 1100 $\text{mol}^{-1} \text{ m}^2$. Esto indica que en las experiencias expuestas en este capítulo (y en muchas otras de la bibliografía) puede alcanzarse (o haberse alcanzado), efectivamente, un grado significativo de saturación óptica, particularmente con moléculas que presentan valores bajos de k_q . De acuerdo con la teoría, un aumento del producto ϵP haría disminuir B. Sin embargo, no se ha observado una correlación inversa entre ϵP y B. Probablemente, las variaciones de k_q sean tan grandes que enmascaren los efectos de las variaciones del término de excitación.

b) Los azocolorantes

Los datos obtenidos para los azocolorantes en el medio agua/etanol 4:1, de pH 1,1, se muestran en la Tabla VIII.4. Los compuestos han sido ordenados para valores decrecientes de $B_{pendiente}$. Se cumple el orden amarillo de metilo > tropeolina 00 > amarillo de metanilo > rojo de metilo para los valores de $B_{pendiente}$ y B_{forma} . Los otros tres compuestos proporcionaron valores menores de $B_{pendiente}$, siguiendo el orden tartrazina > PAR > PAN. Sin embargo, para B_{forma} se obtuvo: tartrazina \approx PAR \approx PAN.

Según la teoría presentada anteriormente, la capacidad de transferir rápidamente la energía al disolvente parece depender principalmente de la linealidad de la molécula, y de la polaridad y el entorno hidrofílico de los grupos polares. De esta forma, la disminución de los valores de $B_{pendiente}$ y B_{forma} , observada al comparar el amarillo de metilo con el rojo de metilo, puede ser debida a la presencia del sustituyente carboxílico en este último, que produce la pérdida de linealidad en la molécula. Además, el rojo de metilo mostró un valor de ϵ particularmente alto y, por lo tanto, los valores de $B_{pendiente}$ y B_{forma} obtenidos para rojo de metilo pueden verse también disminuidos por el efecto del término de excitación.

En comparación con el amarillo de metilo, los menores valores de $B_{pendiente}$ y B_{forma} obtenidos para tropeolina 00 y amarillo de metanilo, pueden atribuirse al sustituyente fenilo hidrofóbico. Además, la disminución de B observada en la serie, desde la tropeolina 00 al amarillo de metilo, puede deberse a la diferente posición del grupo sulfónico, que reduce aún más la linealidad.

En la parte baja de la tabla, el menor valor de $B_{pendiente}$ obtenido con el PAN, comparado con el PAR, también está de acuerdo con la menor polaridad y el mayor carácter hidrofóbico del PAN. Debido a la presencia del nitrógeno heterocíclico y a otros detalles estructurales, estos dos compuestos, junto con la tartrazina, son también menos lineales que los otros azocolorantes mostrados al principio de la tabla. De este modo, los datos obtenidos para los azocolorantes también apoyan las conclusiones obtenidas con las ftaleínas.

Tabla VIII.4.- Sensibilidades en ELT y en espectrofotometría, y valores de B, para diversos azocolorantes, bombeados a 514,5 nm, en una mezcla agua/etanol 4:1 (v/v), que contenía HCl 0,08 M.

Compuesto	$(\Delta I/I)/x_0$ (mol ⁻¹ dm ³ x 10 ⁴)	ϵ (mol ⁻¹ m ²)	β (mol ⁻¹ dm ³ x 10 ⁴)	γ (mol ⁻² dm ⁶ x 10 ⁹)	B _{pendiente}	B _{forma}
Amarillo de metilo	221	3744	215,6	3500	0,344	0,51
Tropeolina 00	87,8	2937	93,8	1080	0,174	0,46
Amarillo de metanilo	77,3	2753	74,9	630	0,164	0,36
Rojo de metilo	134,9	5010	119	1510	0,157	0,30
Tartrazina	0,829	32,0	0,8	0,09	0,151	0,39
PAR	1,149	532	9,4	17,2	0,126	0,40
PAN	1,655	209	1,2	0,80	0,0462	0,40

No se han explicado las diferencias entre los valores de $B_{pendiente}$ y B_{forma} . Probablemente, este último parámetro esté expuesto a mayores fuentes de ruido. Así, la influencia de la convección es mayor al aumentar el valor de las señales empleadas para calcular γ . Además, la eficacia del instrumento está incluida dentro de los valores de $B_{pendiente}$, pero no afecta a la relación γ/β , de la misma manera que afecta a la pendiente inicial, β .

Es necesario trabajo adicional para validar la teoría desde un punto de vista cuantitativo, en lugar de la visión cualitativa o semicuantitativa de la discusión anterior. Lamentablemente, nuestras experiencias se han hallado limitadas por la baja potencia del láser utilizado, y por el limitado número de longitudes de onda disponibles, que impidió realizar el bombeo a la longitud de onda de máxima absorción de los colorantes.

c) Saturación óptica en disolventes apolares

Se realizó también un estudio del fenómeno de la saturación óptica en tetracloruro de carbono y benceno, utilizando como cromóforos colorantes apolares y complejos metálicos de ditizona. El estudio se basó, por un lado, en experiencias realizadas en nuestro laboratorio, en las que se utilizó el espectrómetro de lente térmica descrito en el capítulo III, bombeado por un láser de Ar^+ de onda continua. Por otro lado, se utilizaron los datos obtenidos por Terazima y col. [119] en tetracloruro de carbono y en benceno, obtenidos con un láser de nitrógeno pulsado a 337 nm, como fuente del haz de bombeo.

En principio, de los resultados no se obtiene evidencia alguna que obligue a rechazar o modificar alguno de los argumentos y ecuaciones desarrolladas para solutos polares en agua y en mezclas hidro-alcohólicas. En ambos disolventes, polares y apolares, los datos soportan la hipótesis de que los solutos que se relajan con mayor rapidez son los que interaccionan fuertemente con las moléculas del disolvente. Sin embargo, los resultados evidencian que la naturaleza de la interacción soluto-disolvente en disolventes polares y apolares es muy diferente. En los primeros, dicha interacción tiene lugar a través de puentes de hidrógeno no impedidos estéricamente, siendo también importante la linealidad de la molécula y su momento dipolar.

Como se muestra en los resultados y discusión que siguen, en disolventes apolares los solutos que muestran mayores valores de B (ecuación VIII.25) y, por tanto, los que se relajan con mayor rapidez, son los más hidrofóbicos y, más concretamente, los que no tienen impedida su interacción con el disolvente hidrofóbico por la presencia de sustituyente polares.

c.1) Reactivos

Los colorantes utilizados fueron los siguientes: azul de timol (Merck, Darmstadt, Alemania), azul de bromotimol y rojo de metilo (RM, Riedel, Seelze, Alemania). Para la preparación y extracción de los ditizonatos, se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico: ditizona (Merck), ácido acético, ácido clorhídrico, ácido nítrico, amoníaco y cloruro amónico (Panreac, Barcelona).

Las disoluciones estándar de los colorantes se prepararon en concentración 1×10^{-3} M, disolviendo los mismos en la mínima cantidad posible de etanol (grado analítico, Panreac), y diluyendo después con tetracloruro de carbono (grado HPLC, Panreac). Las diluciones posteriores se realizaron con tetracloruro de carbono.

Las disoluciones de los metales se prepararon a partir de nitrato de plata, nitrato de bismuto y cloruro de mercurio(II), todos ellos de grado analítico (Panreac). Las disoluciones se prepararon con agua desionizada ultrapura. La concentración de las disoluciones madre de los metales en agua fue de $5,35 \times 10^{-4}$ M, $1,38 \times 10^{-3}$ M y $2,34 \times 10^{-3}$ M para bismuto, plata y mercurio(II), respectivamente. Las disoluciones madre en tetracloruro de carbono se prepararon en las siguientes concentraciones: $4,81 \times 10^{-5}$ M, $2,11 \times 10^{-4}$ M y $1,23 \times 10^{-4}$ M para bismuto, plata y mercurio(II), respectivamente. Todo el material de vidrio utilizado en el desarrollo de las experiencias con los ditizonatos metálicos, se mantuvo en un baño de HNO_3 1 M, al menos durante 24 horas antes de su utilización.

c.2) Preparación de los extractos metálicos

La disolución de ditizona en tetracloruro de carbono de concentración 8×10^{-4} M, se purificó por extracción con amoníaco 0,15 M [127], se descartó la fase orgánica conteniendo las impurezas y se acidificó con HCl 0,1 M; finalmente, se extrajo la ditizona con tetracloruro de carbono hasta decoloración de la fase acuosa.

Para la *extracción del ditizonato de bismuto*, se tomó 5 ml de la disolución madre de nitrato de bismuto(III) y se ajustó el pH a 3,1 con amoníaco diluido; posteriormente, se extrajo el bismuto con alícuotas de 5 ml de la disolución de ditizona. Finalmente, se combinaron los extractos y se lavaron con agua y con tampón amonio/amoníaco de pH 10.

Para obtener el *extracto del ditizonato de mercurio*, se adicionó HCl a la disolución acuosa de nitrato de mercurio(II) hasta una concentración 1 M; posteriormente, el complejo metálico se extrajo con alícuotas de 5 ml de ditizona y se eliminó la ditizona libre de la fase orgánica, agitando con amoníaco diluido. Finalmente, se lavó con ácido acético 2 M y se diluyó a 50 ml con tetracloruro de carbono.

El *ditizonato de plata se extrajo* de la disolución acuosa de nitrato de plata(I), a la que se adicionó ácido nítrico hasta concentración 1-2 M, con alícuotas de ditizona en tetracloruro de carbono. Se combinaron los extractos y se retroextrajo la plata a la fase acuosa con HCl 1 M; posteriormente, se ajustó el pH de ésta a 4-5 con amoníaco, y se extrajo el ditizonato de plata con alícuotas de la disolución de ditizona en tetracloruro de carbono. Para eliminar la ditizona libre, se lavó con amoníaco diluido. Finalmente, se diluyó la fase orgánica a 50 ml con tetracloruro de carbono. Todos los procedimientos de extracción se tomaron de la ref. [127].

c.3)) Procedimiento seguido para la obtención de las sensibilidades

Se midieron series de cinco disoluciones de concentraciones crecientes de los colorantes y de los ditizonatos metálicos. La sensibilidad inicial en ELT, $(\Delta I/I)/x_0$, se obtuvo ajustando linealmente los datos para valores bajos de x_0 , despreciando el término cuadrático de la ecuación VIII.26. La sensibilidad en espectrofotometría se obtuvo a partir de curvas de calibrado realizadas con series de cuatro disoluciones. Finalmente, los valores de $B_{pendiente}$ se obtuvieron a partir de la ecuación VIII.25, calculando los cocientes $[(\Delta I/I)/x_0]/(\epsilon b)$. Para el tetracloruro de carbono, se utilizó el valor $(dn/dT)/\kappa = 5,942 \times 10^{-4} \text{ mW}^{-1} \text{ cm}$ [12].

c.4) Colorantes orgánicos bombeados con un láser de nitrógeno

En la Tabla VIII.5 se muestran los datos tomados de Terazima y col. [119]. En estas experiencias los autores obtuvieron valores de señal corregida de lente térmica, donde se elimina la influencia de la fluorescencia y de las variables instrumentales. Si se desprecia el término cuadrático de la expresión VIII.24, se puede escribir:

$$S_c = \frac{\Delta I}{I} = B\theta \quad \text{(VIII.30)}$$

Los autores utilizaron, para comparar los diferentes compuestos, el parámetro S_c^r :

$$S_c^r = \frac{S_c}{S_c^p} \quad \text{(VIII.31)}$$

donde S_c^p es el valor de S_c , para una sustancia tomada como referencia, en este caso, la benzofenona. Si se define B^r como valor relativo de B respecto a una sustancia de referencia, y se expresa en función de S_c , a partir de la ecuación VIII.30 se tiene:

$$B^r = \frac{B}{B_p} = \frac{S_c}{\theta} \times \frac{\theta^p}{S_c^p} = S_c^r \quad \text{(VIII.32)}$$

Terazima y col. escogieron las condiciones experimentales de forma que la absorbancia medida fuera igual para todos los compuestos, por lo que el valor de θ también es el mismo para todos ellos. Por lo tanto, a la vista de la ecuación VIII.32, los valores de sensibilidad relativa de la señal de lente térmica, dados por los autores, deben interpretarse como valores relativos del coeficiente B.

Con el fin de poder realizar comparaciones, en la Tabla VIII.5 se recogen también las estructuras moleculares, y los datos se han ordenado atendiendo a ellas. Los mayores valores de B corresponden a los dos hidrocarburos aromáticos policíclicos no sustituidos. Los compuestos con fenilos no condensados dan valores más bajos de B. La regla de la hidrofobicidad falla con la pareja biacetilo-bencilo, que sale invertida, si bien, los datos obtenidos con biacetilo pueden no ser comparables con los demás, ya que este compuesto es alifático.

Para la serie de los compuestos heterocíclicos, de nuevo, el mayor valor de B se tiene con un compuesto que posee tres anillos condensados, frente a los compuestos con dos anillos condensados. La regla de la mayor hidrofobicidad vuelve a cumplirse con las parejas nitrodifenilamina/*p*-nitroanilina y dimetilazobenceno/azobenceno.

Otros dos factores que pueden reducir el valor de B son la pérdida de linealidad de la molécula y la presencia de sustituyentes polares. El efecto de la pérdida de linealidad se observa con la pareja antraceno/fenantreno en tetracloruro de carbono, sin embargo, los compuestos de la Tabla VIII.5 no dan mayor evidencia sobre este punto. La presencia de sustituyentes polares reduce el valor de B para las parejas antraceno/dibromoantraceno, benzofenona/antraquinona y antraquinona/amino-antraquinona.

Tabla VIII.5.- Valores relativos de B en tetracloruro de carbono y benceno, y estructura para algunas moléculas.

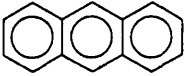
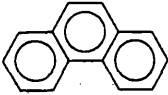
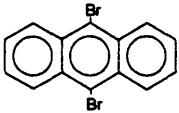
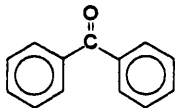
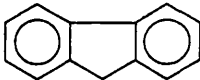
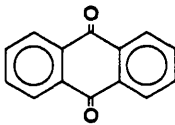
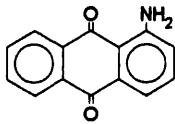
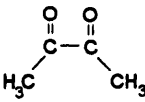
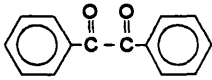
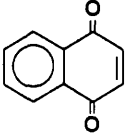
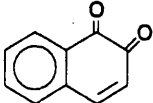
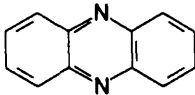
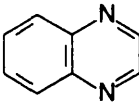
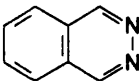
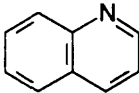
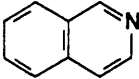
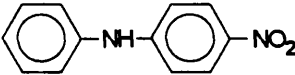

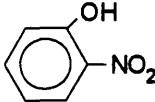
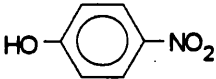
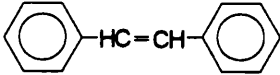
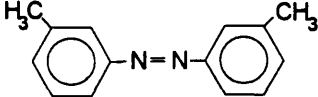
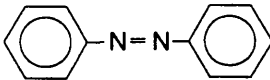
Compuesto	Estructura	B ^f _{CCl₄}	B ^f _{benceno}
Antraceno		1,42	1,00
Fenantreno		1,06	0,99
9,10-Dibromoantraceno		1,01	0,90
Benzofenona		1,00	1,00
Fluorenona		0,99	0,85
9,10-Antraquinona		0,80	0,79
Amino-9,10-antraquinona		0,70	0,72
Biacetilo		0,95	0,91
Bencilo		0,82	0,79
1,4-Naftoquinona		0,80	0,80
1,2-Naftoquinona		0,76	0,82

Tabla VIII.5 (continuación).

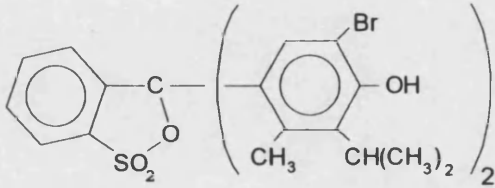
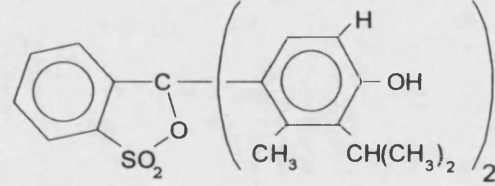
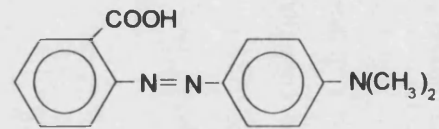
Compuesto	Estructura	B'_{CCl_4}	$B'_{benzene}$
Fenacina		0,99	0,72
Quinoxalina		0,87	0,73
Ftalacina		0,80	0,73
Quinolina		0,78	0,68
Isoquinolina		0,78	0,85
Nitrodifenilamina		0,76	0,68
<i>p</i> -Nitroanilina		0,69	0,67
<i>o</i> -Nitrofenol		0,69	0,62
<i>p</i> -Nitrofenol		0,63	0,65
Estilbeno		0,77	0,65
3,3'-Dimetilazobenceno		0,66	0,64
Azobenceno		0,61	0,68

c.5) Colorantes orgánicos bombeados con un láser de ion argon

En la Tabla VIII.6 se muestran los datos obtenidos por nosotros, utilizando disoluciones de tres colorantes orgánicos en tetracloruro de carbono. En general, al aumentar la potencia, se incrementa el valor de B, lo que coincide con lo predicho por la ecuación VIII.25 y que, de acuerdo con la teoría que hemos desarrollado, debe corresponder a un aumento del grado de saturación óptica.

Aunque es difícil proporcionar una interpretación fiable de lo observado, debido a la concurrencia de los diversos factores que intervienen en la ELT y en la estructura molecular de los solutos y disolventes, así como a su interrelación, se distinguen algunas tendencias. En el azul de bromotimol, la sustitución con bromo aumenta el valor de B, al contrario de lo que sucedía en el caso de la pareja antraceno/dibromoantraceno. Sin embargo, para el azul de bromotimol, el efecto de la sustitución con bromo bien pudiera facilitar la interacción del cromóforo con el disolvente, al inhibir estéricamente al grupo -OH en *orto*. El rojo de metilo da lugar a valores extremadamente bajos de B, lo que podría ser debido a los sustituyentes polares, a la falta de linealidad y al valor mucho mayor de la absorptividad molar, en comparación con los otros compuestos.

Tabla VIII.6.- Sensibilidad en ELT y espectrofotometría, y valores de B, para tres colorantes en tetracloruro de carbono.

Compuesto	P (mW)	ϵ (mol ⁻¹ m ²)	$(\Delta I/I)/x_0$ (mol ⁻¹ dm ³)	B _{pendiente}	Estructura
Azul de bromotimol	50	87	9461	0,0126	
	100		1,947x10 ⁴	0,0129	
	300		1,669x10 ⁵	0,0370	
Azul de timol	50	329	5,668x10 ³	0,0020	
	100		4,604x10 ⁴	0,0081	
	300		3,106x10 ⁵	0,0182	
Rojo de metilo	50	6669	1,771x10 ⁵	3,1x10 ⁻⁴	
	100		2,795x10 ⁵	2,4x10 ⁻⁴	

c.6) *Ditizonatos metálicos*

En las Tablas VIII.7 y VIII.8 se muestran datos obtenidos con los ditizonatos de Bi(III), Hg(II) y Ag(I). Las medidas se realizaron bombeando con tres líneas de emisión del láser de ion argon, utilizando las siguientes potencias: 100, 200 y 300 mW a 514,5 nm, 100 mW a 488 nm, y 50 mW a 458 nm. El haz de bombeo se moduló a 4 Hz.

Tabla VIII.7.- Sensibilidad en ELT y espectrofotometría, y valores de B, para los ditizonatos metálicos en tetracloruro de carbono.

λ (nm)	Compuesto ^a	$(\Delta I/I)/x_0$ (mol ⁻¹ dm ³)	ϵ (mol ⁻¹ m ²)	B _{pendiente}
458	Bi(DTZ) ₃	4,917x10 ⁴	1161	0,0049
	Hg(DTZ) ₂	2,712x10 ⁵	5666	0,0055
	Ag(DTZ)	1,852x10 ⁵	1761	0,0122
488	Bi(DTZ) ₃	1,212x10 ⁵	1435	0,0049
	Hg(DTZ) ₂	1,747x10 ⁶	7711	0,0131
	Ag(DTZ)	5,554x10 ⁵	1517	0,0212
514,5	Bi(DTZ) ₃	4,799x10 ⁴	1311	0,0021
	Hg(DTZ) ₂	1,543x10 ⁶	5673	0,0157
	Ag(DTZ)	3,820x10 ⁵	1084	0,0204

^a HDTZ = ditizona

Tabla VIII.8. - Sensibilidad en ELT y valores de B, para los ditizonatos metálicos a diferentes potencias de bombeo, utilizando la línea de 514,5 nm.

Compuesto ^a	P (mW)	$(\Delta I/I)/x_0$ (mol ⁻¹ dm ³)	B _{pendiente}
Bi(DTZ) ₃	100	3,030x10 ⁵	0,0134
	200	5,378x10 ⁵	0,0119
	300	6,750x10 ⁵	0,0027
Ag(DTZ)	100	1,880x10 ⁶	0,1002
	200	3,665x10 ⁶	0,0748
	300	2,084x10 ⁶	0,0370

^a HDTZ = ditizona

A las tres longitudes de onda se observa que los valores de B crecen en el sentido Bi(III) < Hg(II) < Ag(I). En presencia de un exceso de ditizona, estos complejos tienen estequiometrías 1:3, 1:2 y 1:1, respectivamente [127,128]. Por lo tanto, B aumenta al reducirse el número de ligandos unidos al ion central. Este resultado, que indica una mayor facilidad de relajación de los complejos de menor tamaño y más baja estequiometría, podría ser debido a una mayor proximidad entre el ion central y las moléculas del disolvente. Al menos, es razonable suponer que la relajación se produzca de forma competitiva a través de enlaces cloro-metal, ya que los tres metales utilizados muestran en su comportamiento general una elevada afinidad por el cloro como átomo dador. Por otra parte, el valor de B disminuye al aumentar la potencia de bombeo, en consonancia con la teoría y con los datos obtenidos anteriormente con otros cromóforos en disolventes polares.

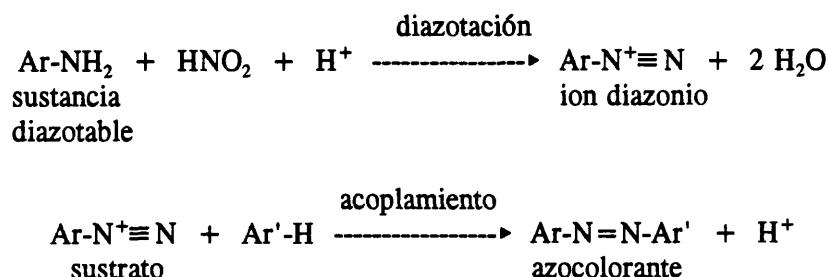
**IX.- CONTROL DE CALIDAD DE CLEMBUTEROL EN PREPARADOS
FARMACÉUTICOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE LENTE
TÉRMICA**

**IX.- CONTROL DE CALIDAD DE CLEMBUTEROL EN PREPARADOS
FARMACÉUTICOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE LENTE TÉRMICA**

IX.1.- Introducción

a) *Reacción de diazotación y acoplamiento*

Las arilaminas reaccionan con nitrito en exceso, en medio ácido, para formar iones diazonio, en la reacción llamada de diazotación. Una vez eliminado el exceso de nitrito, se realiza el acoplamiento entre el sustrato y el ion diazonio, para originar el azocolorante [127, 129]. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



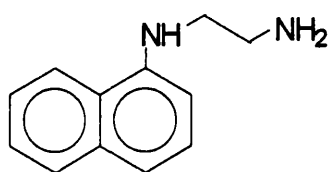
Los compuestos azo producidos en la reacción de acoplamiento absorben en el visible, con una longitud de onda de máxima absorción y absorptividad molar que dependen de la estructura del producto formado, del pH y del disolvente. La absorptividad molar generalmente es elevada y permite la determinación de una gran variedad de compuestos, en concentraciones del orden del $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Para que la reacción sea rápida y cuantitativa, el sustrato, Ar'-H, debe poseer un anillo aromático activado frente a la sustitución electrofílica. Los sustratos más utilizados son fenoles y arilaminas, pero también se pueden derivatizar ariléteres cuando el ion diazonio es muy reactivo. Para que el acoplamiento sea satisfactorio, es necesario que las posiciones *orto* o *para* activadas del anillo no se encuentren directamente bloqueadas por sustitución, ni presenten un apantallamiento estérico, producido por un sustituyente voluminoso en una posición adyacente.

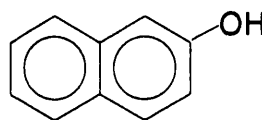
Las determinaciones basadas en una reacción de acoplamiento electrofílico con una sal de diazonio pueden dividirse en tres grupos:

- (i) Acoplamiento del analito con el ion diazonio.
- (ii) Conversión del analito en una sal de diazonio y acoplamiento con un sustrato adecuado.
- (iii) Conversión del analito orgánico en ácido nitroso, que es determinado posteriormente mediante diazotación de una arilamina, y acoplamiento del ion diazonio formado con otra arilamina.

La diazotación del analito y el posterior acoplamiento con un sustrato adecuado es un procedimiento frecuente. Los sustratos más usuales son la (1-naftil)etilendiamina (NED, reactivo de Bratton-Marshall, I) [130] y el 2-naftol (II). El primero es el más utilizado en análisis cuantitativo, ya que generalmente forma compuestos solubles con altos valores de absorptividad molar. El 2-naftol, frecuentemente, da lugar a productos insolubles y es más utilizado en ensayos cualitativos. Cuando el compuesto que se determina se diazota, es muy importante optimizar las condiciones experimentales (acidez, concentración de los reactivos y tiempo de reacción), debido a que las sales de diazonio son usualmente inestables, y cualquier pérdida por descomposición de la sal de diazonio o por el desarrollo de reacciones laterales, disminuye la sensibilidad y la precisión del análisis.

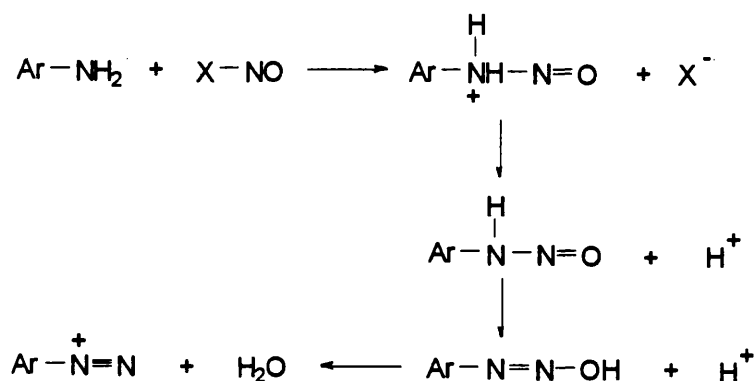
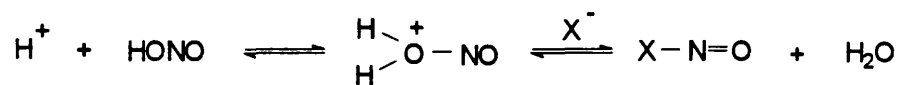
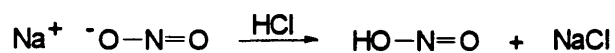


(I)



(II)

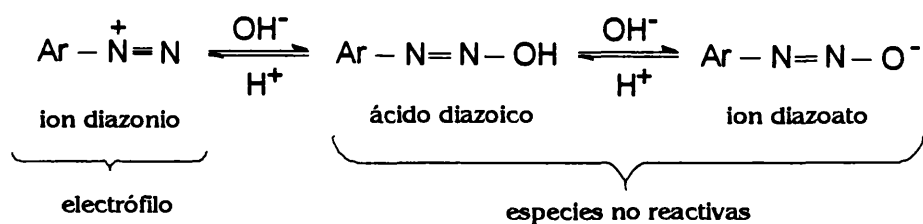
La reacción de las aminas aromáticas con el ácido nitroso, para formar sales de diazonio, puede llevarse a cabo independientemente de la presencia de otros sustituyentes sobre el anillo. El mecanismo de la reacción es el siguiente [131, 132]:



Los reactivos nitrosantes más utilizados son el ion ácido nitroso ($\text{H}_2\text{O}-\text{NO}^+$), sales de nitrosilo ($\text{Br}-\text{NO}$ y $\text{Cl}-\text{NO}$) y el trióxido de dinitrógeno (NO_2-NO). La reacción debe verificarse en medio ácido, para que estas especies se encuentren en concentraciones apreciables.

La formación de una sal de diazonio es rápida para valores de pH en el intervalo de 0-3. Cuando esta reacción es inusualmente lenta, o cuando la sal de diazonio es muy inestable, es necesario optimizar el pH para aumentar la velocidad de reacción y minimizar los efectos de descomposición. La velocidad de reacción también se ve incrementada si el pH se ajusta con HCl, en lugar de H_2SO_4 , debido a que la especie $\text{Cl}-\text{NO}$ es un agente nitrosante más poderoso que el HSO_4-NO . Además, la velocidad puede incrementarse por adición de NaBr o KBr, probablemente debido a la formación de $\text{Br}-\text{NO}$, que es un agente nitrosante aún mejor que el $\text{Cl}-\text{NO}$ [132].

Por su parte, la reacción de acoplamiento requiere un disolvente polar para disolver los productos iónicos, siendo el agua y el etanol los más utilizados. Un riguroso control del pH es muy importante para que esta reacción sea rápida y cuantitativa. Ya que sólo la arilamina libre o el anión fenolato son activos en el acoplamiento, un pH demasiado bajo inhibiría la reacción al convertir las arilaminas en iones anilinio, y los iones fenolato en fenoles neutros. Así, las arilaminas sólo reaccionarán rápidamente por encima de pH 5 y los fenoles requerirán un pH tan alto como sea posible. En cambio, a pH 9 o mayor, el ion diazonio se convierte en una especie no reactiva, de acuerdo con el siguiente equilibrio:



Por tanto, el acoplamiento con sustratos amina se debe llevar a cabo en la zona de pH 5-9, y el de los fenoles, en la zona de pH 9-10. El efecto del pH sobre la velocidad de la reacción puede utilizarse para conseguir la diazotación selectiva de una arilamina, en presencia de una amina alifática, sin que esta última reaccione. Por debajo de pH 3, la amina alifática, más básica, se encontrará protonada en mayor grado y, por lo tanto, no reaccionará con el agente nitrosante, mientras que existirá suficiente concentración de arilamina libre, menos básica, para que tenga lugar su diazotación. El pH más adecuado debe encontrarse experimentalmente para cada caso. Debido a que la sal de diazonio se forma a pH bajo, será necesario realizar un ajuste del pH antes de que se produzca el acoplamiento. Así, por ejemplo, en el análisis de sulfonamidas diazotadas con el reactivo de Bratton-Marshall [133, 134], la diazotación debe realizarse en medio muy ácido y el acoplamiento a pH débilmente ácido. Sin embargo, debido a la mayor absortividad molar de los azocolorantes protonados, antes de medir la absorbancia debe acidularse nuevamente hasta un valor de pH 1-2.

Los procedimientos pueden hacerse específicos, en la mayoría de aplicaciones, por medio de la realización de extracciones o separaciones cromatográficas, previas a la reacción de acoplamiento. La separación puede realizarse, también, después del acoplamiento.

Por otro lado, se ha demostrado que el procedimiento de derivatización se simplifica si se realiza en un medio micelar de un tensioactivo, tal como el dodecilsulfato sódico (SDS). Las reacciones de acoplamiento de arilaminas diazotadas con NED son catalizadas positivamente en un medio micelar de SDS y las constantes de protonación de los azocolorantes se ven incrementadas [135-137]. De esta forma, las etapas de acoplamiento y medida se pueden efectuar en una disolución de HCl 0,06 M (pH=1,3), que se consigue al adicionar los reactivos necesarios para completar la derivatización a la disolución de HCl 0,15 M empleada para diazotar la arilamina. En medio no micelar, las reacciones de diazotación y acoplamiento, y la etapa de medida de la absorbancia, se realizan a pH 0-1 y 4-6, respectivamente.

b) Determinación de clenbuterol

El clenbuterol es un β -agonista que se utiliza, principalmente, en el tratamiento de enfermedades pulmonares y en circunstancias en las que está recomendado estimular la respiración, como en el parto, pero también se emplea con frecuencia para el engorde fraudulento de ganado [138, 139]. Dado el interés en la detección y determinación del clenbuterol, se han desarrollado diversos procedimientos para su análisis en orina, ojos e hígado de animales utilizados en alimentación. La detección del clenbuterol en la orina y tejidos de animales se realiza, generalmente, mediante inmunoensayo [140, 141], y su confirmación por cromatografía de gases con detección mediante espectrometría de masas [142-144]. También se han descrito procedimientos que utilizan la cromatografía de líquidos con detección amperométrica [145], espectrofotométrica [146,147], y espectrometría de masas [148].

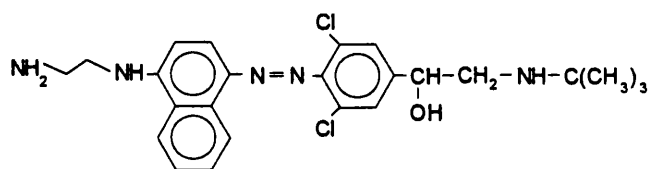
Los métodos espectrofotométricos no son adecuados para la detección del clenbuterol en ganado, debido a su baja sensibilidad, pero pueden ser muy útiles en el control de calidad de preparados farmacéuticos. Debido a su gran actividad farmacológica, el clenbuterol se utiliza en dosis mucho más pequeñas que otros broncodilatadores derivados de la epinefrina (2-5 mg/dosis para la terbutalina y el salbutamol, y 0,02 mg/dosis para el clenbuterol). Una dosis excesiva produce taquicardia, hipotensión y cefalea. De este modo, se requieren procedimientos con una elevada sensibilidad para el control de clenbuterol en preparados farmacéuticos.

La determinación del clenbuterol por espectrofotometría directa en el UV [149, 150] posee una sensibilidad baja. Tanto la sensibilidad como la selectividad pueden mejorarse por acoplamiento con la N,N-dimetilanilina [146], y mediante diazotación con nitrito y acoplamiento con N-(1-naftil)etilendiamina [147]. Sin embargo, debido al reducido contenido de clenbuterol en los preparados farmacéuticos, se necesita una gran cantidad de muestra (varias tabletas), para realizar los análisis. Tal como se ha comentado en capítulos anteriores, el límite de detección de los procedimientos espectrofotométricos puede disminuirse mediante la utilización de la espectrometría de lente térmica. En agua y en otros disolventes polares, los límites de detección en ELT son de 5 a 50 veces inferiores a los de la espectrofotometría convencional, y el intervalo dinámico lineal es de unos dos órdenes de magnitud [12].

Para conseguir límites de detección bajos con ELT, se deben cumplir una serie de condiciones:

- (i) La absorptividad molar del cromóforo debe ser elevada a la longitud de onda de la radiación de bombeo. Así, por ejemplo, con el láser de Ar⁺, que es el más frecuentemente utilizado para las experiencias en ELT, el cromóforo debe absorber fuertemente a 488-514,5 nm.
- (ii) La estabilidad del cromóforo debe ser alta, es decir, la reacción cromogénica debe ser irreversible, y el colorante formado debe ser resistente a la hidrólisis o a otras reacciones.
- (iii) El blanco debe originar una absorbancia muy baja.

Tal como se ha observado con otras arilaminas [137], el azocolorante de clenbuterol-NED (III) cumple las dos primeras condiciones, y los extractos de las preparaciones farmacéuticas originan una cierta dispersión de la radiación, pero su absorbancia es despreciable en el visible. La dispersión de la radiación sobre partículas suspendidas puede dar lugar a señales altas en los blancos en espectrofotometría, pero la ELT no se ve influida por la dispersión [151].



(III)

IX.2.- Parte experimental

a) Instrumentación y reactivos

Se utilizó el espectrómetro de lente térmica descrito en el capítulo III. Se empleó la línea de 514,5 nm del láser de Ar⁺, con una potencia de bombeo de 100 mW y modulado a 4 Hz. También se hicieron experiencias con un espectrofotómetro de fila de diodos Hewlett-Packard 8452A. Siempre se utilizaron celdas de 1 cm de paso óptico.

Se hizo uso de los siguientes reactivos de calidad para análisis: clorhidrato de clenbuterol (Sigma, Barcelona), nitrito sódico, ácido sulfámico (Probus, Barcelona), diclorhidrato de N-(1-naftil)etilendiamina, dodecilsulfato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania) y HCl (Panreac, Barcelona).

Se preparó una disolución que contenía HCl 0,1 M y SDS 0,015 M, y una disolución madre de clenbuterol de 100 µg ml⁻¹ en el mismo medio HCl-SDS. Esta última disolución fue almacenada a 4°C. Para la determinación espectrofotométrica, las concentraciones de las disoluciones de los reactivos fueron: nitrito sódico 0,2 M, ácido sulfámico 0,5 M y NED 1x10⁻³ M. Para la determinación en ELT, las concentraciones fueron: nitrito sódico 0,01 M, ácido sulfámico 0,025 M y NED 1,25x10⁻⁵ M. Los procedimientos optimizados se aplicaron al análisis del preparado Spiropent (Europharma, Madrid), con un contenido declarado de clorhidrato de clenbuterol de 0,02 mg por tableta. El preparado contiene además lactosa y otros excipientes.

b) Derivatización y procedimiento de medida

Tanto en la optimización del procedimiento, como en la preparación de los calibrados y derivatización de la muestra, se siguió el siguiente procedimiento:

Se mezcló una alícuota de disolución estándar de clenbuterol o de muestra con disolución de HCl-SDS, hasta completar un volumen de 15 ml en un matraz aforado de 25 ml. Posteriormente, se adicionó 1 ml de disolución de nitrito sódico y se dejó reaccionar la mezcla durante 5 min; se añadió 1 ml de disolución de ácido sulfámico y después de 10 min, 2 ml de disolución de NED. Finalmente, se completó el volumen hasta 25 ml con disolución de HCl-SDS. Para realizar las medidas de la señal analítica se tomaron alícuotas con una jeringa, se filtraron a través de un filtro de Nylon de 0,22 μm (MSI, Westboro, MA, E.E.U.U.), y se midió la absorbancia a 506 nm, o alternativamente, la señal de lente térmica a 514,5 nm.

c) Preparación de las disoluciones de muestra y blanco

Para el procedimiento espectrofotométrico, se trituraron cuatro tabletas de Spiropent en un mortero, se extrajo tres veces consecutivas el clenbuterol con la disolución de HCl-SDS, separando los extractos por centrifugación, y el volumen combinado se completó a 25 ml con disolución de HCl-SDS. Se aplicó el procedimiento de derivatización y medida explicado anteriormente. Se preparó un blanco interno adicionando la muestra después de haber añadido el NED. En esta etapa del proceso no existe nitrito en la disolución y, por lo tanto, el clenbuterol no se derivatiza. La señal del blanco interno se sustrajo de la proporcionada por la muestra. Alternativamente, se realizó una corrección del ruido, midiendo la absorbancia de la disolución del derivado del clenbuterol a 450, 506 y 550 nm, y siguiendo el método que se explica posteriormente en el texto.

En el procedimiento de ELT, se trituró una sola tableta de Spiropent y se trató cuatro veces con disolución de HCl-SDS. Una vez centrifugada la disolución, se introdujeron los extractos combinados en un matraz aforado de 50 ml, aplicándose el procedimiento de derivatización a alícuotas de 2 ml, y midiendo la señal de ELT. También se utilizó un blanco interno preparado por adición de muestra tras la adición del NED, para la corrección de la señal de la muestra. Al adicionar la muestra en último lugar, se tiene una disolución con todos los componentes de la matriz y en las mismas concentraciones que ésta, a excepción del cromóforo, que no se ha formado.

IX.3.- Resultados y discusión

a) Espectros y estabilidad del azocolorante

En HCl 0,1 M, las disoluciones de clenbuterol sin derivatizar mostraron dos bandas de absorción, con máximos a 246 y 300 nm, y $\epsilon = 7400$ y $2900 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$ (calibrados de cinco puntos), respectivamente. En la Figura IX.1 se muestra el espectro del azocolorante formado por el clenbuterol, a diferentes valores de pH. La especie protonada del azocolorante, predominante en HCl 0,1 M, presenta un máximo de absorción a 506 nm con $\epsilon = 3,14 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$ (calibrado de cinco puntos, intervalo de concentraciones 2×10^{-6} - 2×10^{-5} , $r^2 = 0,9999$), valor mucho mayor que los obtenidos con el clenbuterol sin derivatizar. Los estudios de estabilidad realizados midiendo la absorbancia de la disolución del azocolorante a 506 nm, a temperatura ambiente y a diferentes valores de pH, mostraron que no se producen cambios significativos en el intervalo de pH 1-5, en al menos dos horas.

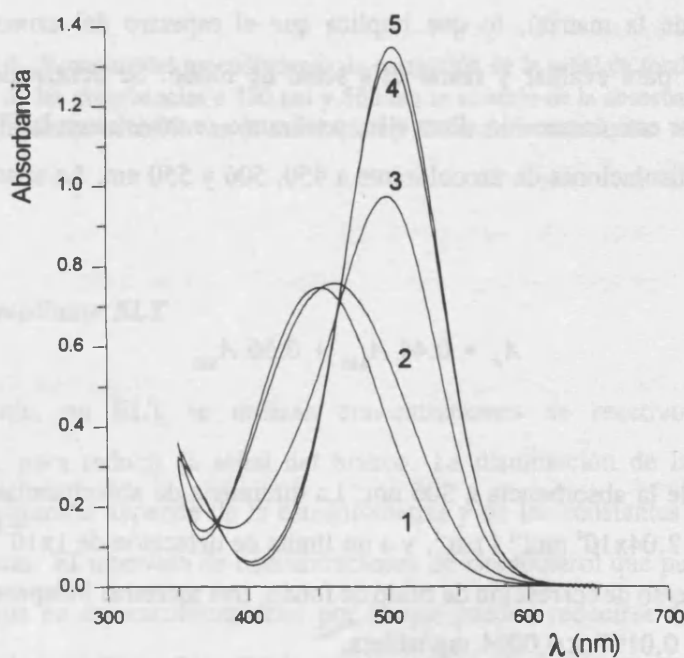


Figura IX.1.- Espectros del azocolorante de clenbuterol-NED, a diversos valores de pH. De 1 a 5, el pH es 4,9 , 3,7 , 2,6 , 1,5 y 1,0 , respectivamente.

b) Determinación espectrofotométrica

En HCl 0,1 M y a 506 nm, el ruido de fondo proporcionado por disoluciones de blanco fue de $s = \pm 8 \times 10^{-4}$ unidades de absorbancia (10 replicados). Utilizando el criterio 3s, se obtuvo un límite de detección para clembuterol de 6×10^{-8} M (equivalente a 21 ng ml⁻¹). El intervalo dinámico fue lineal al menos hasta 6×10^{-5} M. Sin embargo, al analizar la muestra de Spiropent se cometió un error sistemático del 10%, al aplicar el calibrado directamente. Este error se corrigió restando a la absorbancia de la disolución, la absorbancia del blanco interno preparado de la forma descrita más arriba.

El espectro del blanco interno presentó una disminución continua de la absorbancia en el intervalo 450-550 nm, lo que sugirió que la absorbancia de fondo era debida a la dispersión de la radiación sobre las partículas en suspensión (por una ineficaz separación de los extractos de las partículas más finas de la matriz), lo que implica que el espectro del azocolorante contiene la información necesaria para evaluar y restar esta señal de fondo. Se desarrolló un procedimiento alternativo para realizar esta corrección. Para ello, y tal como se muestra en la Figura IX.2, se midió la absorbancia de las disoluciones de azocolorante a 450, 506 y 550 nm. La absorbancia en el punto P se calculó como:

$$A_p = 0,44 A_{450} + 0,56 A_{550} \quad (\text{IX.1})$$

y este valor se restó de la absorbancia a 506 nm. La diferencia de absorbancias corresponde a una absorptividad molar de $2,04 \times 10^4$ mol⁻¹ l cm⁻¹, y a un límite de detección de 1×10^{-7} M (35 ng ml⁻¹). Al utilizar este procedimiento de corrección de ruido de fondo, tres muestras independientes de Spiropent dieron el resultado de $0,0197 \pm 0,0004$ mg/tableta.

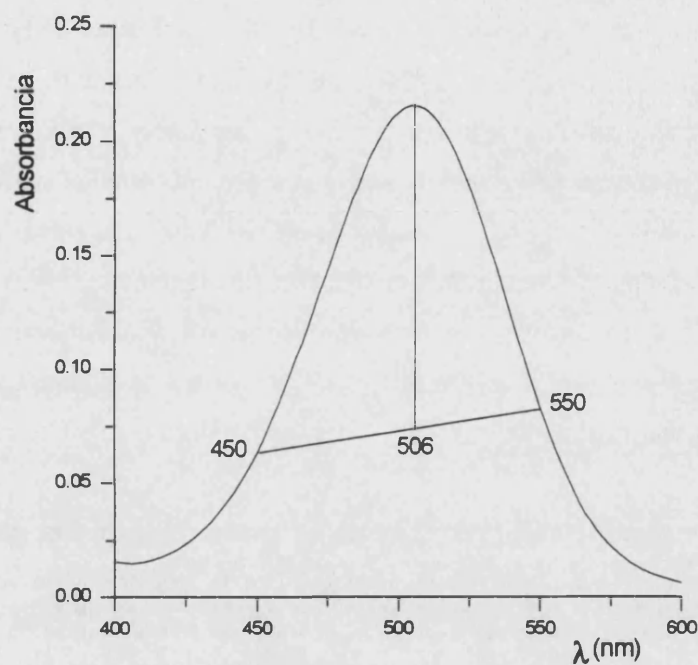


Figura IX.2. - Esquema del procedimiento de corrección de la señal de fondo: el promedio ponderado de las absorbancias a 450 nm y 550 nm se sustrajo de la absorbancia a 506 nm, y el valor resultante se utilizó en la calibración y en las determinaciones.

c) Determinación mediante ELT

Generalmente, en ELT se utilizan concentraciones de reactivos más bajas que en espectrofotometría, para reducir la señal del blanco. La disminución de la concentración de los reactivos de derivatización depende de la estequiometría y de las constantes termodinámicas de las reacciones implicadas. El intervalo de concentraciones de clenbuterol que puede utilizarse en ELT, es mucho menor que en espectrofotometría, por lo que pueden reducirse de forma importante las concentraciones de los reactivos, procurando no alcanzar los límites impuestos por la estequiometría de las reacciones. Además, la formación cuantitativa del azocolorante, a concentraciones muy bajas de los reactivos, está asegurada por la irreversibilidad de las reacciones de diazotación y acoplamiento.

Para una concentración de clenbuterol de 1×10^{-5} M, la reducción de las concentraciones de nitrito, ácido sulfámico y NED a 1/5, 1/25 y 1/100 de los valores utilizados en espectrofotometría, y para los tres reactivos simultáneamente, no produjo una disminución en la señal de ELT. Por lo tanto, se seleccionaron las concentraciones que se dan en el procedimiento recomendado (que suponen reducciones de 1/20 a 1/80 de las concentraciones de los reactivos). Las curvas de calibrado fueron lineales al menos en el intervalo estudiado, 1×10^{-8} - $2,5 \times 10^{-7}$ M (7 puntos, $r^2 = 0,9997$). El límite de detección fue $4,8 \times 10^{-9}$ M ($1,5 \text{ ng ml}^{-1}$) ($n = 10$ blancos independientes). Este valor es 14 veces menor que el límite de detección obtenido con el espectrofotómetro de fila de diodos. La repetitividad, dada como desviación estándar relativa fue del 1,5% (para una disolución de 50 ng ml^{-1} , $n = 6$).

Para revelar un posible efecto matriz, se utilizó el método de adición estándar. Para ello, se tomó una serie de alícuotas de 2 ml de la disolución de la muestra, y se adicionaron distintos volúmenes de disolución estándar de clenbuterol, de forma que su concentración varió entre $3,5 \times 10^{-8}$ y $1,8 \times 10^{-7}$ M. Las pendientes de las curvas de adición estándar ($n = 6$, $r^2 = 0,9998$) y del calibrado normal fueron estadísticamente iguales (ver Figura IX.3), por lo que se descartó la presencia de efecto matriz.

El contenido de clenbuterol encontrado en Spiropent fue de $0,0193 \pm 0,0005$ mg/tableta (media del análisis de 3 tabletas distintas), por calibración normal, y de $0,0195 \pm 0,0004$ mg/tableta (media del análisis de 3 tabletas distintas), por el método de adición estándar.

Los resultados obtenidos demuestran que la ELT es una técnica adecuada para la evaluación del contenido en clenbuterol en preparados farmacéuticos, por debajo del nivel de una dosis, siendo útil en el control de calidad, incluido el estudio de la dispersión entre tableta y tableta.

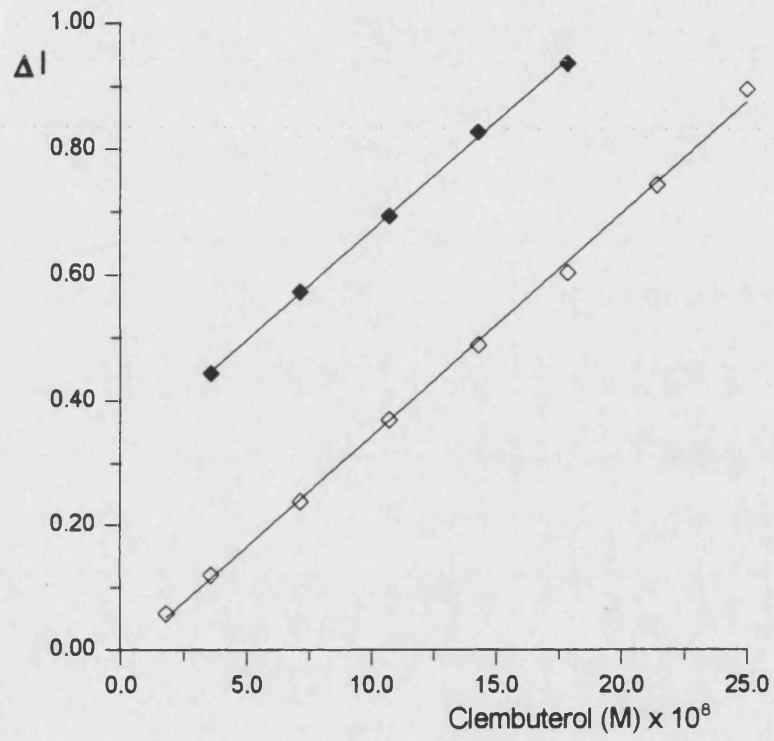


Figura IX.3.- Gráficos obtenidos en ELT mediante un calibrado normal (\diamond) y mediante adición estándar (\blacklozenge).

**X.- DETERMINACIÓN DE CLEMBUTEROL EN ORINA MEDIANTE
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA, DERIVATIZACIÓN
PRECOLUMNA Y CROMATOGRFÍA LÍQUIDA MICELAR**

X.- DETERMINACIÓN DE CLEMBUTEROL EN ORINA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA, DERIVATIZACIÓN PRECOLUMNA Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA MICELAR

X.1.- Introducción

La formación de derivados coloreados detectables en el visible se utiliza, en Análisis, con frecuencia, para aumentar tanto la sensibilidad como la selectividad, y para reducir el ruido de fondo cuando se cromatografían muestras complejas, tales como orina. La derivatización postcolumna por diazotación con nitrito y acoplamiento con N-(1-naftil)etilendiamina, para formar un azocolorante, ha sido aplicada a la determinación por HPLC de clenbuterol en preparados farmacéuticos [147]. La absorptividad molar del azocolorante formado a pH 1, a la longitud de onda del máximo, 506 nm, disminuye sólo al 97% a 514,5 nm, longitud de onda de emisión de una de las líneas del láser de Ar⁺, lo que permite la utilización de la ELT en la detección de clenbuterol con una sensibilidad excelente, y la disminución del límite de detección respecto al método espectrofotométrico.

Por otro lado, la inyección directa de muestras fisiológicas en cromatografía líquida en fase inversa puede llevarse a cabo utilizando fases móviles micelares, compatibles con las proteínas de la matriz [152], que contienen un tensioactivo aniónico o no iónico, por encima de su concentración micelar crítica. A esta técnica se le ha denominado cromatografía líquida micelar (CLM). La etapa de preparación de la muestra se simplifica de forma importante utilizando eluyentes micelares [153]. Para aumentar la eficacia, se utilizan pequeñas cantidades de modificadores orgánicos, frecuentemente alcoholes de cadena corta.

En CLM, los monómeros de tensioactivo que constituyen las micelas se hallan en equilibrio con la fase estacionaria, donde son adsorbidos, y con la fase móvil, donde existen como entidades individuales o se agrupan en micelas. La adsorción de los monómeros de tensioactivo sobre la superficie de una fase estacionaria alquímica sucede principalmente por interacciones hidrofóbicas, entre la zona hidrocarbonada de las moléculas de tensioactivo y la cola alquímica del silano enlazado a la matriz de sílice. De esta forma, la cabeza iónica del tensioactivo queda en contacto con la disolución polar, y la columna adquiere una cierta capacidad de intercambio iónico, que no se observa en cromatografía convencional en fase inversa. Para la mayoría de los tensioactivos y de las fases

estacionarias utilizadas, superado un determinado nivel de concentración, la cantidad de tensioactivo adsorbido sobre la fase estacionaria permanece constante.

Los tensioactivos no sólo modifican las propiedades de retención de la fase estacionaria, las micelas presentes en la fase móvil también interaccionan con los solutos a nivel tanto electrostático, como hidrofóbico. Esta variedad de interacciones proporciona una gran versatilidad a la técnica, y la hace virtualmente adaptable a cualquier tipo de solutos. Otra ventaja importante que aporta el uso de medios organizados micelares como fases móviles, es la solubilización en medio acuoso de sustancias apolares, reduciéndose en muchos casos el tiempo necesario para la preparación de las muestras, al evitarse etapas previas de eliminación de interferentes o de componentes de la matriz, que pudieran precipitar en el interior de la columna cromatográfica, como ocurre con las muestras fisiológicas. Es posible incluso la separación de mezclas de sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas con una misma fase móvil. También es interesante el ahorro en disolventes orgánicos que supone el uso de las disoluciones acuosas micelares. Además, éstas son inocuas y no inflamables. Desde el punto de vista de la detección, el uso de micelas también resulta beneficioso, ya que muchos compuestos experimentan en medios micelares un incremento en su absorptividad molar, acompañado de un desplazamiento batocrómico.

El uso de las fases móviles micelares también plantea algunos inconvenientes. Por un lado, la eficacia en CLM es, con frecuencia, más reducida que en cromatografía líquida convencional en fase inversa. Este inconveniente se evita, en parte, añadiendo un disolvente orgánico a la fase micelar. Por otro lado, la producción de espuma propia de las disoluciones micelares dificulta la desgasificación de las fases móviles y, en general, su manejo.

En este capítulo se describe el desarrollo de un procedimiento de extracción y derivatización precolumna, para la determinación de clenbuterol en muestras de orina humana. Se estudia la derivatización e inyección directa de muestras de orina humana aditivadas. Se muestra cómo los mejores resultados se obtienen extrayendo el clenbuterol de la matriz de orina con cartuchos de extracción en fase sólida, tipo C_{18} . El clenbuterol se preconcentra así en el eluato, donde se forma un azocolorante mediante diazotación con nitrito y acoplamiento con NED del ion diazonio generado. El azocolorante de clenbuterol-NED se separa, posteriormente, mediante HPLC con una columna C_{18} , utilizando como fase móvil una disolución micelar de docecilsulfato sódico.

X.2.- Parte experimental

a) Instrumentación y Reactivos

Se utilizaron el espectrómetro de lente térmica construido en nuestro departamento, y los cromatógrafos de Hewlett-Packard descritos en el capítulo III.

Se usaron los siguientes reactivos: clorhidrato de clenbuterol (Sigma, Barcelona), nitrito sódico, ácido sulfámico (Probus, Barcelona), diclorhidrato de N-(1-naftil)etilendiamina, dodecilsulfato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania), ácido cítrico, tetraborato sódico decahidrato, ácido clorhídrico, hidróxido sódico (Panreac, Barcelona) y tris-hidroxi-etil-aminometano (tris) (Merck). Los disolventes orgánicos (metanol, *n*-propanol, *n*-butanol, *n*-pentanol, acetona y acetonitrilo) fueron de Panreac de grado HPLC y analítico. También se empleó agua desionizada ultrapura.

Se utilizó una disolución madre de clenbuterol de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ conteniendo HCl 0,1 M y SDS 0,015 M, que se almacenó a 4°C, para utilizar en todas las experiencias. Las muestras de orina se filtraron a vacío con un filtro de vidrio sinterizado del nº 4. Los cartuchos de extracción en fase sólida utilizados (Bond Elut, Varian, Harbor City, CA, E.E.U.U.) contenían 100 mg de fase C₁₈ (fase hidrofóbica), ó 100 mg de fase SCX (intercambiador catiónico). La composición de la fase móvil utilizada finalmente para el desarrollo del método analítico, fue la siguiente: SDS 0,1 M, 12% de *n*-butanol y tampón cítrico/citrato 0,05 M de pH 3 (preparado a partir de ácido cítrico y NaOH).

b) Procedimiento de derivatización utilizado en la optimización cromatográfica

Para la optimización cromatográfica se modificó el procedimiento utilizado en el capítulo IX, desarrollado para determinar clenbuterol en preparados farmacéuticos. El procedimiento modificado es el siguiente:

En un matraz aforado de 25 ml, se introdujo una alícuota de disolución estándar de clenbuterol, o bien, 10 ml de orina aditivada con clenbuterol, 5 ml de la disolución de HCl 0,1

M/SDS 0,015 M, y 1 ml de nitrito sódico 0,2 M. Transcurridos 5 min, se eliminó el exceso de nitrito con 1 ml de ácido sulfámico 0,5 M y tras 10 min, se añadió 2 ml de NED 1×10^{-3} M, 2,5 ml de tampón citrato 2 M de pH 3 y agua hasta completar los 25 ml.

c) Procedimientos utilizados en la optimización de las condiciones de extracción

Para estudiar la retención del clenbuterol y las condiciones de elución, utilizando los cartuchos de extracción en fase sólida, se extrajeron alícuotas de 1 ml de disolución madre de clenbuterol. Cuando se utilizaron los cartuchos SCX, se añadió antes de la extracción 0,5 ml de tampón tris 0,1 M de pH 7. Una vez pasada la muestra, se lavó con tres alícuotas de tampón tris 0,01 M del mismo pH. La elución se efectuó con 2 ml de diversos eluyentes. El eluato se recogió en un matraz aforado de 10 ml, se aforó con agua, y se inyectaron alícuotas de esta disolución sin derivatizar, detectando a 278 nm.

En otras experiencias se derivatizaron los eluatos, se inyectaron alícuotas de la disolución del azocolorante y se detectó a 450 nm. Se modificó el procedimiento descrito más arriba con el fin de minimizar la dilución del eluato, utilizando las siguientes cantidades de los reactivos: 1 ml de HCl 1 M, 1 ml de SDS 0,25 M, 1 ml de nitrito sódico 0,2 M, 1 ml de ácido sulfámico 0,5 M, 2 ml de NED 1×10^{-3} M y tampón citrato 0,05 M de pH 3, hasta completar los 10 ml. Los tiempos de reacción fueron los indicados anteriormente. Se aplicó este mismo procedimiento a muestras de 10 ml de orina aditivadas con clenbuterol. Cuando se utilizaron los cartuchos SCX, se añadió 1 ml de tampón tris 0,1 M de pH 7 a las muestras. Se utilizó como referencia una disolución de clenbuterol estándar derivatizada, a la que no se aplicó el proceso de extracción.

d) Procedimiento recomendado para determinar clenbuterol en orina

A 50 ml de orina se añade NaOH 0,2 M gota a gota, hasta viraje de la fenolftaleína; en este punto se añaden 10 ml de NaOH 0,2 M en exceso. A continuación, la muestra de orina se pasa por un filtro de vidrio sinterizado del nº 4 y se extrae con un cartucho de 100 mg de C_{18} . El cartucho se lava con 2 ml de NaOH 0,02 M y la elución del clenbuterol se lleva a cabo con 2 ml de SDS 0,1

M conteniendo un 12% de *n*-butanol (v/v). El eluato se recoge sobre un vial seco y se adiciona 1 ml de HCl 1 M y 0,5 ml de nitrito sódico 0,2 M, y después de 5 min, 0,5 ml de ácido sulfámico 0,5 M. Después de 10 min, se añade 1 ml de NED 2×10^{-3} M y se inyecta en el cromatógrafo una alícuota de 20 μ l. La separación se realiza en una columna C_{18} , con una fase móvil de SDS 0,1 M/12% de *n*-butanol, y tampón citrato 0,05 M de pH 3. El caudal de la fase móvil se fija a 1 ml min^{-1} , y la detección se realiza a 450 nm. Para la detección por ELT, las concentraciones de los reactivos se reducen a 0,01 M de nitrito, 0,025 M de ácido sulfámico y $1,25 \times 10^{-5}$ M de NED. Se inyectan alícuotas de 100 μ l y el caudal se reduce a 0,2 ml min^{-1} , tras 7 min de efectuada la inyección, antes del comienzo del pico del clenbuterol.

X.3.- Resultados y discusión

a) Espectros de absorción y optimización de las condiciones cromatográficas

En la Tabla X.1 se muestran las longitudes de onda de máxima absorción y las absortividades molares del clenbuterol no derivatizado y del azocolorante de clenbuterol. Los datos a pH 3 se obtuvieron en el mismo medio recomendado, más adelante en este capítulo, como fase móvil (SDS 0,1 M/12% de *n*-butanol/tampón citrato 0,05 M de pH 3).

Tabla X.1.- Longitudes de onda de máxima absorción y absortividades molares para el clenbuterol y el azocolorante de clenbuterol-NED.

	pH	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}$)	$\epsilon_{514,5} / \epsilon_{\text{max}}$
Sin derivatizar	3	246	$9,2 \times 10^3$	-
Sin derivatizar	3	298	$2,9 \times 10^3$	-
Azocolorante	3	450	$2,08 \times 10^4$	0,47 ^b
Azocolorante	1 ^a	506	$3,14 \times 10^4$	0,97 ^b

^a En HCl 0,1 M; los otros datos se obtuvieron en medio SDS 0,1 M/12% de *n*-butanol/tampón citrato 0,05 M de pH 3.

^b Sensibilidad relativa a 514,5 nm respecto a la obtenida a la longitud de onda del máximo.

La derivatización aumentó de forma importante la sensibilidad en la detección del clenbuterol, especialmente cuando las medidas se realizaron a valores de pH muy bajos. Sin embargo, en cromatografía en fase inversa con una columna C_{18} , no pueden utilizarse medios fuertemente ácidos, por lo que la elución del azocolorante del clenbuterol se optimizó empleando fases móviles micelares tamponadas a pH 3.

La retención del azocolorante de clenbuterol con un eluyente puramente micelar fue excesiva ($k' > 60$), por lo que fue necesario añadir a la fase móvil un modificador orgánico que redujera su tiempo de retención. Se ensayaron diversos modificadores orgánicos: *n*-propanol, *n*-butanol, *n*-pentanol, y mezclas de *n*-butanol con acetona y acetonitrilo, con el fin de examinar el cambio que producen en la fuerza eluyente de la fase móvil y en la eficacia de los picos cromatográficos. Como se muestra en la Tabla X.2, tanto la fuerza eluyente como la eficacia aumentaron cuando se incrementó la concentración de alcohol en la fase móvil. Sin embargo, para conseguir factores de capacidad adecuados (suficientemente bajos), fue necesario añadir una concentración elevada de estos modificadores. Por su parte, la acetona y el acetonitrilo aumentaron la eficacia, pero no modificaron apenas la fuerza eluyente. La fuerza eluyente aumentó con la concentración de SDS, pero la eficacia disminuyó, particularmente para SDS 0,15 M.

En todos los casos, el factor de asimetría osciló entre 1,0 y 1,2, es decir, los picos cromatográficos obtenidos fueron apreciablemente simétricos. Se seleccionó una fase móvil conteniendo SDS 0,1 M y 12% de *n*-butanol. Con esta fase, los picos del clenbuterol sin derivatizar y derivatizado aparecieron a 7,3 min y 8,5 min, respectivamente. La retención fue similar con una fase móvil de pH 7, pero la eficacia fue superior a pH 3. No se observaron picos correspondientes a los reactivos de derivatización, al menos durante los primeros 30 min del cromatograma.

Tabla X.2.- Factor de capacidad y eficacia para el azocolorante de clembuterol en diversas fases móviles a pH 3.

SDS , M	Modificador , v/v	k' ^a	N ^b
0,05 M	8% <i>n</i> -butanol	43,8	500
	8% <i>n</i> -butanol 4% acetona	39,9	1150
	8% <i>n</i> -butanol 8% acetona	43,2	2100
	12% <i>n</i> -butanol 8% acetona	13,3	2750
	8% <i>n</i> -butanol	16,8	1050
0,10 M	8% <i>n</i> -butanol 4% acetonitrilo	19,6	850
	8% <i>n</i> -butanol 8% acetonitrilo	19,6	1600
	8% <i>n</i> -butanol 8% acetona	14,3	2050
	12% <i>n</i> -butanol	8,0	1450
	12% <i>n</i> -butanol 4% acetona	7,9	1900
	8% <i>n</i> -butanol	16,0	300
0,15 M	8% <i>n</i> -butanol 4% acetona	12,4	800
	8% <i>n</i> -butanol 8% acetona	11,5	1350
	12% <i>n</i> -propanol	21,8	200
	12% <i>n</i> -propanol 8% acetonitrilo	22,5	1300
	12% <i>n</i> -propanol 8% acetona	17,2	1350

^a k' = factor de capacidad; ^b N = eficacia.

b) Inyección directa de las muestras

Se inyectaron, en primer lugar, disoluciones estándar y muestras de orina aditivadas, preparadas en la disolución empleada como fase móvil, conteniendo ambas $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol no derivatizado. En los cromatogramas de las muestras de orina, el pico del clenbuterol apareció al mismo tiempo de retención y con la misma área que en los cromatogramas de las disoluciones estándar. Sin embargo, en los cromatogramas de orina aparecieron otros picos de compuestos endógenos, distribuidos a lo largo del cromatograma. El pico del clenbuterol apareció seriamente solapado.

En segundo lugar, se obtuvieron los cromatogramas de las disoluciones estándar de clenbuterol y de las muestras de orina, a las que se aplicó el procedimiento de derivatización. Tras la derivatización, las muestras de orina presentaron un intenso color rojo. Como se muestra en la Figura X.1, los cromatogramas obtenidos por inyección directa de las disoluciones de orina derivatizadas (sin separación previa de la matriz) y detección a 450 nm, son muy complejos y el pico del clenbuterol a 8,5 min también se solapa parcialmente con el pico de un compuesto endógeno. Por otro lado, el pico del clenbuterol presentó un área de tan sólo el 17,5% del valor esperado (tomando como referencia las disoluciones estándar derivatizadas). Este efecto fue atribuido a una disminución en el rendimiento de la derivatización producido por la interacción del clenbuterol con la matriz de orina, y por el consumo de reactivos por parte de compuestos endógenos.

Se intentó identificar los compuestos endógenos que aparecen en el cromatograma de la matriz orina sometida a derivatización. Para ello, se aplicó el procedimiento de derivatización a disoluciones estándar de triptófano, serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético, compuestos que se encuentran presentes en la orina y que pueden dar lugar a arilaminas diazotables, por hidrólisis del anillo indol. Las disoluciones inyectadas contenían $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ del indol. Los cromatogramas obtenidos mostraron picos a 5,0 min y 7,9 min, para los derivados del ácido 5-hidroxiindolacético y serotonina, respectivamente. En el cromatograma del triptófano aparecieron dos picos poco intensos a 10,9 min y 14,7 min. Se prepararon también muestras de orina aditivadas con estos compuestos, que se inyectaron tras la derivatización. Se observaron picos a los mismos tiempos de retención que con las disoluciones estándar, pero ninguno coincidió con los picos de los compuestos endógenos observados en el cromatograma de la orina derivatizada.

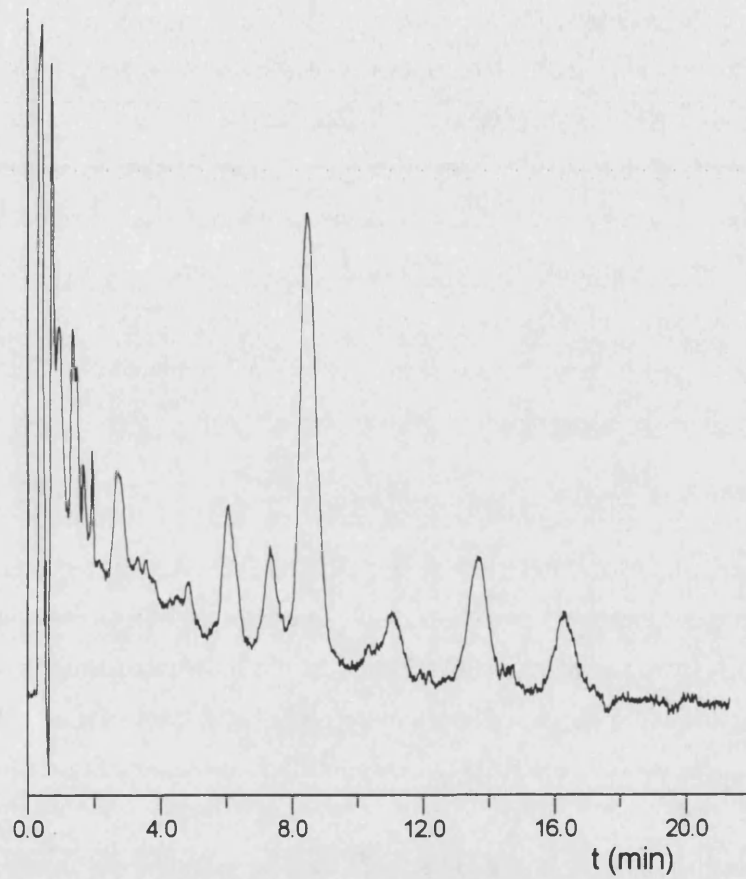


Figura X.1.- Cromatograma de una muestra de orina aditivada con $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol. La muestra se derivatizó e inyectó directamente en el cromatógrafo. El pico que se destaca a 8,5 min corresponde al azocolorante del clenbuterol.

A continuación, se estudió la posibilidad de aumentar el tamaño del pico del clenbuterol, sin incrementar el de los picos de los compuestos endógenos de la orina, modificando las condiciones de la derivatización. Para compensar el posible consumo de los reactivos por los componentes de la orina, se aumentó la concentración de nitrito y de NED, respecto a los valores utilizados anteriormente, ensayándose diversas concentraciones: desde 8×10^{-3} M y 8×10^{-5} M hasta 8×10^{-2} M y 2×10^{-3} M, para nitrito y NED, respectivamente (concentraciones en las disoluciones inyectadas). Cuando se incrementó la concentración de nitrito, no se observó ningún aumento en el pico del clenbuterol. En todos los casos, el nitrito se encontraba en gran exceso respecto a las sustancias reaccionantes de la orina, como lo demostró la aparición de burbujas de nitrógeno al añadir ácido sulfámico. Por el contrario, el aumento de la concentración de NED produjo un aumento de la intensidad de todos los picos. Desafortunadamente, el pico del clenbuterol se incrementó en menor medida que los picos de los componentes endógenos de la orina.

También se optimizó la concentración de ácido utilizada en la reacción de diazotación, en presencia de la matriz de orina. No se utilizó la mezcla de HCl/SDS, sino que se adicionó 2 ml de SDS 0,25 M, y entre 0,25 ml y 1,5 ml de HCl 1 M. El exceso de HCl fue neutralizado con NaOH, antes de la reacción de acoplamiento con el NED. Como se muestra en la Figura X.2, un aumento en la concentración de HCl durante la diazotación produjo un aumento del área de los picos de los compuestos endógenos, pero el área del pico del clenbuterol no se modificó de forma significativa.

Para mejorar el rendimiento de la reacción de derivatización del clenbuterol, también se estudiaron otras variables. Así, se llevó a cabo la reacción de diazotación de las muestras de orina en un baño de hielo, con mayores tiempos de reacción, y en presencia de KBr 5×10^{-3} M, que exalta la actividad diazotante del ácido nitroso. En ninguna de estas experiencias se obtuvo un aumento significativo del pico del clenbuterol. Debido tanto al solapamiento con picos de compuestos endógenos, como al bajo rendimiento en la derivatización, factores que aumentan de forma importante el límite de detección, no se continuó investigando la derivatización e inyección directa de muestras de orina.

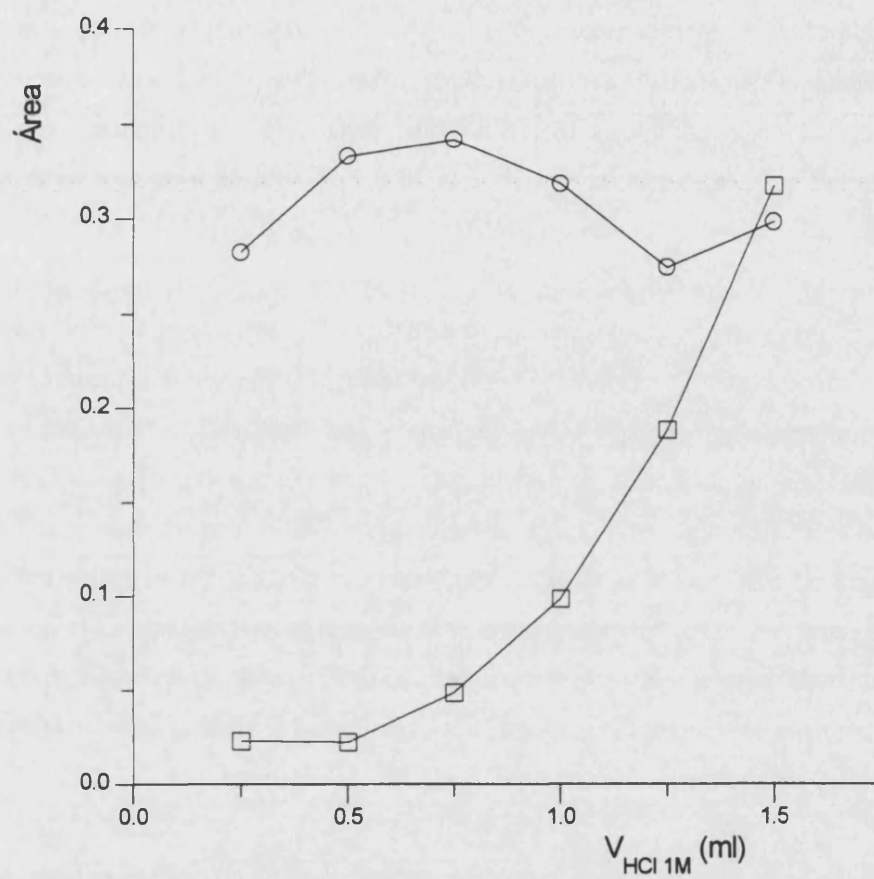


Figura X.2.- Area de los picos en función de la cantidad de HCl 1 M utilizada en la diazotización para: a) el azocolorante de clenbuterol (○), y b) para el derivado del compuesto endógeno de la orina a 13,5 min (□).

c) Inyección de muestras extraídas

Se intentó aislar el clenbuterol mediante extracción en fase sólida con cartuchos C_{18} y de intercambio catiónico SCX, previamente a la etapa de derivatización. Se realizó el estudio con disoluciones estándar de clenbuterol, y con muestras de orina aditivadas, ambas conteniendo $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ del fármaco. Los eluyentes estudiados fueron acetona, metanol y una disolución con la misma composición que la fase móvil utilizada en HPLC (SDS 0,1 M/12% de *n*-butanol y tampón citrato 0,05 M de pH 3).

En primer lugar, se estudió el rendimiento de extracción mediante la inyección de alícuotas de los eluatos sin derivatizar (detección a 278 nm). Se descartó la elución con acetona, ya que ésta producía un pico intenso al comienzo del cromatograma, y una modificación de la línea base, que se atribuyó a la desorción de SDS de la fase estacionaria. Tanto con los cartuchos C_{18} como con los SCX, los rendimientos de la extracción de las disoluciones estándar fueron cercanos al 100%, pero disminuyeron para las muestras de orina aditivadas, especialmente cuando se utilizó metanol como eluyente con los cartuchos SCX. Además, como se muestra en el cromatograma de la Figura X.3, tras la extracción no se eliminaron todos los compuestos endógenos de la orina, apareciendo de nuevo picos que solaparon con el pico del clenbuterol. Las experiencias siguientes se realizaron utilizando como eluyente de extracción la disolución de SDS 0,1 M/12% de *n*-butanol.

A continuación, se realizó la extracción del clenbuterol con 2 ml de SDS-butanol, y se aplicó el procedimiento de derivatización en un matraz aforado de 10 ml. Las recuperaciones obtenidas fueron de nuevo inferiores con las muestras de orina aditivadas que con las disoluciones estándar de clenbuterol. Sin embargo, el cromatograma obtenido con orina poseía una línea base exenta de picos de compuestos endógenos (Figura X.4).

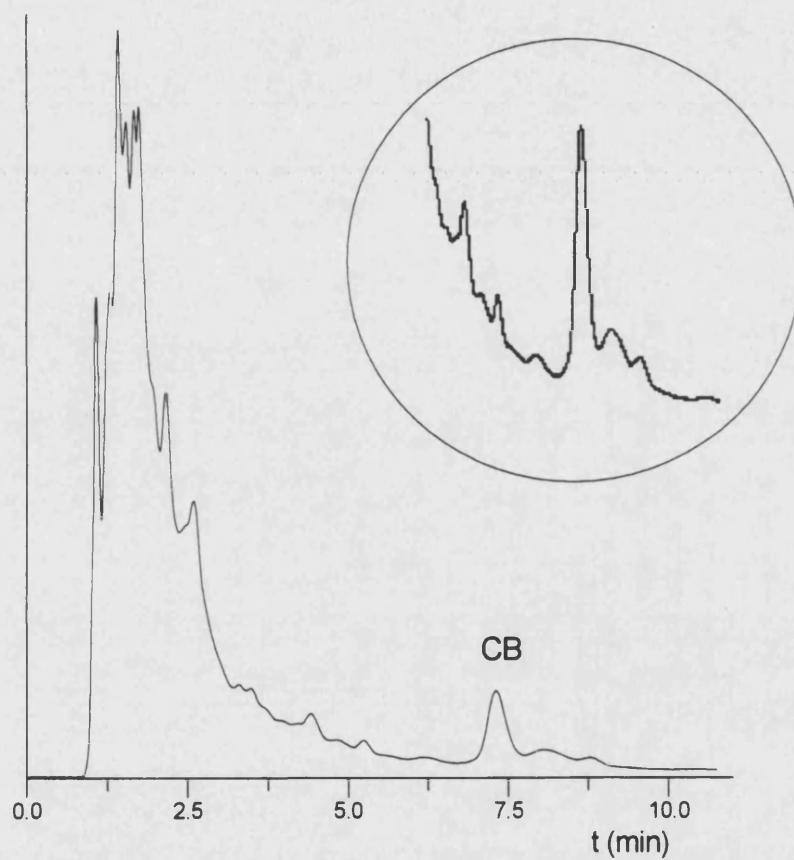


Figura X.3.- Cromatograma de una muestra de orina aditivada con $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol sin derivatizar. El clenbuterol se extrajo utilizando un cartucho C_{18} . La ampliación corresponde a la región de 3,5-10 min.

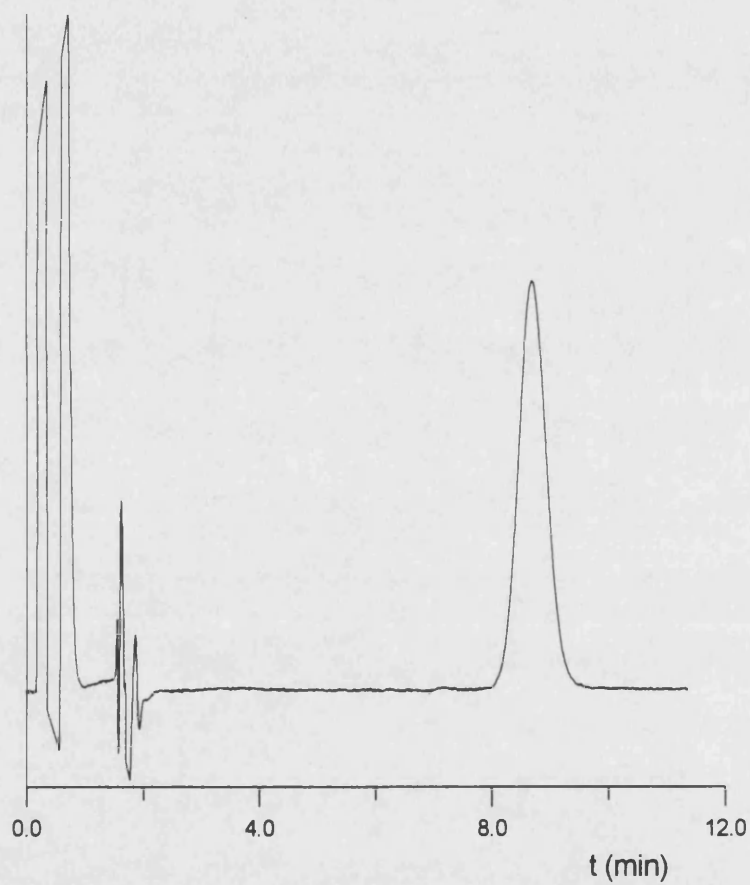


Figura X.4.- Cromatograma de una muestra de orina aditivada con $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol. El clenbuterol se extrajo utilizando un cartucho C_{18} y el eluato se derivatizó antes de su inyección en el cromatógrafo.

Se realizaron calibrados de clenbuterol derivatizado, a partir de dos series de cinco disoluciones estándar cada una, conteniendo entre 2,5 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ del compuesto, que se extrajeron con los cartuchos C_{18} y SCX, y fueron inyectadas en el cromatógrafo. También se prepararon otras dos series de muestras de orina aditivadas con las mismas concentraciones de clenbuterol. En todos los casos, las curvas de calibrado fueron lineales ($r > 0,999$), pero las pendientes de las rectas de calibrado para los extractos de las muestras de orina aditivadas fueron menores que las pendientes proporcionadas por las disoluciones estándar (57% y 47%, para los cartuchos C_{18} y SCX, respectivamente). Debe tenerse en cuenta que durante la reacción de derivatización, el analito está ya separado de la mayoría de los componentes de la matriz, por lo tanto, este bajo rendimiento debe atribuirse tan sólo a la etapa de extracción.

Se decidió variar el pH de la muestra de orina sometida a extracción. Para ello, se prepararon las muestras en presencia de un 10% de cada una de las siguientes disoluciones: HCl 0,3 M (pH 2), citrato 0,2 M (pH 3), tris 0,1 M (pH 7), tetraborato 0,2 M (pH 10) ó NaOH 0,2 M. Antes de la elución, los cartuchos se lavaron con 1 ml de los mismos tampones, pero diluidos a la décima parte. La elución se realizó como en las experiencias anteriores, con la disolución de SDS 0,1 M/12% de *n*-butanol. Al realizar la extracción con los cartuchos C_{18} , se comprobó que las muestras alcalinas daban recuperaciones por encima del 95%. Este aumento en la recuperación podría ser debido a que en medio ácido o neutro existe una asociación del clenbuterol con un componente de la orina (tal vez una proteína); la asociación de este componente con el clenbuterol podría verse inhibida en medio básico.

En otro estudio, se contempló la posibilidad de alcanzar factores de preconcentración elevados, manteniendo un alto porcentaje de recuperación con ambos cartuchos C_{18} y SCX. El volumen utilizado de la orina aditivada se varió entre 10 y 50 ml. En todos los casos, se añadió 1 ml de una disolución de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol; con ello, la cantidad de clenbuterol se mantuvo constante (100 μg), pero su concentración en las muestras disminuyó. Del mismo modo que en la serie anterior, las muestras se tamponaron a diversos valores de pH, antes de realizar la extracción. Los resultados se muestran en las Figuras X.5 y X.6. Con los cartuchos SCX, la recuperación disminuyó rápidamente cuando se incrementó el volumen de muestra y disminuyó la concentración (Figura X.5). Con los cartuchos C_{18} y las muestras alcalinas, la recuperación fue superior al 90%, en todos los casos (Figura X.6).

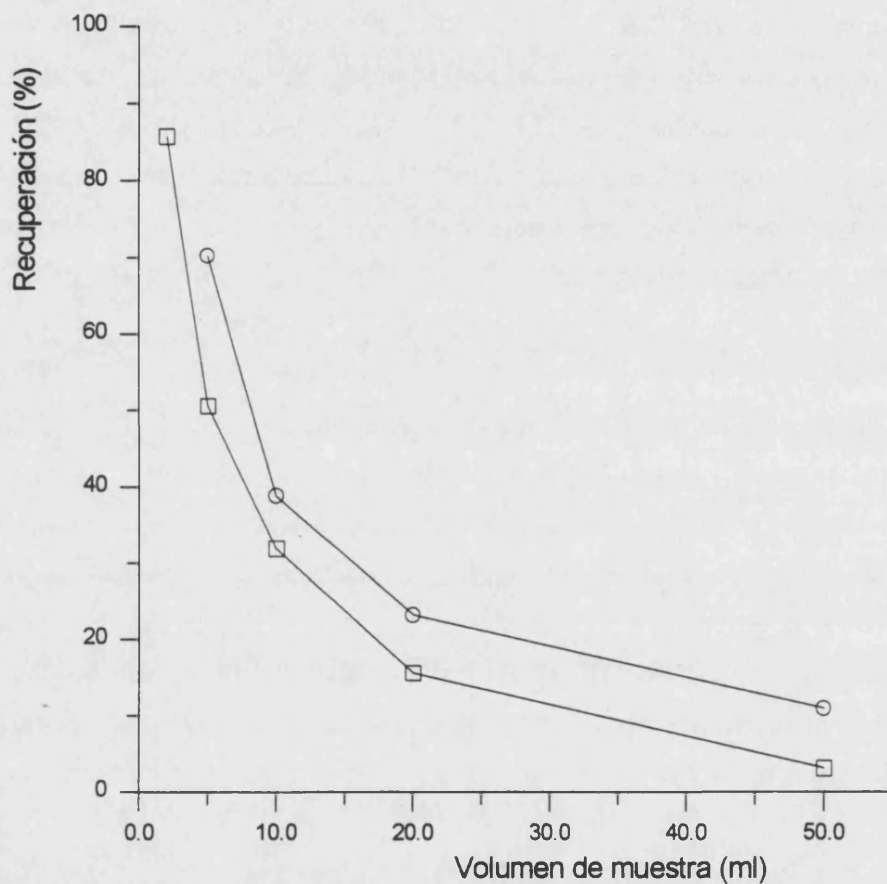


Figura X.5.- Recuperación de clenbuterol utilizando cartuchos SCX, para cantidades crecientes de orina. Todas las muestras contenían 100 µg de clenbuterol y el pH se ajustó a 2 (□) y 7 (○), antes de la extracción.

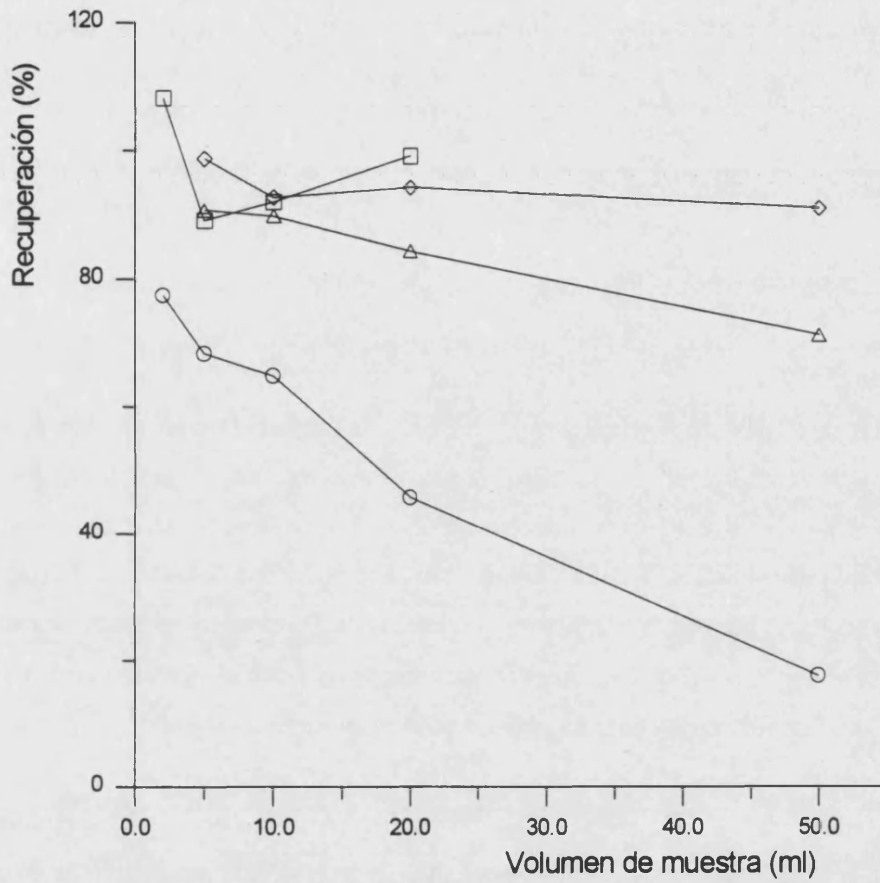


Figura X.6.- Recuperación de clenbuterol utilizando cartuchos C_{18} , para cantidades crecientes de orina. Todas las muestras contenían $100 \mu\text{g}$ de clenbuterol y fueron tamponadas a pH 3 con citrato $0,2 \text{ M}$ (○) y a pH 10 con borato $0,2 \text{ M}$ (□), antes de la extracción. Las otras curvas se obtuvieron siguiendo el procedimiento recomendado en el apartado X.2.d con 10 ml (Δ) y 20 ml (◇) de $\text{NaOH } 0,2 \text{ M}$.

Por último, se estudió la relación entre el tamaño de los picos cromatográficos y la concentración del clenbuterol, en las condiciones óptimas, utilizando muestras de orina aditivadas, que contenían entre 2 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol. Las curvas de calibrado fueron lineales ($r > 0,999$), y la recuperación fue superior al 92% (tomando como referencia el calibrado de los estándares no extraídos).

d) Adaptación del procedimiento a la ELT

Para optimizar las condiciones de separación y detección en ELT, se hizo uso de una disolución estándar de clenbuterol de 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$. En ELT, la velocidad de adquisición de datos fue lenta, de sólo un punto cada 2 s, por lo que para obtener valores exactos de las áreas de los picos se midieron éstos durante al menos 40 s. Esto se consiguió por dos medios: por un lado, se aumentó la cantidad de muestra inyectada de 20 a 100 μl y, por otro, se programó la bomba del cromatógrafo para reducir el caudal de 1 ml min^{-1} a 0,2 ml min^{-1} , justo antes del comienzo del pico. De esta forma, el tiempo de elución del pico del clenbuterol fue 25 veces mayor que el obtenido con la detección espectrofotométrica, pero el tiempo total de análisis no aumentó excesivamente.

Como se muestra en la Figura X.7, cuando se incrementó en cinco veces el volumen de muestra, se produjo un aumento similar en la sensibilidad. Por otro lado, una reducción en el caudal en cinco veces originó un aumento de la sensibilidad en ocho veces. Este último incremento de la sensibilidad, obtenido para un flujo de 0,2 ml min^{-1} , es superior al aumento de cinco veces que cabría esperar. Ello podría deberse al mayor tiempo de residencia y formación de las lentes térmicas en la región de observación, y a la menor velocidad de transferencia de calor desde las lentes térmicas al entorno. En la Figura X.8 se muestra el cromatograma de una muestra de orina aditivada, obtenido con detección mediante ELT.

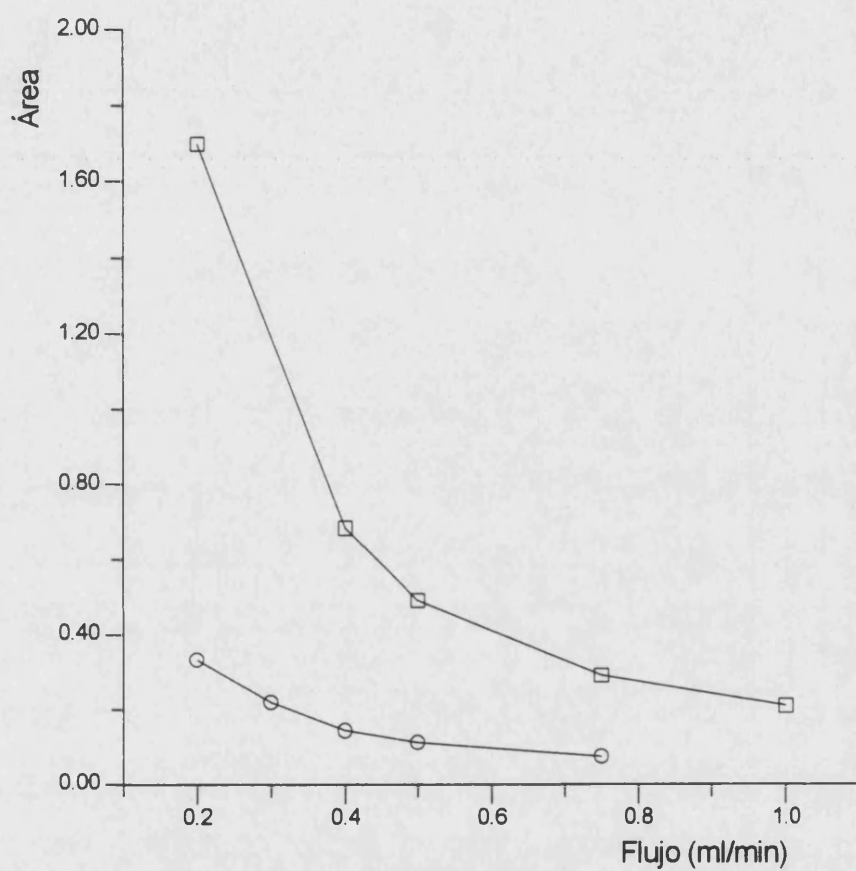


Figura X.7.- Modificación del área del pico del azocolorante del clenbuterol en concentración de $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$, con detección por ELT. El volumen de inyección fue de $20 \mu\text{l}$ (○) y $100 \mu\text{l}$ (□), el caudal se mantuvo a 1 ml min^{-1} hasta los 7,5 min y después se redujo linealmente hasta el valor que aparece en el eje-X, manteniéndose constante a partir de los 8,0 min.

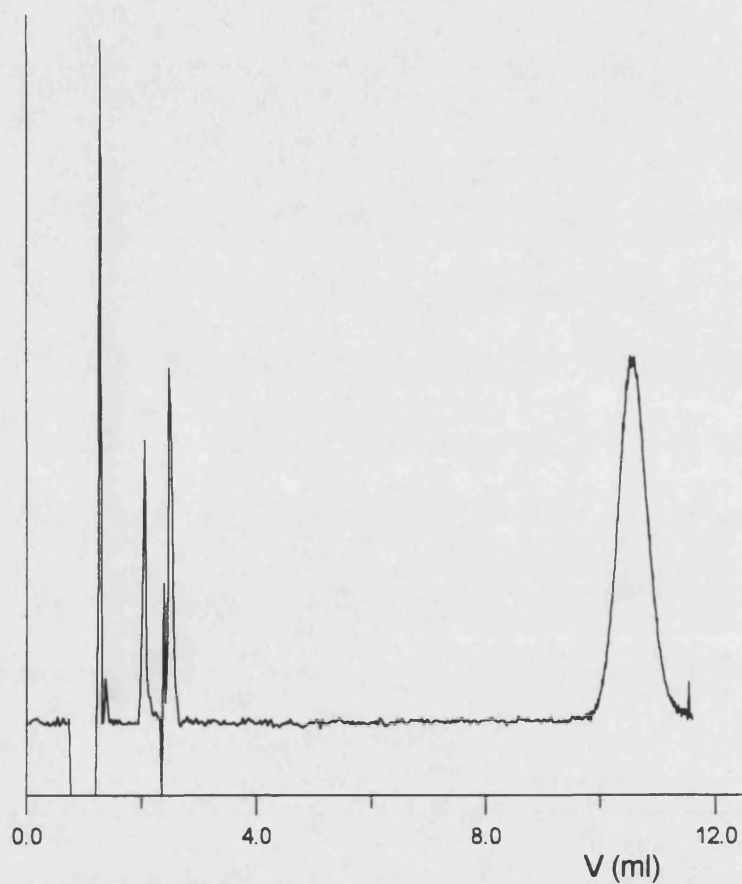


Figura X.8.- Cromatograma de una muestra de orina que contenía $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol, con detección por ELT. El clenbuterol se extrajo utilizando un cartucho C_{18} y el eluato se derivatizó antes de su inyección.

Para estudiar la influencia de la concentración del clenbuterol, se introdujeron en matraces aforados de 10 ml, diversos volúmenes de una disolución estándar que contenía $0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol, realizando la derivatización, según el procedimiento recomendado para ELT. La concentración de clenbuterol en las disoluciones inyectadas se encontró en el intervalo de 20-330 ng ml^{-1} . La recta de calibrado fue lineal ($r = 0,9995$). Además, se obtuvo una curva de calibrado en el mismo intervalo de concentraciones, con muestras de orina de 10 ml, que se alcalinizaron con 2 ml de NaOH 0,2 M, y se aditivaron con volúmenes crecientes de disolución de clenbuterol de $0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$; finalmente, se inyectaron tres alícuotas de cada una de las muestras. La curva de calibrado también fue lineal en el intervalo estudiado ($r = 0,998$), y la pendiente correspondió a una recuperación del 64%. La menor recuperación se debe probablemente a una disminución en el rendimiento de la extracción a las bajas concentraciones analizadas en ELT.

e) Repetitividad y límites de detección

La repetitividad obtenida a partir de dos series de cinco muestras de orina aditivadas, que contenían 5 y $0,16 \mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol, aplicando el procedimiento recomendado que hace uso de extracción con cartuchos C_{18} , fue del 3,1 y 5,6%, para la detección espectrofotométrica y de ELT, respectivamente. Para cada técnica, el límite de detección fue calculado como la concentración que proporciona un área equivalente a tres veces la desviación estándar (criterio 3s), de una serie de diez disoluciones preparadas independientemente, de concentración no mucho mayor que el límite de detección. Para seleccionar la concentración adecuada para obtener el LD en espectrofotometría, se utilizaron varias muestras que contenían entre 0,05 y $2 \mu\text{g ml}^{-1}$. La inyección por triplicado de diez muestras de orina, con una concentración de clenbuterol de $0,12 \mu\text{g ml}^{-1}$, proporcionó un límite de detección de 51 ng ml^{-1} ($1,6 \times 10^{-7} \text{ M}$). De forma similar, para obtener el LD mediante ELT, se inyectaron por triplicado diez muestras que contenían 16 ng ml^{-1} de clenbuterol, obteniéndose un valor de $6,7 \text{ ng ml}^{-1}$ ($2,1 \times 10^{-8} \text{ M}$). Con muestras de 50 ml, el factor de preconcentración mayor originaría un LD de $1,3 \text{ ng ml}^{-1}$ ($4 \times 10^{-9} \text{ M}$).

XI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES

XI.- RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES

XI.1.- Efecto de la naturaleza del disolvente sobre los límites de detección en Espectrometría de Lente Térmica

En Espectrometría de Lente Térmica (ELT), se alcanzan las sensibilidades más altas en disolventes que presentan buenas propiedades termoópticas, es decir, con valores elevados de la relación $|dn/dT|/\kappa$, donde dn/dT es el coeficiente de temperatura del índice de refracción y κ es la conductividad térmica del medio. Sin embargo, en un procedimiento analítico, el límite de detección depende no tan sólo de la sensibilidad, sino también de la relación señal-ruido. Se realizó un estudio de la relación entre el ruido de fondo y la señal de ELT, para diversos disolventes, así como de la influencia de diferentes factores sobre los límites de detección. Para ello, los valores de la señal obtenidos en ausencia de especies absorbentes distintas del disolvente, $S_0 \pm \sigma_0$, se compararon con los datos obtenidos para los mismos disolventes, en presencia de concentraciones crecientes de diversos colorantes orgánicos e inorgánicos, $S \pm \sigma$. Se representaron los valores de σ frente a los correspondientes valores de $(S - S_0)$, a concentraciones crecientes del compuesto absorbente, observándose que el ruido aumenta linealmente con la señal de ELT. La ordenada en el origen de las rectas, σ_0^* , es el valor más fiable del ruido asociado a S_0 ; σ_0^* y la pendiente de dichas rectas, k , dependen de la naturaleza del disolvente y son independientes de la naturaleza de las especies absorbentes. Los resultados muestran que el aumento del ruido cuando la señal se incrementa se debe, principalmente, a la convección. Al aumentar la señal, la relación señal/ruido se aproxima asintóticamente a $1/k$.

Ambos parámetros, σ_0^* y k , son útiles para caracterizar los disolventes en términos de ruido convectivo. Cuando se determina una especie química utilizando uno o varios reactivos, al aumentar la absorbancia del blanco, A_{bl} , se incrementan también los límites de detección, con una pendiente proporcional a k y a la inversa de la absorptividad molar del analito; dicho incremento no depende de las propiedades termoópticas del medio. En ausencia de cualquier especie absorbente en la disolución del blanco, con excepción del mismo disolvente, que absorbe débilmente, los límites de detección en los disolventes siguen el orden de los valores de $|dn/dT|/\kappa$, es decir:

tetracloruro de carbono < cloroformo < metanol < agua

Por el contrario, a valores altos de A_{b1} , el límite de detección depende principalmente de k , más que de $|dn/dT|/\kappa$, con lo que un disolvente con un valor de k bajo puede ser mejor que otros disolventes con mejores propiedades termoópticas, pero con valores mayores de k .

En la bibliografía, el agua no se considera como un buen disolvente en ELT, debido al bajo valor de su cociente $|dn/dT|/\kappa$, que da lugar a una baja sensibilidad, por lo que se ha recomendado el uso de mezclas agua-etanol y agua-acetona. Sin embargo, el agua presenta unos valores muy bajos de S_0 y σ_0^* , lo que compensa parcialmente sus malas propiedades termoópticas. El agua ofrece, además, un valor bajo del parámetro k , lo que reduce las diferencias entre el agua y otros disolventes de mejores propiedades termoópticas, para valores elevados de A_{b1} . En ocasiones, en un procedimiento analítico, la composición del disolvente no puede ser alterada, pero en muchos otros casos, puede añadirse a las disoluciones acuosas un alcohol miscible o acetona, para aumentar la sensibilidad, o los analitos pueden ser extraídos en diversos disolventes orgánicos. Diferentes mezclas de disolventes poseen la misma fuerza eluyente y son prácticamente equivalentes en cromatografía líquida. Es así posible, teniendo en cuenta las consideraciones comentadas en este estudio, seleccionar la mezcla que proporcione los mejores límites para la detección en ELT.

XI.2.- Las oscilaciones de la lente térmica y su relación con el ruido de fondo

Se estudió la dependencia entre la concentración de la especie absorbente y diversos parámetros físicos e instrumentales, cuando se bombea una disolución de forma continua, y se observan las oscilaciones de la lente térmica, producidas por la acción conjunta de las fuerzas de Arquímedes y del efecto Marangoni. En la mayoría de las experiencias, la potencia del láser de bombeo se mantuvo fija y se hizo un barrido de distancias entre el haz y la superficie libre del líquido. Una vez que se producían las oscilaciones, se medía la frecuencia y la amplitud de las mismas con un analizador de espectros de transformadas rápidas de Fourier. Sólo al utilizar disoluciones preparadas en aceite de silicona, el fenómeno de las oscilaciones se presentó de forma clara y reproducible, por lo que se decidió realizar el estudio completo de la influencia de la concentración sobre los diferentes parámetros de interés, utilizando disoluciones de distinta concentración de PAN en este disolvente. Las oscilaciones se vieron favorecidas a potencias altas.

Un aumento de la concentración de colorante tiene el mismo efecto sobre las oscilaciones que un aumento de la potencia del láser, ya que de las dos maneras se incrementa la absorción de radiación por parte de la disolución. La frecuencia de las oscilaciones aumenta de forma aproximadamente lineal, al incrementarse la concentración del colorante, siendo mayor la sensibilidad cuando el haz de bombeo se propaga muy cerca de la superficie libre de la disolución. En general, la amplitud del pico fundamental disminuye al aumentar la distancia a la superficie y al aumentar la concentración. Para la amplitud, el comportamiento es menos regular que para la frecuencia. El aumento de potencia desde 50 mW a 200 mW produce un aumento de la frecuencia y de la amplitud del pico fundamental, para la mayoría de las distancias consideradas. Al aumentar la potencia, también se incrementa el intervalo de distancias en el que se producen las oscilaciones.

Al relacionar con la concentración la distancia a la que las oscilaciones tienen una frecuencia dada, la sensibilidad es algo mayor que cuando se relaciona directamente la frecuencia de las oscilaciones con la concentración. Dada la gran precisión con que puede medirse la distancia y fijarse la frecuencia, aprovechando esta relación sería posible medir pequeñas diferencias de concentración. Sin embargo, los disolventes necesarios para que se produzcan las oscilaciones son poco habituales, y las oscilaciones desaparecen a concentraciones bajas, por lo que el límite de detección de cualquier procedimiento analítico, basado en la medida de la frecuencia de las oscilaciones, resultaría demasiado alto y, por tanto, no tendría interés.

Se ha establecido la causa del ruido de baja frecuencia de la señal de lente térmica en condiciones de flujo modulado: la oscilación mecánica del líquido caliente y de la corriente convectiva asociada de la lente térmica, a su frecuencia natural, aparece superpuesta a la oscilación térmica, que tiene lugar a la frecuencia impuesta externamente. Se trata de un oscilador poco amortiguado, por lo que los efectos transitorios de la oscilación mecánica permanecen observables por un tiempo considerablemente largo, y reaparecen como consecuencia de pequeñas modificaciones de las condiciones experimentales. El bombeo a frecuencias iguales a la frecuencia natural de oscilación de la lente, o a frecuencias armónicas de la misma, produce una mayor relación señal/ruido, lo que es debido a la drástica reducción del ruido de baja frecuencia, que se produce cuando la oscilación mecánica entra en resonancia con la oscilación térmica a la frecuencia impuesta.

XI.3.- Saturación óptica, difusión y convección en Espectrometría de Lente Térmica

La relación entre la señal de lente térmica y las variables experimentales (potencia del haz de bombeo, longitud de onda del láser de prueba, propiedades termoópticas del disolvente y absorbancia) varía con la naturaleza del soluto. Este hecho se ha explicado mediante la posibilidad de que se alcance la saturación óptica en un grado significativo. En las técnicas absorciométricas, la sensibilidad es proporcional a la población del estado fundamental y, por lo tanto, cerca de la saturación óptica la sensibilidad debe ser menor. Para alcanzar las condiciones de saturación óptica, se requieren intensidades de radiación elevadas y, por lo tanto, la espectrofotometría, que se basa en la medida de la diferencia entre dos intensidades de radiación, no puede utilizarse en dichas condiciones. En cambio, la espectroscopía fototérmica, incluyendo la ELT y la espectroscopía fotoacústica, ofrece la posibilidad de demostrar que puede alcanzarse la saturación óptica en una técnica absorciométrica.

Se desarrolló un modelo teórico que describe los efectos de la saturación óptica, y que incluye también los efectos de la difusión y la convección en ELT. Para que la energía absorbida se pierda mediante difusión y convección, el estado excitado intermedio debe hallarse significativamente poblado. La pérdida de sensibilidad en ELT puede a la vez explicarse tanto por la pérdida de energía debida a la difusión y convección, como por el despoblamiento del estado fundamental. La relación entre los diversos factores implicados puede describirse mediante la expresión:

$$B = \frac{k_q}{\frac{1,226 \times 10^{-5} \lambda_{\text{bombeo}} \epsilon P + 4(k_D + k_C)}{\omega_{\text{bombeo}}^2} + k_q} \quad (\text{XI.1})$$

donde B es un coeficiente que multiplica a la función utilizada tradicionalmente, θ , y donde k_q es la constante de velocidad del proceso de relajación de la energía absorbida electrónicamente hasta energía térmica, ϵ la absorptividad molar, λ_{bombeo} la longitud de onda del haz de bombeo, P su potencia, ω_{bombeo} es un valor medio de su radio (un valor promedio ligeramente superior al del radio del haz en su cintura), y k_C y k_D son funciones de la variable radial, r, que tienen en cuenta los efectos de la convección y difusión, respectivamente. Para valores bajos de ω_{bombeo} y valores elevados del producto ϵP , se absorbe y se concentra mucha energía en un pequeño volumen y, por lo tanto, el sistema se aproxima a la saturación óptica.

Existen dos mecanismos que compiten para reducir la población del estado excitado intermedio, y para regenerar la población del estado fundamental en la región de observación: los mecanismos de difusión-convección y la relajación vibracional. El grado de saturación óptica alcanzado viene determinado, principalmente, por el más rápido de estos dos procesos. Si se emplea un haz de bombeo débilmente enfocado, el término de difusión-convección será siempre pequeño en comparación con k_q . Por otro lado, serán necesarios valores elevados del producto ϵP para alcanzar un grado de saturación óptica significativo. Por lo tanto, si se utiliza un haz de bombeo débilmente enfocado, B se aproximará a la unidad, y se seguirá el comportamiento predicho por la teoría clásica. En cambio, con un haz de bombeo fuertemente enfocado, el valor de Ω_{bombeo} será muy bajo, y el término de difusión-convección puede ser mayor que k_q . A un valor crítico del producto ϵP , el efecto de la saturación óptica igualará a los efectos combinados de los procesos de difusión-convección y de relajación, y un incremento en los valores de ϵ o de P puede aumentar significativamente el grado de saturación óptica.

Por lo tanto, si el término de difusión-convección es grande en comparación con k_q , B puede ser mucho menor que la unidad. Esto supone una importante pérdida de sensibilidad para las experiencias realizadas con haces de bombeo fuertemente enfocados. Además, a valores bajos de ϵ , o a bajas potencias de bombeo, el límite superior de B afectará de forma constante a todas las medidas de ELT, lo que sugiere que el factor de corrección introducido por Carter y Harris, 0,52 (ecuación I.1), puede de hecho, ser un límite superior de B en las condiciones utilizadas por estos autores. Si esto es cierto, este factor sería diferente para otras experiencias en las que se utilizaran valores de Ω_{bombeo} distintas, u otros disolventes y cromóforos.

Para comprobar el modelo, se evaluó experimentalmente B para diversas especies absorbentes, en medios polares y apolares. De los datos obtenidos se deduce que las especies que originan mayores valores de B son las que interactúan más fuertemente con las moléculas del disolvente, ya sea mediante puentes de hidrógeno no impedidos, en el caso de los solutos polares en disolventes polares, o ya mediante interacciones hidrofóbicas, en el caso de los solutos apolares en benceno y tetracloruro de carbono. En el caso de los ditizonatos metálicos, la interacción parece producirse, principalmente, entre el ion central y los átomos de cloro del disolvente.

XI.4.- Determinación de clenbuterol en preparados farmacéuticos y en orina

La determinación del clenbuterol por espectrofotometría directa en el UV es un procedimiento poco sensible. Tanto la sensibilidad como la selectividad pueden mejorarse por diazotación con nitrito, eliminación de su exceso con ácido sulfámico y acoplamiento con N-(1-naftil)etilendiamina (NED). Sin embargo, cuando se desea determinar clenbuterol en preparados farmacéuticos, donde se halla en una baja concentración, se necesita una gran cantidad de muestra (varias tabletas), para realizar los análisis. Se demostró que el límite de detección del procedimiento espectrofotométrico puede disminuirse mediante la utilización de la ELT, debido a la elevada estabilidad del cromóforo y a la baja absorbancia del blanco. La determinación espectrofotométrica de clenbuterol en tabletas, mediante calibración directa, produce un error sistemático del +10%. Este error se corrige restando a la absorbancia de la disolución, la absorbancia de un blanco interno. Por otro lado, el espectro del blanco interno presenta una disminución continua de la absorbancia en el intervalo 450-550 nm, lo que sugiere que la absorbancia de fondo es debida a la dispersión de la radiación sobre las partículas en suspensión (por una ineficaz separación de los extractos de las partículas más finas de la matriz), e implica que el espectro del azocolorante contiene la información necesaria para evaluar y restar esta señal de fondo. Se ha desarrollado un procedimiento alternativo para realizar esta corrección. El procedimiento, basado en una corrección mediante medidas a tres longitudes de onda, está exento de error sistemático y conduce a un límite de detección de 1×10^{-7} M (35 ng ml^{-1}).

En ELT, para reducir la absorbancia del blanco, se debe reducir la concentración de los reactivos nitrito, ácido sulfámico y NED, obteniéndose buenos resultados al utilizar concentraciones 100 veces inferiores que las utilizadas en espectrofotometría. Esta reducción de las concentraciones no produce una disminución de la sensibilidad en ELT. El límite de detección es $4,8 \times 10^{-9}$ M ($1,5 \text{ ng ml}^{-1}$), valor 14 veces inferior al límite de detección en espectrofotometría. La repetitividad, dada como desviación estándar relativa es del 1,5% (para una disolución de 50 ng ml^{-1} , $n = 6$). El método de adición estándar no revela la existencia de efecto matriz. Al aplicar el procedimiento a preparados farmacéuticos, no se obtiene error sistemático, y la incertidumbre es del orden del 2%, tanto mediante calibrado directo, como por el método de adición estándar. Así, la ELT es una técnica adecuada para la evaluación del contenido en clenbuterol en preparados farmacéuticos por debajo del nivel de una dosis, siendo útil para el control de calidad, incluido el estudio de la dispersión entre tableta y tableta.

Finalmente, se desarrolló un procedimiento de extracción y derivatización precolumna, para la determinación cromatográfica de clenbuterol en muestras de orina humana, utilizando como eluyentes disolventes micelares, que permiten la inyección de las muestras fisiológicas, sin separación previa de las proteínas. El procedimiento se desarrolló utilizando detección espectrofotométrica. Es conveniente derivatizar el clenbuterol previamente a su inyección en la columna cromatográfica, lo que puede hacerse por la formación del azocolorante de NED. La derivatización aumenta de forma importante la sensibilidad en la detección del clenbuterol, especialmente cuando las medidas se realizan a valores de pH muy bajos. Sin embargo, en cromatografía en fase inversa con una columna C_{18} , no pueden utilizarse medios fuertemente ácidos, por lo que el azocolorante del clenbuterol se eluyó empleando fases móviles micelares tamponadas a pH 3.

Con una fase móvil de SDS 0,1 M/12% de *n*-butanol a pH 3, los picos del clenbuterol sin derivatizar y derivatizado aparecen a 7,3 min y 8,5 min, respectivamente. La retención es similar con una fase móvil de pH 7, pero la eficacia es menor. Cuando se inyectan muestras de orina aditivadas con clenbuterol, aparecen en los cromatogramas de orina otros picos de compuestos endógenos, distribuidos a lo largo del cromatograma, que se solapan con el pico del clenbuterol, especialmente cuando no se derivatiza. La derivatización en presencia de la matriz orina tiene un rendimiento bajo, inferior al 20%, debido a la interacción del clenbuterol con la matriz de orina, y al consumo de los reactivos de derivatización por parte de compuestos endógenos.

Se decidió aislar el clenbuterol, realizando previamente a la derivatización, una extracción en fase sólida. El clenbuterol se retiene en proporciones cercanas al 100% sobre cartuchos de C_{18} y de intercambiador catiónico SCX, y se eluye cuantitativamente con SDS 0,1 M conteniendo un 12% de *n*-butanol. La extracción no elimina todos los compuestos endógenos de la orina, apareciendo picos que solapan con el pico del fármaco. Sin embargo, los cromatogramas de muestras de orina sometidas a extracción sobre cartuchos C_{18} y derivatización del eluato, muestran una línea base exenta de picos de compuestos endógenos. Con cartuchos C_{18} y alcalinización previa de las muestras se alcanzan recuperaciones por encima del 95%.

Cuando se realiza detección mediante ELT, la reducción del caudal mediante programación de la bomba del cromatógrafo, permite evitar los inconvenientes debidos a la baja velocidad de adquisición de datos. Si se reduce el caudal justo antes del comienzo del pico, el tiempo total de análisis no aumenta excesivamente. El calibrado es lineal a niveles de concentración más bajos que con detección espectrofotométrica, pero la recuperación es también menor (64%), debido probablemente, a una disminución en el rendimiento de la extracción a concentraciones bajas. Para orina aditivada y niveles de concentración de 5 y 0,16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de clenbuterol, el procedimiento recomendado conduce a una repetitividad del 3,1 y 5,6%, para la detección espectrofotométrica y de ELT, respectivamente. En el primer caso, el límite de detección es 51 ng ml^{-1} ($1,6 \times 10^{-7}$ M) y en el segundo, 6,7 ng ml^{-1} ($2,1 \times 10^{-8}$ M).

XII.- REFERENCIAS

XII.- REFERENCIAS

- 1 J.P. Gordon, R.C.C. Leite, R.S. Moore, S.P.S. Porto y J.R. Whinnery; *J. Appl. Phys.*, 1965, **36**, 3.
- 2 N.J. Dovichi y J.M. Harris; *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 728.
- 3 N.J. Dovichi y J.M. Harris; *Anal. Chem.*, 1980, **52**, 2338.
- 4 N.J. Dovichi y J.M. Harris; *Anal. Chem.*, 1981, **53**, 106.
- 5 C.A. Carter, J.M. Brady y J.M. Harris; *Appl. Spectrosc.*, 1982, **36**, 309.
- 6 C.A. Carter y J.M. Harris; *Appl. Spectrosc.*, 1983, **37**, 166.
- 7 C.A. Carter y J.M. Harris; *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1256.
- 8 C.A. Carter y J.M. Harris; *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 922.
- 9 K. Mori, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 2034.
- 10 K. Nakanishi, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 1219.
- 11 M.D. Morris y K. Peck; *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 811A.
- 12 N.J. Dovichi; *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1987, **17**, 357.
- 13 J. Georges y J.M. Mermet; *Analisis*, 1988, **16**, 203.
- 14 V.I. Grishko y I.G. Yudelevich; *Zh. Anal. Khim.*, 1989, **44**, 1753.
- 15 G. Ramis Ramos; *Anal. Chim. Acta*, 1993, **283**, 623.
- 16 E.F. Simó Alfonso, Y. Martín Biosca, M.C. García Álvarez-Coque y G. Ramis Ramos; *Thermochim. Acta*, 1993, **219**, 53.
- 17 M. Xu y C.D. Tran; *Anal. Chim. Acta*, 1990, **235**, 445.
- 18 C.D. Tran y V. Simianu; *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 1419.
- 19 M. Franko y C.D. Tran; *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 1925.
- 20 M. Franko y C.D. Tran; *Appl. Spectrosc.*, 1989, **43**, 661.
- 21 C. Moulin, N. Delorme, T. Berthoud y P. Mauchien; *Radiochim. Acta*, 1988, **44/45**, 103.
- 22 N. Omenetto, P. Cavalli, G. Rossi, G. Bidoglio y G.C. Turk; *J. Anal. At. Spectrom.*, 1987, **2**, 579.
- 23 C. Hu y J.R. Whinnery; *Appl. Optics*, 1973, **12**, 72.
- 24 S.J. Sheldon, L.V. Knight y J.M. Thorne; *Appl. Optics*, 1982, **21**, 1663.
- 25 C.A. Carter y J.M. Harris; *Appl. Optics*, 1984, **23**, 476.
- 26 T. Berthoud, N. Delorme y P. Mauchien; *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 1216.
- 27 J. Shen, R.D. Lowe y R.D. Snook; *Chem. Phys.*, 1992, **165**, 385.

- 28 C.E. Buffet y M.D. Morris; *Appl. Spectrosc.*, 1983, **37**, 455.
- 29 E.F. Simó Alfonso, M.A. Rius Revert, M.C. García Alvarez-Coque y G. Ramis Ramos; *Appl. Spectrosc.*, 1990, **44**, 1501.
- 30 T.G. Nolan, B.K. Hart y N.J. Dovichi; *Anal. Chem.*, 1985, **57**, 2703.
- 31 K. Peck y M.D. Morris; *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2876.
- 32 T.G. Nolan y N.J. Dovichi; *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 2803.
- 33 J.F. Power y C.H. Langford; *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 842.
- 34 M.A. Rius Revert, M.C. García Alvarez-Coque y G. Ramis Ramos; *Anal. Chim. Acta*, 1994, **292**, 113.
- 35 M.J. Sepaniak, J.D. Vargo, C.N. Kettler y M.P. Maskarinec; *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 1252.
- 36 S.L. Nickolaisen, y S.E. Bialkowski; *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 215.
- 37 C.D. Tran y M. Xu; *Rev. Sci. Instrum.*, 1989, **60**, 3207.
- 38 M. Xu y C.D. Tran; *Appl. Spectrosc.*, 1990, **44**, 962.
- 39 R.A. Leach y J.M. Harris; *J. Chromatogr.*, 1981, **218**, 15.
- 40 C.E. Buffet y M.D. Morris; *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 1824.
- 41 Y. Yang, S.C. Hall y M.S. De la Cruz; *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 758.
- 42 M. Yu y N.J. Dovichi; *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 37.
- 43 A.E. Bruno, A. Paulus y D.J. Bornhop; *Appl. Spectrosc.*, 1991, **45**, 462.
- 44 S.R. Erskine y D.R. Bobbitt; *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 910.
- 45 T.G. Nolan, D.J. Bornhop y N.J. Dovichi; *J. Chromatogr.*, 1987, **384**, 189.
- 46 J.S. Esteve Romero, E.F. Simó Alfonso, M.C. García Alvarez-Coque y G. Ramis Ramos; *Talanta*, 1993, **40**, 1711.
- 47 R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols, E.F. Simó Alfonso y G. Ramis Ramos; *Anal. Lett.*, 1992, **25**, 1425.
- 48 R.M. Villanueva Camañas, J.M. Sanchis Mallols y G. Ramis Ramos; *Chromatographia*, 1994, **38**, 365.
- 49 J.M. Sanchis Mallols, R.M. Villanueva Camañas y G. Ramis Ramos; *Analyst*, 1992, **117**, 1367.
- 50 J.P. Haushalter y M.D. Morris; *Appl. Spectrosc.*, 1980, **34**, 445.
- 51 K. Fujiwara, K. Kishibe, H. Uchiki, F. Shimokoshi, K. Fuwa y T. Kobayashi; *Anal. Biochem.*, 1982, **127**, 164.

- 52 A.G. Abroskin, Y.A. Barbalat, T.A. Belyaeva, E.K. Ivanova, M.A. Proskurnin, V.M. Savostina y V.A. Filichkina; *Mendeleev Commun.*, 1991, 2, 57.
- 53 A.G. Abroskin, T.A. Belyaeva, E.K. Ivanova, S.G. Mayakova y M.A. Proskurnin; *Zh. Anal. Khim.*, 1991, 46, 1199.
- 54 J.A. Alfheim y C.H. Langford; *Anal. Chem.*, 1985, 57, 861.
- 55 T. Higashi, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chem.*, 1984, 56, 2010.
- 56 T. Higashi, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Bunseki Kagaku*, 1982, 31, 680.
- 57 G.R. Long y S.E. Bialkowski; *Anal. Chem.*, 1984, 56, 2806.
- 58 V.A. Filichkina, A.G. Abroskin, M.A. Proskurnin y V.M. Savostina; *Zh. Anal. Khim.*, 1992, 47, 1417; *J. Anal. Chem.*, 1992, 47, 1038.
- 59 K. Miyaishi, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chim. Acta*, 1981, 124, 381.
- 60 T. Imasaka, K. Miyaishi y N. Ishibashi; *Anal. Chim. Acta*, 1980, 115, 407.
- 61 R.A. Leach y J.M. Harris; *Anal. Chim. Acta*, 1984, 164, 91.
- 62 T. Imasaka, K. Sakaki y N. Ishibashi; *Anal. Chim. Acta*, 1991, 243, 109.
- 63 R.D. Lowe y R.D. Snook; *Anal. Chim. Acta*, 1991, 250, 95.
- 64 Y. Deng, R. He y Q. Luo; *Huanjing Huaxue*, 1991, 10, 76.
- 65 M.A. Proskurnin, A.G. Abroskin, I.V. Golovko y E.K. Ivanova; *Zh. Anal. Khim.*, 1994, 49, 263.
- 66 Z. Jiang, Y. Xiang y J. Wang; *J. Electroanal. Chem.*, 1991, 316, 199.
- 67 V.A. Filichkina, A.G. Abroskin, O.M. Zharikova, M.A. Proskurnin y V.M. Savostina; *Zh. Anal. Khim.*, 1992, 47, 660; *J. Anal. Chem.*, 1992, 47, 483.
- 68 V.A. Filichkina, A.G. Abroskin, Y.A. Barbalat, T.V. Belyaeva, M.A. Proskurnin y V.M. Savostina; *Zh. Anal. Khim.*, 1992, 47, 503; *J. Anal. Chem.*, 1992, 47, 368.
- 69 M. Xu y C.D. Tran; *Anal. Chem.*, 1990, 62, 2467.
- 70 Z.M. Zhang y G.R. Long; *Appl. Spectrosc.*, 1993, 47, 2126.
- 71 M.J. Medina Hernández, J.R. Torres Lapasió, M.C. García Álvarez-Coque y G. Ramis Ramos; *Microchem. J.*, 1991, 44, 222.
- 72 I. Grenthe, G. Bidoglio y N. Omenetto; *Inorg. Chem.*, 1989, 28, 71.
- 73 R.J. Roach y R.D. Snook; *Anal. Chim. Acta*, 1992, 262, 231.
- 74 G. Bidoglio, G. Tanet, P. Cavalli y N. Omenetto; *Inorg. Chim. Acta*, 1987, 140, 293.
- 75 G. Bidoglio, P. Cavalli, I. Grenthe, N. Omenetto, P. Qi y G. Tanet; *Talanta*, 1991, 38, 433.
- 76 Y. Enokida, M. Shiga y A. Suzuki; *Radiochim. Acta*, 1992, 57, 101.

- 77 T. Berthoud, P. Mauchien, N. Omenetto y G. Rossi; *Anal. Chim. Acta*, 1983, **153**, 265.
- 78 C.D. Tran y W. Zhang; *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 830.
- 79 J. Georges; *Spectrochim. Acta Rev.*, 1991, **14**, 337.
- 80 N. Delorme; *Radiochim. Acta*, 1991, **52-53**, 105.
- 81 R. He, Q. Luo, J. Cao y Y. Deng; *Fenxi Huaxue*, 1988, **16**, 21.
- 82 A. Chartier, C.G. Fox y J. Georges; *Analyst*, 1993, **118**, 157.
- 83 D.A. Wruck, R.E. Russo y R.J. Silva; *J. of Alloys and Compounds*, 1994, **213**, 481.
- 84 M.A. Proskurnin, A.G. Abroskin, S.I. Artemova, T.V. Belyaeva y E.K. Ivanova; *Zh. Anal. Khim.*, 1992, **47**, 545; *J. Anal. Chem.*, 1992, **47**, 402.
- 85 V.P. Grishko y V.I. Grishko; *Sibirskii Khim. Zh.*, 1991, **6**, 29.
- 86 K. Fujiwara, W. Lei, H. Uchiki, F. Shimokoshi, K. Fuwa y T. Kobayashi; *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 2026.
- 87 V.I. Grishko, I.G. Yudelevich, L.Kh. Kravchenko y V.P. Nikitina; *Zh. Anal. Khim.*, 1984, **39**, 826.
- 88 V.I. Grishko, V.P. Grishko y Y.Y. Kuzyakov; *Sibirskii Khim. Zh.*, 1992, **1**, 115.
- 89 V. I. Grishko, I.G. Yudelevich, y V.P. Grishko; *Zh. Anal. Khim.*, 1984, **39**, 1813.
- 90 V.I. Grishko, V.P. Grishko, M.M. Goldshtein y I.G. Yudelevich; *Zh. Anal. Khim.*, 1985, **40**, 2155.
- 91 M.A. Rius Revert, G. Ramis Ramos, S. Cabredo Pinillos y J. Galbán Bernal; *Quim. Anal.*, 1993, **12**, 7.
- 92 G. Ramis Ramos, M.C. García Alvarez-Coque, B.W. Smith, N. Omenetto y J.D. Winefordner; *Appl. Spectrosc.*, 1988, **42**, 341.
- 93 E.F. Simó Alfonso, G. Ramis Ramos, J.M. Estela Ripoll, L. Hernández Guerra y V. Cerdá Martín; *Quim. Anal.*, 1990, **9**, 245.
- 94 A.G. Abroskin, T.V. Belyaeva, V.A. Filichkina, E.K. Ivanova, M.A. Proskurnin, V.M. Savostina y Y.A. Barbalat; *Analyst*, 1992, **117**, 1957.
- 95 D.W. Gutzman y C.H. Langford; *Anal. Chim. Acta*, 1993, **283**, 773.
- 96 V.P. Grishko, V.I. Grishko y I.G. Yudelevich; *Zh. Anal. Khim.*, 1989, **44**, 434.
- 97 D.K. Sharma, F. Villamagna y C.H. Langford; *Can. J. Spectrosc.*, 1983, **28**, 181.
- 98 K. Fujiwara, H. Uchiki, F. Shimokoshi, K. Tsunoda, K. Fuwa y T. Kobayashi; *Appl. Spectrosc.*, 1982, **36**, 157.

- 99 K. Mori, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1075.
- 100 C.D. Tran y M. Franko; *J. Phys. E.: Sci. Instrum.*, 1989, **22**, 586.
- 101 T. Higashi, T. Imasaka y N. Ishibashi; *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1907.
- 102 T. Imasaka, T. Higashi y N. Ishibashi; *Anal. Chim. Acta*, 1991, **245**, 191.
- 103 E.F. Simó Alfonso, M.C. García Álvarez-Coque, G. Ramis Ramos, A. Cladera Forteza, M. Estela Ripoll y V. Cerdá Martín; *Anal. Lett.*, 1992, **85**, 573.
- 104 J.R. Torres Lapasió; *Tesis Doctoral*, Universidad de Valencia, 1996.
- 105 E.W. Washburn (editor); *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology*, Vol. 3, National Research Council, New York, 1928.
- 106 R.C. Weast y M.J. Astle; *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 60ª ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1980.
- 107 G. Gouesbet, M. Rhazi y M.E. Weill; *Appl. Opt.*, 1983, **22**, 2038.
- 108 E. Jakeman, E.R. Pike y J.M. Vaughan, *RRE Newsletter and Research Review*; 1973, 12.
- 109 R. Anthore, P. Flament, G. Gouesbet, M. Rhazi y M.E. Weill; *Appl. Optics*, 1982, **21**, 2.
- 110 M.E. Weill, M. Rhazi y G. Gouesbet; *C.R. Acad. Sci. (París)*, 1982, **294**, 567.
- 111 M.E. Weill, M. Rhazi y G. Gouesbet; *J. Phys.*, 1985, **46**, 1501.
- 112 G. Gouesbet, M.E. Weill y E. Lefort; *AIAA J.*, 1986, **24**, 1324.
- 113 G. Gouesbet; *Phys. Chem. Hydrodynamics*, 1987, **8**, 349.
- 114 J. Maquet, G. Gouesbet y A. Berlemont; *Numerical Methods in Thermal Problems, Proceedings of the Fifth International Conference on Numerical Methods for Thermal Problems*, Montreal, 1987, editado por R. W. Lewis, K. Morgan y W. G. Habashi, Pineridge Press, Swansea, United Kingdom, 1987, Vol. 5, Parte 1, págs. 472-483.
- 115 G. Gouesbet y J. Maquet; *AIAA J. Thermophys. Heat Transf.*, 1989, **3**, 27.
- 116 G. Gouesbet y E. Lefort; *Physical Rev. A*, 1988, **37**, 4903.
- 117 A.P. French; *Vibraciones y ondas*, Reverté, Barcelona, 1995.
- 118 V. Yu. Bazhenov, M.V. Vasnetsov, M.S. Soskin y V.B. Taremenko; *Pis'ma Zh. Eksp. Teor. Fiz.*, 1989, **49**, 330; *JEPT Lett.*, 1989, **49**, 376.
- 119 M. Terazima, M. Horiguchi y T. Azumi; *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 883.
- 120 G. Ramis Ramos, J.J. Baeza Baeza y E.F. Simó Alfonso; *Anal. Chim. Acta*, 1994, **296**, 107.
- 121 J.D. Ingle y S.R. Crouch; *Spectrochemical Analysis*, Prentice Hall, New Jersey, 1988.
- 122 W. Demtröder; *Laser Spectroscopy*, Springer, Berlín, 2ª ed., 1982, págs. 13-16.
- 123 O. Svelto; *Principles of Lasers*, Plenum, New York, 3ª ed., 1989, págs. 3-4.

- 124 R.B. Bird, W.E. Stewart y E.N. Lightfoot; *Fenómenos de Transporte*, Reverté, Madrid, 1964.
- 125 B.L. Karger, L.R. Snyder y C. Horvath; *An Introduction to Separation Science*, Wiley, New York, 1973, capítulo 3.
- 126 J.D. Gaskill; *Linear Systems, Fourier Transforms and Optics*, Wiley, New York, 1978, pág. 425.
- 127 Z. Marczenko, *Spectrophotometric Determination of Elements*, Ellis Horwood, Chichester, 1976.
- 128 A.T. Hutton, H.M.N.H. Irving y L.R. Nassimbeni, *Acta Cryst.*, 1980, B36, 2064.
- 129 R.E. Schirmer; *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL, 1982.
- 130 A.C. Bratton y E.I. Marshall, Jr.; *J. Biol. Chem.*, 1939, 128, 537.
- 131 J.H. Ridd; *Q. Rev. Chem. Soc.*, 1961, 15, 418.
- 132 K.A. Connors; *Reaction Mechanisms in Organic Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 1973, pág. 238.
- 133 J.P. Dux y C. Rosenblum; *Anal. Chem.*, 1949, 21, 1524.
- 134 R.A. Kaselis, W. Leibmann, W. Seaman, J.P. Sikels, E.I. Stearns y J.T. Woods; *Anal. Chem.*, 1941, 23, 746.
- 135 G. Ramis Ramos, J.S. Esteve Romero y M.C. García Alvarez-Coque; *Anal. Chim. Acta*, 1989, 223, 327.
- 136 J.S. Esteve Romero, G. Ramis Ramos y M.C. García Alvarez-Coque; *J. coll. interf. Sc.*, 1991, 141, 44.
- 137 J.S. Esteve Romero, M.C. García Alvarez-Coque y G. Ramis Ramos; *Talanta*, 1991, 38, 1285.
- 138 J.P. Hanrahan; *β-Agonists and their Effects on Animal Carcass Quality*, Elsevier, Londres, 1987.
- 139 P.K. Baker, R.H. Dalrymple, D.L. Ingle y C.A. Ricks; *J. Anim. Sci.*, 1984, 59, 1256.
- 140 H.H. Meyer, L. Rinke y I. Dürsch; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1991, 564, 551.
- 141 M.J. Sauer, R.J.H. Pickett y A.L. MacKenzie; *Anal. Chim. Acta*, 1993, 275, 195.
- 142 H.J. Foerster, K.L. Rominger, E. Ecker, H. Peil y A. Wittrock; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 1988, 17, 417.

- 1433 A. Poletini, M.C. Ricossa, A. Groppi y M. Montagna; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1991, **564**, 529.
- 1444 W.J. Blanchflower, S.A. Hewitt, A. Cannavan, C.T. Elliott y D.G. Kennedy; *Biol. Mass. Spectrom.*, 1993, **22**, 326.
- 1455 G.A. Qureshi y A. Eriksson; *J. Chromatogr.*, 1988, **441**, 197.
- 1466 P.A. Biondi, L. Guidotti, M. Montana, F. Manca, G. Brambilla y C. Lucarelli; *J. Chromatogr. Sci.*, 1991, **29**, 190.
- 1477 D. Courtheyn, C. Desaeveer y R. Verhe; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1991, **564**, 537.
- 1488 K.D. Altria, R.C. Harden, M. Hart, J. Hevizi, P.A. Hailey, J.V. Makwana y M.J. Portsmouth; *J. Chromatogr.*, 1993, **641**, 147.
- 1499 J.A. Hamann, K. Johnson y D.T. Heter; *J. Chromatogr. Sci.*, 1985, **23**, 34.
- 1560 E. Ciranni-Signoretti, C. D'Arpino y F. La Torre; *J. Chromatogr.*, 1989, **473**, 301.
- 1511 J.B. Thorne y D.R. Bobbitt; *Appl. Spectrosc.*, 1993, **47**, 360.
- 1522 M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque; *Analyst*, 1992, **117**, 831.
- 1533 E. Bonet Domingo, M.J. Medina Hernández y M.C. García Álvarez-Coque; *Quim. Anal.*, 1993, **12**, 167.



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. YOLANDA MARTIN BIOSCA

la calificación de APTO "CUM LAUDE" (Por unanimidad)

Valencia, a 19 de JULIO de 1979

El Secretario,

El Presidente



[Handwritten signatures in blue ink over the stamp and text]

