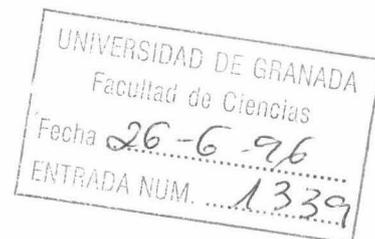
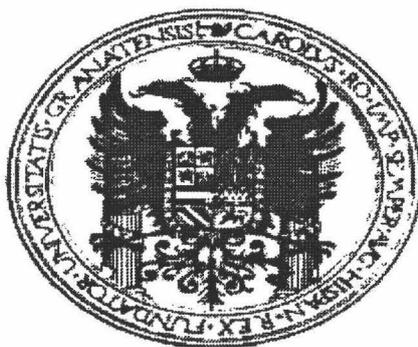


T. Prov 16/91

T
16
29



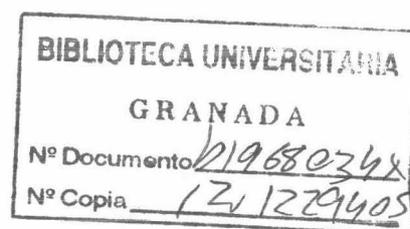
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

**LA FOSFORIMETRÍA A TEMPERATURA AMBIENTE
EN MEDIOS MICELARES COMO TÉCNICA ANALÍTICA
PARA LA DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS
DE INTERÉS AMBIENTAL**



**Antonio Segura Carretero
Granada, 1996**



**LA FOSFORIMETRÍA A TEMPERATURA AMBIENTE
EN MEDIOS MICELARES COMO TÉCNICA ANALÍTICA
PARA LA DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS
DE INTERÉS AMBIENTAL**

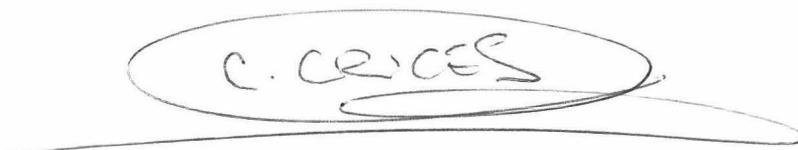
por

Antonio Segura Carretero

VISADO en Granada a 17 de Junio de 1996



Fdo. Dr.D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático del Departamento de Química Analítica,
Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.



Fdo. Dra.Dña. Carmen Cruces Blanco
Profesora Asociada del Departamento de Química Analítica,
Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

Memoria de Investigación presentada para optar al Grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado "Metodología y tratamiento de los fenómenos químicos".

Granada, 17 de Junio de 1996.



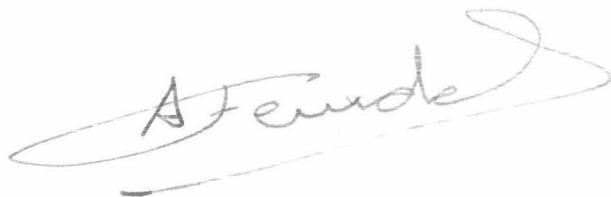
Fdo. Antonio Segura Carretero

D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título de "LA FOSFORIMETRÍA A TEMPERATURA AMBIENTE EN MEDIOS MICELARES COMO TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE INTERÉS AMBIENTAL", ha sido realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias, dentro del programa de Doctorado "Metodología y tratamiento de los fenómenos químicos".

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a diecisiete de Junio de mil novecientos noventa y seis.

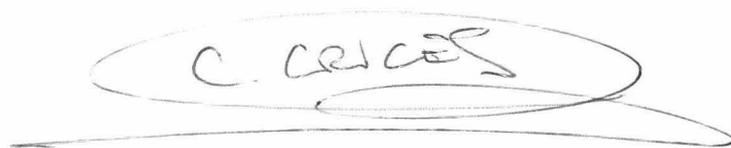
A handwritten signature in black ink, appearing to read "A. Fernández", is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive, with a large loop at the end.

Dña. CARMEN CRUCES BLANCO, Profesora Asociada del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título de "LA FOSFORIMETRÍA A TEMPERATURA AMBIENTE EN MEDIOS MICELARES COMO TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE INTERÉS AMBIENTAL", ha sido realizado íntegramente por D. Antonio Segura Carretero en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo mi dirección. Revisado el texto, considero que el trabajo reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias, dentro del programa de Doctorado "Metodología y tratamiento de los fenómenos químicos".

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a diecisiete de Junio de mil novecientos noventa y seis.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a large, irregular oval scribble. The signature appears to read "C. Cruces".

A la memoria de mi madre

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Carmen Cruces Blanco y al Dr. Alberto Fernández Gutiérrez, directores de esta memoria, por su constante estímulo, orientación, apoyo y dedicación incondicional que han hecho posible el desarrollo de la misma.

A todos mis compañeros del Departamento de Química Analítica y en especial a Ana, Amparo, Elena, Fermín, Juan y Luis quienes, de una u otra forma, han contribuido a que esta memoria sea una realidad.

A mi familia y a Mari Trini por la ayuda que he recibido en todo momento de ellos.

A todos ellos mi más sincera gratitud.



Índice

Índice	13
Objeto de la Tesis	23
Introducción	27
Reactivos, instrumentación y metodología	65
1. Reactivos, disolventes y disoluciones	67
1.1. Reactivos	67
1.2. Disolventes orgánicos	68
1.3. Disoluciones	69
1.3.1. Agentes micelares	69
1.3.2. Átomos pesados	70
1.3.3. Sulfito sódico y ácido sulfúrico	70
1.3.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	70
1.3.5. Fitohormonas e insecticidas	70
2. Instrumentación	71
2.1. Medidas de intensidad de fluorescencia y fosforescencia	71
2.2. Pesada	72
2.3. Material adicional	72
3. Metodología	73
3.1. Características espectroscópicas	73
3.2. Selección de variables experimentales	74
3.2.1. Optimización de reactivos	74
3.2.2. Optimización del volumen de muestra	88
3.2.3. Influencia del orden de adición	88
3.2.4. Influencia de la temperatura	88
3.2.5. Estabilidad con el tiempo	89
3.2.6. Influencia de la concentración de analito	89
3.3. Selección de parámetros instrumentales	89
3.3.1. Optimización del mínimo período de flash	89
3.3.2. Optimización de las longitudes de onda de excitación	90
3.3.3. Optimización del incremento de longitud de onda	90
3.3.4. Optimización de la ruta de trabajo	90
3.3.5. Características espectroscópicas	91
3.3.6. Parámetros instrumentales establecidos	91
3.4. Establecimiento del método analítico	91
3.4.1. Procedimiento operatorio	91
3.4.2. Rectas de calibrado	92
3.4.3. Parámetros de fiabilidad	92
3.4.4. Estudio de interferencias	98
3.5. Aplicaciones	99

Parte A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	105
Capítulo I. Determinación fosforimétrica de acenafteno	117
1. Características espectroscópicas	119
1.1. Características fluorescentes	119
1.2. Características fosforescentes	119
1.2.1. Curva de decaimiento	120
2. Selección de variables experimentales	123
2.1. Optimización conjunta de agente micelar, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4	123
2.2. Selección del tipo de microemulsión	134
2.3. Optimización del volumen de muestra	137
2.4. Influencia del orden de adición	138
2.5. Influencia de la temperatura	139
2.6. Estabilidad con el tiempo	140
2.7. Influencia de la concentración de analito	140
3. Selección de parámetros instrumentales	142
3.1. Optimización del mínimo período de flash	142
3.2. Optimización de la longitud de onda de excitación	143
3.3. Optimización del incremento de longitud de onda	144
3.4. Características espectroscópicas	145
3.5. Parámetros instrumentales establecidos	147
4. Establecimiento del método analítico	147
4.1. Procedimiento operatorio	148
4.2. Rectas de calibrado y cálculo de los parámetros de fiabilidad	148
4.2.1. Según la IUPAC	148
4.2.2. Según el método de regresión lineal	151
4.2.3. Estudio comparativo de ambas metodologías	154
4.3. Estudio de interferencias	156
5. Aplicaciones	157
Capítulo II. Determinación fosforimétrica conjunta de Fenantreno, Fluoranteno y Benz[a]antraceno	161
1. Características espectroscópicas	163
1.1. Características fluorescentes	163
1.2. Características fosforescentes	163
1.2.1. Curvas de decaimiento	164
1.3. Comparación entre fluorescencia y fosforescencia	169
1.3.1. Contornos fluorescentes	169
1.3.2. Contornos fosforescentes	169
2. Selección de las condiciones de medida y la ruta	172

2.1. Optimización individualizada de las características instrumentales . . .	172
2.2. Optimización de la ruta	175
2.3. Representación de los espectros asincrónicos de ángulo variable . . .	175
3. Selección de variables experimentales	180
3.1. Optimización conjunta de agente micelar, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 . .	180
3.2. Selección del tipo de microemulsión	191
3.3. Optimización del volumen de muestra	192
3.4. Influencia del orden de adición	193
3.5. Influencia de la temperatura	194
3.6. Estabilidad con el tiempo	196
3.7. Influencia de la concentración de analito	196
4. Selección de otros parámetros instrumentales	198
4.1. Optimización del mínimo período de flash	198
4.2. Optimización de la longitud de onda de excitación	199
5. Estudio de los parámetros analíticos	200
5.1. Estudio de la interdependencia de las señales analíticas.	200
5.2. Procedimiento operatorio	202
5.3. Rectas de calibrado	202
5.4. Parámetros de fiabilidad	207
5.5. Estudio de interferencias	208
6. Aplicaciones	209
6.1. Resolución de muestras sintéticas	209
6.2. Muestras de café	210

Capítulo III. Determinación fosforimétrica conjunta de Acenafteno, Fluoranteno, Pireno, Benz[a]antraceno y Benzo[a]pireno 213

1. Características espectroscópicas	215
1.1. Características fluorescentes	215
1.2. Características fosforescentes	215
1.2.1. Curvas de decaimiento	216
1.3. Comparación entre la fluorescencia y la fosforescencia	222
1.3.1. Contornos fluorescentes	222
1.3.2. Contornos fosforescentes	225
2. Selección de las condiciones de medida y de la ruta	227
2.1. Optimización individualizada de los parámetros instrumentales	228
2.2. Optimización de la ruta	233
2.3. Representación de los espectros asincrónicos de ángulo variable . . .	234
3. Selección de variables experimentales	239
3.1. Optimización conjunta de agente micelar, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 . .	239
3.2. Selección del tipo de microemulsión	254

3.3. Optimización del volumen de muestra	255
3.4. Influencia del orden de adición	255
3.5. Influencia de la temperatura	256
3.6. Estabilidad con el tiempo	257
3.7. Influencia de la concentración de analito	258
4. Selección de otros parámetros instrumentales	260
4.1. Optimización del mínimo período de flash	260
4.2. Optimización de la longitud de onda de excitación	261
5. Estudio de los parámetros analíticos	262
5.1. Estudio de la interdependencia de las señales analíticas	262
5.2. Procedimiento operatorio	263
5.3. Rectas de calibrado	263
5.4. Parámetros de fiabilidad	271
5.5. Estudio de interferencias	272
6. Aplicaciones	273
6.1. Resolución de muestras sintéticas	273
6.2. Muestras de polvo de carretera	274
Capítulo IV. Determinación fosforimétrica conjunta cualitativa de nueve hidrocarburos aromáticos policíclicos	277
1. Características espectroscópicas	279
1.1. Características fluorescentes	279
1.2. Características fosforescentes	283
1.2.1. Curvas de decaimiento	283
2. Comparación entre la fluorescencia y la fosforescencia	287
2.1. Fluorescencia	287
2.2. Fosforescencia	288
3. Desarrollo del método fosforimétrico	290
3.1. Selección de variables experimentales	290
3.2. Selección de parámetros instrumentales	293
Parte B. Fitohormonas e insecticidas	295
1. Introducción	297
2. Generalidades	299
2.1. Generalidades del ácido β -naftiloxiacético	299
2.1.1. Estructura molecular	299
2.1.2. Nomenclatura e historia	299
2.1.3. Propiedades	300
2.1.4. Usos	300
2.1.5. Toxicología	300

2.1.6. Formulaciones comerciales	301
2.1.7. Métodos analíticos	301
2.2. Generalidades de la α -naftaleneacetamida	305
2.2.1. Estructura molecular	305
2.2.2. Nomenclatura e historia	305
2.2.3. Propiedades	305
2.2.4. Usos	305
2.2.5. Toxicología	306
2.2.6. Formulaciones comerciales	306
2.2.7. Métodos analíticos	306
2.3. Generalidades del carbaril	307
2.3.1. Estructura molecular	307
2.3.2. Nomenclatura e historia	307
2.3.3. Propiedades	308
2.3.4. Usos	309
2.3.5. Toxicología	309
2.3.6. Formulaciones comerciales	311
2.3.7. Aspectos generales de la química del carbaril	311
2.3.8. Métodos analíticos	313
Capítulo V. Determinación fosforimétrica del Ácido β-Naftiloxiacético	319
1. Características espectroscópicas	321
1.1. Características fluorescentes	321
1.2. Características fosforescentes	321
1.2.1. Curva de decaimiento	323
2. Selección de variables experimentales	325
2.1. Optimización conjunta de agente micelar, TINO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4	325
2.1.1. Selección del sistema de trabajo	353
2.2. Optimización del volumen muestra	355
2.3. Influencia del orden de adición	356
2.4. Influencia de la temperatura	357
2.5. Estabilidad con el tiempo	358
2.6. Influencia de la concentración de analito	359
3. Selección de parámetros instrumentales	360
3.1. Optimización del mínimo período de flash	360
3.2. Optimización de la longitud de onda de excitación	361
3.3. Optimización del incremento de longitud de onda	361
3.4. Características espectroscópicas	362
3.5. Parámetros instrumentales establecidos	364
4. Establecimiento del método analítico	364

4.1. Procedimiento operatorio	364
4.2. Rectas de calibrado	365
4.3. Parámetros de fiabilidad	368
4.4. Estudio de interferencias	369
5. Aplicaciones	370
5.1. Determinación en manzanas	370
Capítulo VI. Determinación fosforimétrica de la α-Naftaleneacetamida	373
1. Características espectroscópicas	375
1.1. Características fluorescentes	375
1.2. Características fosforescentes	376
1.2.1. Curva de decaimiento	377
2. Selección de variables experimentales	379
2.1. Optimización conjunta de agente micelar, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4	379
2.2. Optimización del volumen muestra	387
2.3. Influencia del orden de adición	387
2.4. Influencia de la temperatura	388
2.5. Estabilidad con el tiempo	389
2.6. Influencia de la concentración de analito	390
3. Selección de parámetros instrumentales	391
3.1. Optimización del mínimo período de flash	391
3.2. Optimización de la longitud de onda de excitación	392
3.3. Optimización del incremento de longitud de onda	393
3.4. Características espectroscópicas	394
3.5. Parámetros instrumentales establecidos	394
4. Establecimiento del método analítico	396
4.1. Procedimiento operatorio	396
4.2. Rectas de calibrado	396
4.3. Parámetros de fiabilidad	399
4.4. Estudio de interferencias	400
5. Aplicaciones analíticas	401
Capítulo VII. Determinación fosforimétrica del carbaril	403
1. Estabilidad de la disolución madre	405
2. Características espectroscópicas	406
2.1. Características fluorescentes	406
2.2. Características fosforescentes	406
2.2.1. Curva de decaimiento	407
3. Selección de variables experimentales	410
3.1. Optimización conjunta de agente micelar, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4	410

3.2. Selección del tipo de microemulsión	418
3.3. Optimización del volumen muestra	420
3.4. Influencia del orden de adición	421
3.5. Influencia de la temperatura	422
3.6. Estabilidad con el tiempo	423
3.7. Influencia de la concentración de analito	423
4. Selección de parámetros instrumentales	425
4.1. Optimización del mínimo período de flash	425
4.2. Optimización de la longitud de onda de excitación	427
4.3. Optimización del incremento de longitud de onda	428
4.4. Características espectroscópicas	429
4.5. Parámetros instrumentales establecidos	431
5. Establecimiento del método analítico	431
5.1. Procedimiento operatorio	431
5.2. Rectas de calibrado	432
5.3. Parámetros de fiabilidad	434
5.4. Estudio de interferencias	436
6. Aplicaciones analíticas	437
Conclusiones	441
Abreviaturas	445
Bibliografía	449



Objeto de la Tesis

El objeto de la presente Memoria ha sido demostrar las posibilidades que ofrecen las técnicas luminiscentes y, concretamente, la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución, para la resolución de los problemas analíticos planteados por el uso de productos químicos que conllevan un impacto negativo en el ambiente y, por tanto, en el hombre.

La principal restricción que se plantea al querer hacer uso de esta técnica es que el contaminante objeto de análisis debe presentar fosforescencia a temperatura ambiente. Por desgracia, el número de sustancias con estas características es muy limitada, por lo que el siguiente objetivo ha sido subsanar dicho problema mediante el trazado de un perfil de trabajo que comprendiera todas las opciones posibles (soporte sólido, complejos de inclusión, micelas, microemulsiones, etc...) y, especialmente el empleo de micelas y microemulsiones como sistemas en los cuales la observación de la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución es sencilla, rápida y capaz de competir en el análisis de compuestos orgánicos con otras técnicas luminiscentes.

Además, otro objetivo de la presente investigación ha sido proponer una alternativa a la aplicación de las técnicas de separación previas a la detección de estos contaminantes en las matrices complejas en las cuales inciden. Para ello, se ha desarrollado y se ha puesto a punto nuevas metodologías de análisis de mezclas de sustancias fosforescentes en disolución, sin separación previa, basadas en un adecuado proceso de la información espectral suministradas por las medidas fosforimétricas (derivadas, barrido sincrónico, espectros tridimensionales y barrido de ángulo variable).

El contenido de esta Memoria recoge las experiencias realizadas, los resultados obtenidos y la discusión de las mismas, así como las conclusiones alcanzadas en la presente investigación.



Introducción

El tema del análisis de trazas en medio ambiente no es trivial, es decir, no es una moda regida por un código arbitrario sino la consecuencia de un reto de nuestros días surgido de la tremenda importancia que pueden tener concentraciones muy pequeñas de determinadas especies en distintos sistemas y su proyección en Ciencia y Tecnología (Vandecasteele, 1993; Winefordner, 1976). Sustancias como semiconductores, materiales nucleares, productos con actividad farmacológica o bioquímica, muestras clínicas, aditivos y contaminantes alimenticios, sustancias empleadas con estándares, materiales de interés cultural, pesticidas, etc... son una muestra ilustrativa de productos técnicos en los que el control y determinación de bajas concentraciones comparte al químico analítico con problemas especiales y nuevos.

Los criterios que se han de tener en cuenta en la selección de un método analítico satisfactorio de análisis de compuestos a niveles de trazas son muchos pero ciertamente la sensibilidad y la selectividad son considerados como los más importantes.

Uno de los temas de creciente interés lo constituye la contaminación ambiental. Es un tema complejo en el cual la Química Analítica cumple una importante función derivada, principalmente, de la necesidad de controlar analíticamente las posibles contaminaciones del ambiente. Estas fuentes de contaminación proceden, en gran parte, del ámbito industrial (refinerías de petróleo, fábricas de fertilizantes, plantas de energía, etc...) que vierten sus residuos al aire a las aguas superficiales, siendo necesario un sistema de control que permita adoptar las medidas precisas para evitar, en lo posible, las consecuencias de estas situaciones.

En las explotaciones agrícolas son de uso corriente sustancias denominadas fitohormonas o reguladores del crecimiento que son utilizadas para influenciar favorablemente el crecimiento de las propias plantas cultivadas.

Uno de los principales objetivos en el análisis de las fitohormonas es el control de las mercancías agrícolas para consumo humano. La historia del producto suele ser, por tanto, desconocida, por lo que se requieren métodos analíticos que permitan la identificación y determinación cuantitativa de todos los residuos presentes. La baja toxicidad de estos productos para el hombre hace que los niveles permitidos en los países

en los que están regulados, sean relativamente altos. Sin embargo, el hecho de que no sean tóxicos no quiere decir que no sean nocivos si se ingieren de forma incontrolada, como cualquier producto químico.

Los plaguicidas pueden sufrir alteraciones químicas, en condiciones naturales, y los metabolitos formados ser peligrosos, incluso más que los componentes originales. Por otra parte, es fácil encontrar metabolitos que asociados con el substrato en que descansan (aire, agua, organismos de la cadena alimentaria, suelo, etc...) muestren un comportamiento tóxico distinto, a veces más virulento. Todo esto enfrenta al analista con formidables problemas de difícil solución, sobre todo si se tiene en cuenta que la cinética de descomposición o transformación afecta a las concentraciones relativas de plaguicida-metabolito. La variabilidad de las cinéticas de transformación confieren importancia a parámetros como la persistencia y acumulación, en relación con los metabolitos y su origen. Por este motivo, tanto la etapa de la aplicación de la técnica analítica para obtener resultados fiables como el adecuado proceso de los datos obtenidos, son muy importantes. Por ello, el estudio de interferencias y su adecuada clasificación exige aplicar un criterio basado en conceptos claros.

Desde la introducción de estas sustancias en la década de 1930, cientos de estos compuestos se han desarrollado para el control de plagas. La mayor parte de los primeros plaguicidas que se utilizaron, eran térmicamente estables y sus residuos en productos alimenticios podían ser fácilmente determinados mediante cromatografía gas-líquido (GLC). Durante los últimos 20 años, ha habido una tendencia al empleo de sustancias que fueran más fácilmente degradables y por tanto menos nocivos para el medio ambiente. Muchos de los nuevos plaguicidas son térmicamente lábiles y no volátiles y por tanto, no pueden ser directamente determinados por GLC. Sin embargo, la cromatografía ha demostrado ser una excelente técnica para la determinación de estos pesticidas, como se pone de manifiesto en el artículo de revisión de Lawrence y Turton (1978).

Además de estos contaminantes ambientales, existe otro amplio grupo de sustancias denominadas hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que se forman por pirólisis o combustión incompleta de productos orgánicos como los combustibles fósiles, carbones, hollín, bitumen, esquistos, petróleo, además de madera, tabaco y otros. Los HAP

presentes en los humos y gases de combustión llegan a la superficie de la tierra a través de la lluvia, alcanzando a las aguas superficiales y subterráneas y, por último, a la cadena alimentaria.

De lo expuesto se deduce que las matrices objeto de análisis de HAP van a ser muy variadas y de muy diferente naturaleza, además, salvo en los crudos petrolíferos y en los productos de combustión donde las concentraciones de los componentes activos son normalmente elevadas, en el resto de las matrices en las cuales se pueden encontrar (aire, aguas, suelos, alimentos, fluidos biológicos, tejidos animales y vegetales, etc.), el análisis de estas sustancias va a ser siempre un análisis de trazas en muestras muy complejas.

Para afrontar los problemas que plantea el análisis de trazas de este tipo de sustancias de interés ambiental que se encuentran transformadas en una muestra extraordinariamente variada y de una composición muy compleja, el analista debe desarrollar metodologías completas que comprendan todas las etapas de análisis, para cada muestra concreta. Es frecuente que el proceso de extracción y purificación de la muestra se convierta en la etapa crítica de un método de análisis, debido a la naturaleza de la matriz.

Con objeto de estudiar el efecto de concentración de estos compuestos en el medio ambiente y para determinar que compuestos muestran efectos residuales mayores en comparación con los que son biodegradables fotoquímicamente, es esencial la identificación y la evaluación cuantitativa de residuos de contaminantes. Por ello, se ha hecho necesario el establecimiento de métodos de análisis suficientemente sensibles como para poder controlar su contenido en las diferentes matrices en las cuales pueden estar presentes (alimentos, aguas subterráneas, suelo, etc.), así como en el medio ambiente.

Entre los métodos instrumentales actualmente en uso, los métodos ópticos basados en la medida de la interacción de la radiación electromagnética con la materia, son de extraordinaria importancia dentro de la Química Analítica por su gran campo de aplicación y avanzado desarrollo de técnicas e instrumentos (Skoog, 1995).

Dentro de los métodos ópticos, los espectroscópicos basados en la emisión molecular reciben el nombre genérico de Métodos luminiscentes e incluyen la Fluorimetría, Fosforimetría y Quimioluminiscencia. En todos estos métodos, las moléculas

de analito son excitadas dando una especie cuyo espectro de emisión suministra información tanto para análisis cualitativo como cuantitativo (Guilbault, 1970; Whery, 1976-1984, Hurtubise, 1990; Baeyens, 1991).

Fluorescencia y Fosforescencia son las dos técnicas analíticas hermanas que se basan en la absorción de energía radiante y posterior emisión de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la incidente pero la diferencia entre ambas estriba en los estados electrónicos excitados implicados en la emisión (Rendell, 1987).

Luego, para entender el fenómeno luminiscente tiene que quedar claro el hecho de que todos los métodos luminiscentes conllevan la detección óptica y el análisis espectral de la luz emitida por una sustancia que sufre una transición desde un estado electrónico excitado a un estado electrónico de energía más baja.

La mayor parte de las moléculas orgánicas contienen un número par de electrones. En el estado fundamental, los electrones van llenando los diferentes orbitales por pares, comenzando con los de más baja energía. Por el principio de exclusión de Pauli, dos electrones en un orbital dado deben tener espines opuestos y el espín total S debe ser igual a cero. Debido a esto, el estado fundamental no tiene un espín electrónico neto y a dicho estado se le ha denominado *estado singlete*.

La excitación de una molécula conlleva normalmente la promoción de un electrón desde los orbitales ocupados más altos, a un orbital que previamente está desocupado (al cual se le denomina, a veces, orbital virtual. Mientras que el estado fundamental es generalmente un singlete, el estado excitado puede ser tanto un estado singlete como un *estado triplete*, dependiendo del estado final del espín del electrón que haya sido promovido al orbital más alto.

La Figura nº 1 muestra un estado fundamental, y dos configuraciones de estados excitados. Los espines de los electrones que se encuentran en los orbitales desocupados ya no están restringidos por el principio de exclusión de Pauli. El estado singlete posee dos espines antiparalelos, mientras que el estado triplete tiene dos espines paralelos y un espín neto S de 1.

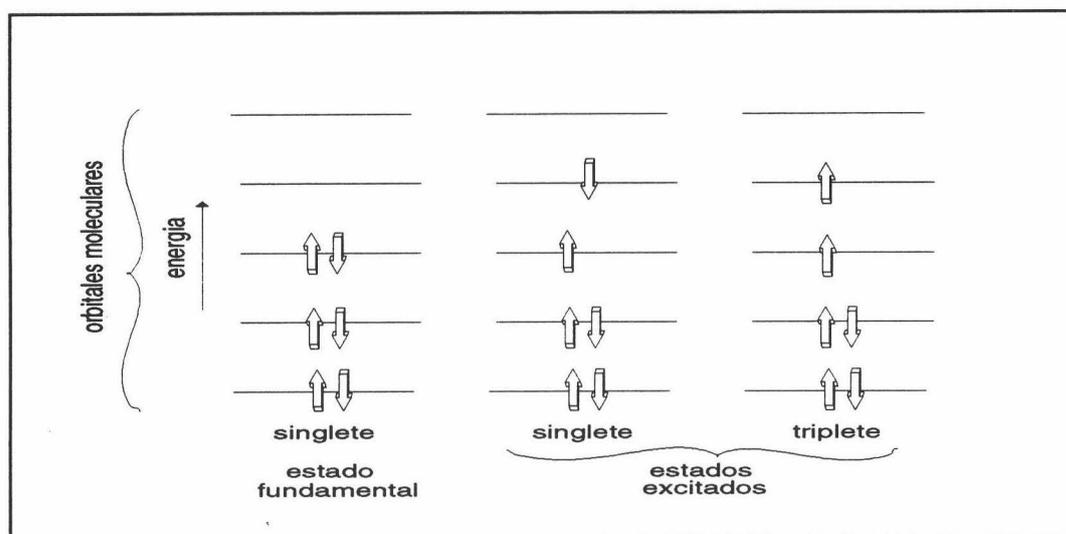


Figura nº 1.- Diagrama esquemático de las disposiciones típicas en orbitales moleculares para los estados fundamental, singlete y triplete.

El diagrama de Jablonskii (ver Figura nº 2) ilustra los distintos mecanismos de desactivación que siguen a la excitación de una molécula a un estado excitado S_n .

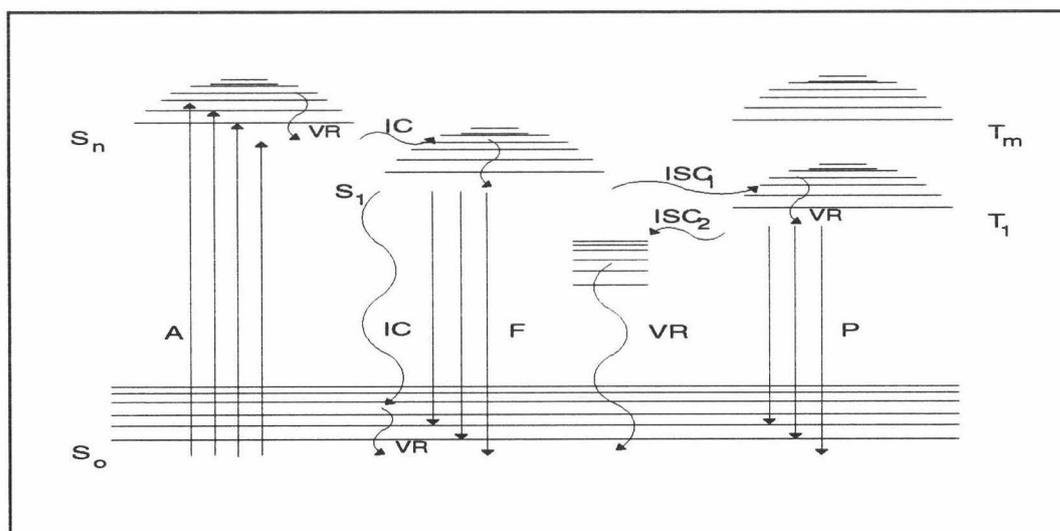


Figura nº 2.- Diagrama de Jablonskii en el que se muestran las diferentes transiciones radiantes y no radiantes en una molécula después de su excitación a un estado singlete S_n (A, absorción; F, fluorescencia; IC, conversión interna; ISC, cruce entre sistemas; P, fosforescencia; VR, relajación vibracional).

Al excitar a una molécula que se encuentra en el estado fundamental S_0 , la energía absorbida promueve saltos electrónicos desde S_0 a algún nivel vibracional de uno de los estados singletes excitados S_n (10^{-15} segundos). La molécula en el estado excitado S_n se desactiva rápidamente (10^{-13} a 10^{-11} segundos), mediante relajación vibracional (VR), hasta los niveles vibracionales más bajos de los correspondientes estados electrónicos excitados, liberando el exceso de energía vibracional como energía térmica. A partir de un estado S_n , la molécula se desactiva rápidamente al nivel vibracional isoenergético de un estado electrónico más bajo (S_{n-1}) mediante un proceso de conversión interna (IC), desactivándose después al estado vibracional más bajo del estado S_{n-1} , por un proceso VR. Mediante sucesivos procesos IC y VR, la molécula se desactivará al primer estado singlete excitado S_1 . Así, una molécula puede ser excitada hasta S_1 o a estados excitados de mayor energía, S_n , dependiendo de la energía de excitación que se utilice, pero la emisión solamente tiene lugar a partir del primer estado electrónico excitado (Regla de Kasha). A partir de un estado S_1 , la molécula puede desactivarse a S_0 , sin emisión de radiación, mediante sucesivos procesos IC y VR, o bien, emitir un fotón sin cambio en la multiplicidad del espín. Esta transición $S_1 \Rightarrow S_0$ es conocida como **Fluorescencia**.

A partir del estado S_1 , la molécula también puede sufrir una transición a algún nivel vibracional del estado triplete por un mecanismo conocido como cruce entre sistemas (ISC_1) que conlleva un cambio en la multiplicidad del espín. Posteriormente, la molécula se relaja hasta el nivel vibracional más bajo, T_1 , mediante sucesivos procesos IC y VR. A partir del estado T_1 , la molécula puede volver al estado fundamental S_0 , bien por un proceso de desactivación no radiante (ISC_2), o por la emisión de un fotón. Esta transición radiante es conocida como **Fosforescencia**. El proceso de cruzamiento entre sistemas inverso va a competir, con frecuencia, con la emisión fosforescente y va a determinar el tiempo de vida de fosforescencia.

El *tiempo de vida de fosforescencia* (τ_p) se define como el tiempo requerido por la emisión para decrecer a $1/e$ de su intensidad original después de un pulso de excitación siendo e la base de los logaritmos neperianos. Si $I_p(t)$ es la intensidad de fosforescencia en el tiempo t e I_p^0 es la intensidad a $t=0$, entonces τ_p viene dado por:

$$I_p(t) = I_p^0 e^{(-t/\tau_p)}$$

Luego, tanto la fluorescencia como la fosforescencia se basan en la absorción de energía radiante y posterior emisión de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la incidente pero la diferencia entre ambas estriba en los estados electrónicos implicados en la emisión, singlete en el caso de la fluorescencia y triplete, en la fosforescencia.

Sin embargo, hay que destacar que las transiciones entre diferentes estados excitados de la misma multiplicidad ($S_n \Rightarrow S_m$ o $T_n \Rightarrow T_m$) ocurren con facilidad, mientras que las transiciones entre estados de diferente multiplicidad están prohibidas según la Mecánica Cuántica, por la regla de selección de espín ($\Delta S=0$).

No obstante, transiciones de espín prohibido, como son las transiciones singlete-triplete, que dan lugar al fenómeno fosforescente, ocurren bajo ciertas condiciones. Esto es posible debido al acoplamiento espín-orbital (S-O) que produce un cambio en la dirección del momento de espín angular del electrón (McGlynn y *col.* 1969) e introduce un cierto componente de carácter singlete en los estados tripletes y viceversa, lo que hace que las transiciones entre ambos estados no estén prohibidas.

Para incrementar las posibilidades de emisión fosforescente de una molécula, será necesario favorecer la velocidad del cruce entre sistemas (ISC) y este proceso está, a su vez, relacionado con el acoplamiento espín-orbital. Este acoplamiento S-O se incrementa al aumentar el número atómico, dado que la magnitud del campo magnético nuclear es directamente proporcional a la carga nuclear y, por tanto, al número atómico.

Por ello, la presencia de especies con átomos pesados en las cercanías de una molécula, como es el caso de compuestos aromáticos que tienen átomos pesados como sustituyentes, incrementan su emisión fosforescente produciendo los siguientes efectos:

1. Disminución del tiempo de vida de fosforescencia.
2. Disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia.
3. Incremento, en general, del rendimiento cuántico de fosforescencia.

Este fenómeno se denomina **efecto de átomo pesado interno** y aunque beneficia las transiciones singlete-triplete radiantes, también afecta a las no radiantes, por lo que no siempre se observa fosforescencia en moléculas que contienen este tipo de átomos.

Sin embargo, fue Kasha (1952) el primero en demostrar la perturbación de la emisión luminiscente por la presencia de un átomo pesado externo, estudiando el efecto de la presencia de yoduro de etilo en la fosforescencia de 1-cloronaftaleno. Este fenómeno se denomina **efecto de átomo pesado externo** y se diferencia del anterior en que los átomos pesados no están unidos químicamente al compuesto de interés (McClure, 1949). Se han propuesto varios mecanismos para explicar este efecto en compuestos aromáticos:

- Un mecanismo de *intercambio*, en el cual, el estado triplete perturbado toma prestada intensidad radiante de una transición de *espín prohibido*, que se localiza normalmente en el átomo pesado perturbador. La extensión de la mezcla de los estados tripletes del átomo perturbador depende del grado de interacción de intercambio entre el par de electrones del estado triplete de la molécula aromática y los electrones asociados con un estado triplete excitado del átomo pesado perturbador (Robinson, 1967).
- Un mecanismo de *transferencia de carga* (CT), que conlleva la interacción de los estados tripletes excitados con los estados singletes excitados de transferencia de carga, del complejo compuesto aromático-átomo pesado perturbador (Murrell, 1960; Tsubonura y Mulliken, 1960).

Otro factor importante a tener en cuenta en la observación de la emisión luminiscente es el **efecto de la molécula de oxígeno**. El oxígeno es uno de los atenuadores del estado triplete más eficaz (Birks, 1970) tanto que este fenómeno ha sido propuesto como método para monitorizar la difusión del oxígeno y del aire en varios materiales (Czarnecki y Kryszewski, 1963; Yi-Ming, 1994).

Los principales efectos del oxígeno en los compuestos aromáticos son los siguientes:

1. Disminución de la intensidad de fluorescencia.
2. Disminución del tiempo de vida de fosforescencia.
3. Reducción del rendimiento cuántico de fluorescencia.
4. Aparición de algunas bandas de absorción debidas a complejos de transferencia de carga.
5. Incremento en la absorción $T \Rightarrow S$.

Hay varios modelos teóricos para explicar el efecto del oxígeno en la fosforescencia. Así, este efecto ha sido tratado como una interacción de intercambio intermolecular (McGlynn y *col.*, 1969) o como un mecanismo por el cual el aumento en la intensidad de absorción $T_1 \Rightarrow S_0$ proviene de una transición de transferencia de carga del complejo compuesto aromático- O_2 (Murrell, 1960). Posteriormente, Kawaoka y *col.* (1967) realizaron un estudio teórico del proceso de atenuación de un estado triplete T_1 de una molécula por el oxígeno y concluyeron que el mecanismo más probable es la desactivación de la molécula desde el estado T_1 a su estado singlete fundamental, mientras que el oxígeno va desde su estado triplete fundamental a un estado singlete excitado.

La atenuación o **fenómeno de quenching** por parte del oxígeno se observa tanto en la emisión fluorescente como fosforescente aunque la disminución de la intensidad de emisión es más drástica en la fosforescencia debido a que el tiempo de vida media del estado triplete es mayor que el del estado singlete. El mecanismo de *quenching* colisional puede ser descrito por la siguiente ecuación de Stern-Volmer:

$$I/I_0 = 1 + K_Q \tau [Q]$$

donde I e I_0 son las intensidades de luminiscencia en ausencia y presencia del atenuador Q en una determinada concentración, respectivamente. La relación anterior muestra que para un proceso de *quenching* dado, con una velocidad K_Q , tanto τ como $[Q]$ deben ser grandes, para que la atenuación afecte a la intensidad de emisión en una extensión significativa. Luego, de todo esto se deduce que el oxígeno es un *quencher* o atenuador muy eficaz y puede originar serios problemas en la práctica de la fosforescencia, desde el punto de vista analítico (Hinze, 1984).

Existen distintos métodos para la desoxigenación de las muestras pero el empleado durante más tiempo ha sido la purga con nitrógeno, aunque este procedimiento causa graves problemas de formación de espuma y por ello es lento y trabajoso. Hunter y Szczepanski (1984) describieron recientemente un método para preparar disoluciones en atmósfera libre de oxígeno que consiste en utilizar un recipiente hermético provisto de guantes para el trabajo desde el exterior y sometido a un flujo de nitrógeno. Éste y otros métodos de desoxigenación descritos, como el de congelación-descongelación de las muestras, son todos incómodos y poco prácticos.

Recientemente Díaz García y Sanz-Medel (1986) propusieron un método de desoxigenación química muy efectivo que consiste en emplear sulfito sódico como desoxigenante. Dicha desoxigenación está basada en la siguiente reacción:



que es rápida a pH neutro o alcalino, permitiendo la observación de fosforescencia de distintos compuestos a temperatura ambiente y sin necesidad de precauciones especiales.

Desde un punto de vista analítico, aunque el papel real del oxígeno aún es un tema de investigación, su efecto de atenuación no es crítico si se emplean sustratos sólidos para la observación de la fosforescencia, pudiéndose observar señales de fosforescencia muy intensas en presencia del aire ambiental, siempre que este seco. Sin embargo, como se verá más adelante, para la observación de la fosforescencia en disolución a temperatura ambiente se requiere un buen control del proceso de desoxigenación para mostrar señales de fosforescencia significativas.

De todo lo expuesto hasta el momento se puede deducir que los métodos luminiscentes presentan una serie de ventajas frente a otros métodos ópticos e, incluso, frente a otros métodos instrumentales. Entre estas ventajas se pueden destacar:

- La sensibilidad inherente, con límites de detección que suelen ser tres órdenes de magnitud más pequeños que otros métodos espectroscópicos de absorción, por lo que se obtienen límites del orden de ng/ml.
- Su intervalo lineal de concentraciones, también superior a otros métodos espectroscópicos de absorción.
- Su selectividad, generalmente superior a otros métodos de absorción.

La fosforescencia es una técnica complementaria de la fluorescencia y así, muchos compuestos orgánicos que tienen un rendimiento cuántico de fluorescencia bajo por experimentar una eficaz desactivación por cruce entre sistemas, pueden ser detectados por fosforimetría.

Sin embargo, la fosforescencia presenta ciertas ventajas con respecto a la fluorescencia desde el punto de vista analítico. Intrínsecamente, posee en general, una

mayor selectividad que la fluorescencia, dado que no todas las moléculas que presentan fluorescencia son fosforescentes, lo que conlleva una disminución en el número de posibles interferencias en un determinado método de análisis. Por otra parte, ya se ha mencionado que la emisión de fosforescencia aparece a longitudes de onda mayores que la fluorescencia y esto, se traduce, asimismo, en una mayor selectividad de la fosforescencia con respecto a la fluorescencia, dado que la emisión va a aparecer en una región espectral en la que hay menos posibilidades de que se produzca emisión por parte de posibles interferencias. Actualmente, el número de métodos fluorimétricos es significativamente mayor que el número de aplicaciones de los procedimientos de fosforescencia.

La fosforimetría se ha desarrollado de distintas formas (ver Figura nº 3). Desde el desarrollo del primer fosforímetro en 1858 por Becquerel, las señales de fosforescencia había que obtenerlas de disoluciones enfriadas con líquidos o aire (Dewar, 1894) lo cual presentaba grandes inconvenientes relacionados con la introducción del tubo de muestra dentro del vaso Dewar de cuarzo que contenía nitrógeno líquido, a pesar de que las sensibilidades y selectividades de esta técnica de **fosforescencia a baja temperatura (LTP)** eran excelentes.

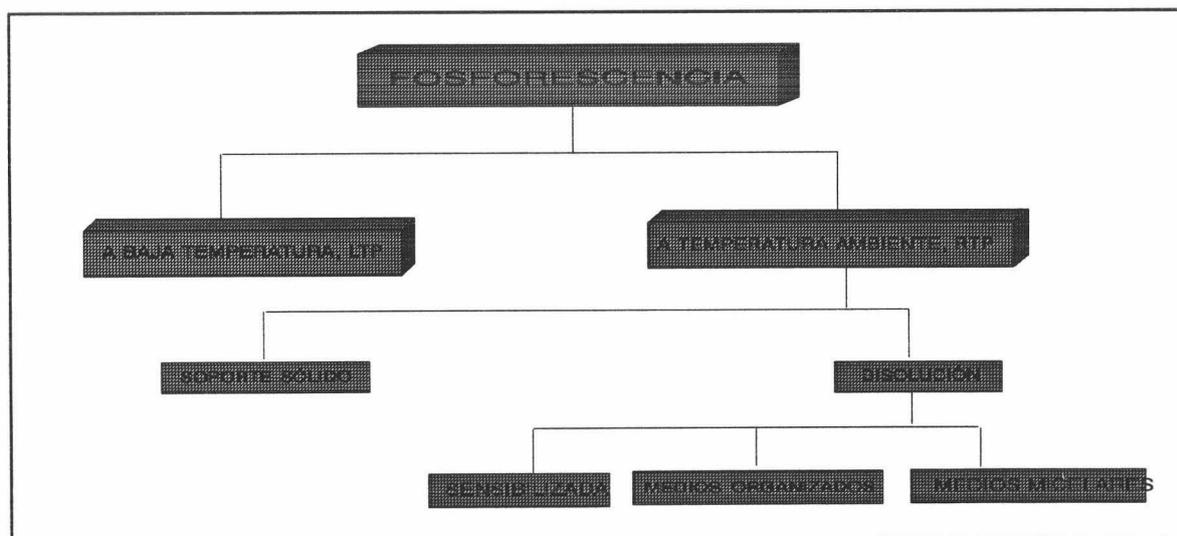


Figura nº 3.- Alternativas en el análisis fosforimétrico.

A pesar de todos estos intentos, el primer trabajo sobre fosforescencia cuantitativa no apareció hasta 1957 (Kiers y col.) y la mayoría de las aplicaciones cuantitativas

aparecieron en la literatura a partir de 1962 (Freed y Vise, 1962; McGlynn y *col.*, 1963; Winefordner y Latz, 1963). Fue el grupo de trabajo del Prof. Winefordner de la Universidad de Florida el que estableció las bases de la fosforescencia a baja temperatura, desarrollando multitud de aplicaciones a muestras complejas durante los años 1965 a 1974. Luego, en la década de los 60, la mayor parte de las aplicaciones fosforimétricas usaban disolventes rígidos a baja temperatura (77 K) y la necesidad de utilizar estas condiciones criogénicas ha sido una de las principales limitaciones de la fosforimetría convencional.

Fue concretamente en 1975 cuando Aaron y Winefordner revisaron la fosforimetría a baja temperatura en términos de teoría, instrumentación y aplicaciones indicando Ward y *col.* (1981) en una revisión sobre fosforimetría que desde 1975 son muy pocos los trabajos publicados en este campo.

Un avance significativo en la generación de fosforescencia fue la introducción por Roth en 1967 de la **fosforescencia a temperatura ambiente (RTP)**. Esta técnica se ha convertido en un método práctico de detección de numerosos compuestos orgánicos y consiste en adsorber los compuestos sobre materiales sólidos dando lugar a la llamada fosforescencia a temperatura ambiente en **sopORTE sólido** o **RTP en soporte sólido** como el papel de filtro, gel de sílice, acetato sódico, polímeros y diversos compuestos inorgánicos (Hurtubise, 1981; Vo-Dinh, 1984). Este procedimiento consiste en hacer incidir la fuente de radiación sobre la matriz sólida y registrar la fosforescencia de las moléculas adsorbidas. La radiación de la fuente y la radiación luminiscente emitida es reflejada de la superficie del material sólido y también puede transmitirse a través de éste (Wendlandt y Hecht, 1966). La diferencia entre la fosforescencia en superficie sólida y en disolución es que las moléculas son adsorbidas sobre pequeñas partículas mientras que en disolución las moléculas están disueltas en un disolvente.

Hasta los trabajos de Schulman y Walling (1972, 1973) no se reconoció el potencial de la fosforescencia a temperatura ambiente sobre soporte sólido. Desde entonces, han aparecido numerosos estudios y el fenómeno de la RTP en soporte sólido ha sido estudiado en profundidad (Hurtubise, 1981; Vo-Dinh, 1984; Ramis Ramos, 1988).

El papel de filtro es la superficie sólida más usada para obtener RTP a partir de compuestos adsorbidos (García Sánchez y Cruces Blanco, 1988; Pal, 1992; Júnior, 1995;

Ai-Jun, 1996). Este papel de filtro ha sido tratado con diferentes medios para mejorar las características de la emisión fosforescente. Así, el empleo de ciclodextrinas (CD's) en la fosforescencia del antraceno (Vo-Dinh y Alak, 1987), compuestos poliaromáticos y heterocíclicos en presencia de talio o plomo, como átomos pesados (Alak y *col.* 1988, 1989), el 1-naftol y 2-naftol con α - y β -ciclodextrinas en presencia de NaCl o NaBr (Hurtubise, 1989).

Luego, a la vista de estas publicaciones se deduce que la obtención de fosforescencia a temperatura ambiente en soporte sólido con papel de filtro puede ser incrementada por el tratamiento de la superficie con mezclas de medios organizados y átomos pesados como es el caso de mezclas al 80% de α -CD/NaCl (Bello y Hurtubise, 1986a, 1986b, 1987, 1988a, 1988b y 1988c), mezclas al 1% α -CD/NaCl (Richmond y Hurtubise, 1989a) o mezclas al 30% β -CD/NaCl (Richmond y Hurtubise, 1989b).

A pesar de las buenas características de sensibilidad que se obtienen con los procedimientos de fosforescencia a temperatura ambiente en soporte sólido existe la limitación de que no puede usarse en sistemas dinámicos tales como análisis por inyección en flujo o cromatografía líquida de alta resolución. Este problema se ha visto soslayado con el desarrollo de varios procedimientos para obtener **fosforescencia a temperatura ambiente en disolución**. Dada la importancia y el auge de los métodos de análisis dinámicos, la obtención de fosforescencia en disolución, a temperatura ambiente, es un campo de investigación de gran actualidad (Panadero, 1994).

Hasta hace poco tiempo, la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución sólo se podía observar bajo condiciones muy especiales (Parker y Hatchard, 1962) o para un número de moléculas muy pequeño, entre las cuales se puede destacar el biacetilo (Donkerbroek y *col.*, 1983).

Dokenbroek y *col.*, (1981, 1982, 1983) demostraron el potencial analítico de un modo de fosforescencia a temperatura ambiente que denominaron **fosforescencia sensibilizada**. En ella el analito se detecta indirectamente por la fosforescencia emitida por un aceptor que debe tener un rendimiento cuántico alto en disoluciones líquidas y un triple estado de baja energía. Después de la excitación, el analito actúa como un donador de energía (D) cediendo la energía a un aceptor A. Este hecho tiene lugar debido a que el

triple estado del aceptor es de menos energía que el del donador, produciéndose una transferencia de energía triplete-triplete desde el donador (analito de interés) al aceptor, generalmente biacetilo o 1,4-dibromonaftaleno.

En estas condiciones, la energía transferida en este proceso compite con otras muchas desactivaciones. Para incrementar la reacción de transferencia de energía en el modo de fosforescencia sensibilizada de biacetilo, se ha propuesto el empleo de distintos medios micelares como dodecilsulfato sódico (SDS) o ciclodextrinas (CD's) para incrementar la fosforescencia de especies como los hidrocarburos aromáticos polinucleares o compuestos heterocíclicos nitrogenados (Donkerbroek, 1982; De Luccia y Cline Love, 1984, 1985; Blyshak, 1990).

En los últimos años, los llamados **medios organizados** o **medios ordenados** han llegado a ser una herramienta particularmente valiosa en la metodología analítica debido a su habilidad para organizar los analitos a un nivel molecular. Estos agregados moleculares son estructuras químicas microscópicas que bajo condiciones específicas, se aproximan a las características de disoluciones fluidas homogéneas. En una estructura organizada, generalmente se encuentran dos regiones de distinta polaridad y como resultado, pueden unirse y/o compartimentar analitos, dependiendo de la polaridad. En disolución acuosa, la unión se traduce en que el analito está protegido de aquellos componentes que se encuentran en el disolvente acuoso. En muchos casos, las solubilidades acuosas de especies hidrofóbicas aumentan debido a este proceso de complejación.

El uso de medios organizados ha surgido recientemente como otro modo de observar la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución mediante la formación de **complejos de inclusión**. Los complejos de inclusión son compuestos moleculares con unas características estructurales en las cuales un compuesto, denominado *molécula huésped* engloba espacialmente a otra molécula denominada *molécula invitada*.

Dentro del tipo de moléculas huésped que forman estos compuestos se pueden destacar sistemas de polisacáridos como las zeolitas, sílice, arcillas, poliazúcares como las ciclodextrinas, almidón y celulosa o unidades de polímeros cíclicos sintéticos como los éteres corona o calixarenos (Szejtli, 1982; McIntire, 1990).

Este tipo de complejos tiene la particularidad de atrapar o acomplejar tanto a moléculas grandes como pequeñas, dependiendo del tamaño de su cavidad. La formación de un complejo de inclusión es similar a la solubilización dinámica de moléculas en las micelas. La diferencia entre estos compuestos con respecto a las micelas es que en ellos existen cavidades de dimensiones determinadas que van a hacer que exista una selectividad de tamaño y forma de los solutos con respecto a las moléculas que pueden ser incluidas. La estabilidad de los complejos de inclusión formados con ciclodextrinas depende de factores como los enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, efectos del disolvente y tamaño y forma de las moléculas.

Uno de los medios organizados más utilizados son las ciclodextrinas (CD's). Éstas son moléculas rígidas que se comportan como anfitriones moleculares en la formación de complejos de inclusión (Fendler, 1984). Éstas poseen forma de toroide debida a la conformación tipo C1 de los residuos individuales de glucosa y sus enlaces en posición α -1,4 (Fendler, 1984; Bender y Komiyama, 1978; Szejtli, 1982; Saenger, 1980). Las tres ciclodextrinas más útiles analíticamente se componen de 6, 7 y 8 unidades de glucosa y se denominan α -, β - y γ -ciclodextrinas, respectivamente y sus estructuras químicas se representan en la Figura n° 4.

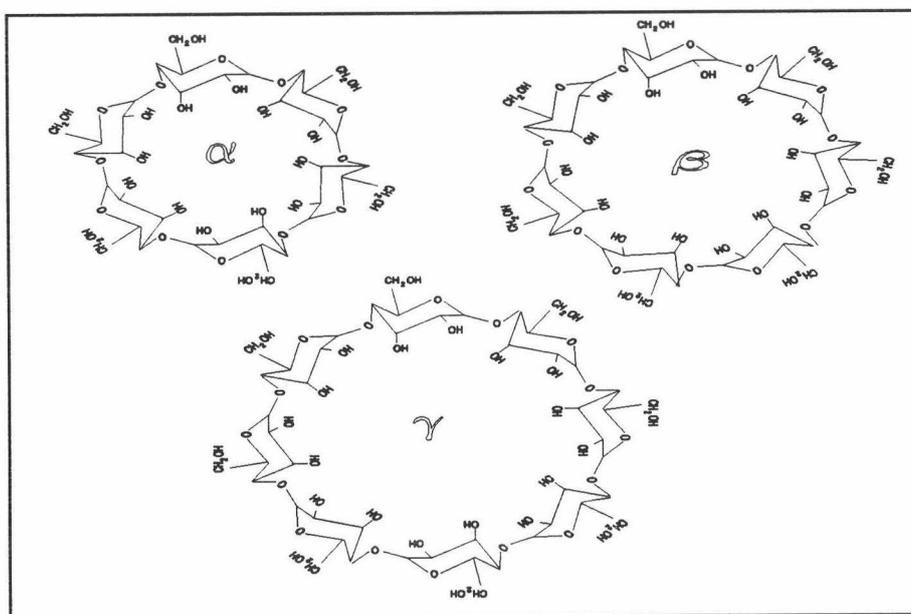


Figura n° 4.- Estructuras de α -, β - y γ -ciclodextrinas

Los diámetros de las cavidades de estos oligosacáridos cíclicos, se reúnen en la Tabla n° 1, y dependen del número de unidades de glucosa que componen cada ciclodextrina. Otros datos físicos adicionales de las ciclodextrinas se dan igualmente en la Tabla n° 1.

Tabla n° 1.- Datos físicos sobre ciclodextrinas

Datos físicos	α	β	γ
Peso molecular	972'8	1135	1297
Diámetro de la cavidad en Å	6'0	8'0	10'0
Volumen de la cavidad en Å ³	176	346	510
Solubilidad en agua en g/100 ml	14'5	1'85	23'2
Número de moléculas de agua incluidas	6	11	17

Los grupos hidroxílicos primarios y secundarios de la ciclodextrina están localizados en los extremos opuestos de la cavidad, y los puentes de oxígeno glicosídico que revisten la cavidad interior dan a la molécula de CD, dos regiones de diferente polaridad (Bender y Komiyama, 1978; Szejtli, 1982; Saenger, 1980). Los grupos hidroxílicos aumentan la naturaleza hidrofílica del exterior de la ciclodextrina, en consecuencia, estas moléculas son bastante solubles en agua. Por el contrario, el interior de la ciclodextrina es apolar, debido a la alta densidad electrónica de los puentes de oxígeno. La naturaleza no polar de la cavidad, les hace ser un medio atractivo para especies moleculares hidrofóbicas.

La sustitución del agua de gran energía por un compuesto hidrofóbico se favorece porque la tensión del anillo disminuye cuando el "invitado" restituye su normal configuración de puentes de hidrógeno intramoleculares. Así, la complejación proviene de varios factores que incluyen la disminución de la tensión del anillo después de la inclusión de una molécula invitada y la expulsión de las moléculas de agua altamente energéticas, de la cavidad (Bender y Komiyama, 1978; Szejtli, 1982; Saenger, 1980). Aún cuando no se formen enlaces covalentes durante el proceso de complejación, pueden ocurrir interacciones de Van der Waals y pueden darse enlaces por puentes de hidrógeno entre la ciclodextrina y la molécula incluida.

El grado de complejación entre la molécula huésped e invitada se corresponde fuertemente con la compatibilidad del tamaño de la cavidad de la ciclodextrina con el tamaño y forma del invitado potencial.

La estequiometría es asimismo una consideración importante cuando se examinan estos complejos de inclusión. Se han observado estequiometrías diferentes a la 1:1. Entre los diferentes casos que se dan en disolución acuosa, se encuentran los complejos de estequiometría 1:2, en los cuales dos moléculas de analito residen en una cavidad de la ciclodextrina, así como complejos de estequiometría 2:1 en los cuales dos moléculas de ciclodextrina encapsulan una molécula de analito (Szejtli, 1982 y Armstrong y *col.*, 1986). También pueden formarse complejos ternarios, en los cuales dos compuestos diferentes se incluyen en la cavidad de una misma ciclodextrina.

Todo este proceso de formación de los complejos de inclusión da lugar a la intensificación de los procesos luminiscentes debido a que las moléculas que se introducen en la cavidad interna de las ciclodextrinas se aíslan del ambiente que las rodea y sus estados excitados están más protegidos de los procesos de *quenching* de la luminiscencia, así como de otros procesos de desactivación no radiante que ocurren en disolución. La inclusión causa restricción en la movilidad molecular y/o alteraciones en la polaridad local.

Fueron Cline Love y *col.* (Scypinski y Cline Love, 1984a y 1984b; Cline Love y *col.*, 1985; Femia y Cline Love, 1986) los primeros en obtener RTP de compuestos que no contenían átomos pesados en su estructura, al incluirlos en ciclodextrinas, utilizando 1,2-dibromoetano como átomo pesado externo. Las señales de fosforescencia de varios hidrocarburos aromáticos polinucleares, heterociclos nitrogenados y diversas drogas, fueron atribuidas a la formación de un compuesto ternario entre la ciclodextrina el bromoalcano y el compuesto de interés. Las disoluciones presentaban una cierta turbidez, debido a la alta concentración de 1,2-dibromoetano utilizada (0'58 M).

De una manera similar, se ha observado RTP de acenafteno incluido en β -ciclodextrina, en presencia de bromoalcoholes, como 2-bromoetanol o 2,3-dibromo-1-propanol previa desoxigenación mediante paso de nitrógeno (Hamai, 1989) o utilizando sulfito sódico (Muñoz de la Peña y *col.*, 1991). Tabushi y *col.* (1977) también usaron una β -ciclodextrina modificada, con un grupo de benzofenona como sustituyente, y obtuvieron

asimismo fosforescencia de 1-bromonaftaleno. Muñoz de la Peña y *col.* (1993) han obtenido señales de fosforescencia de dos naftalenos sustituidos, ácido 1-naftiloxiacético y ácido 1-naftilacético.

Otro modo de obtener fosforescencia a temperatura ambiente en disolución es mediante la adición a la disolución de la sustancia objeto de análisis de un **agente micelar** o **surfactante** que si se añade a concentraciones superiores a un valor característico denominado concentración micelar crítica (c.m.c.) forma unos agregados anfifílicos denominados **micelas**. Los agentes micelares son sustancias anfifílicas que poseen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas en su molécula, siendo la combinación de ambas tendencias la causa determinante de las propiedades únicas de estos agentes en disolución.

El hecho de que se produzca la agregación de las moléculas de surfactante para formar las micelas se debe a que poseen una estructura de tipo R-X donde R es una cadena hidrocarbonada, frecuentemente lineal, de 8 a 18 átomos de carbono, siendo X un grupo polar o iónico denominado *cabeza* y R la cadena no polar e hidrofóbica denominada *cola*. La existencia del grupo polar de cabeza unido al grupo de cola no polar hace que la molécula posea tanto grupos polares como apolares. Estos agregados se encuentran en un equilibrio dinámico con las moléculas o iones individuales a partir de los que se han formado.

Dependiendo de la naturaleza del grupo de cabeza polar, los agentes micelares se pueden clasificar en: catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros. Además, según el tipo de surfactante, las micelas se formarán con un número diferente de moléculas de agente micelar y a esto se le denomina número de agregación. En la Tabla nº 2 se recogen algunos ejemplos de los agentes micelares más utilizados en Química Analítica (Pelizzetti y Pramauro, 1985). Otro tipo menos común, de agentes micelares son aquellos en que a una única cabeza polar se unen dos "colas" hidrocarbonadas lo que puede conferirles propiedades especiales.

La característica principal de los agentes micelares es su capacidad de autoasociación, tanto en disolución acuosa como en medios apolares, formando grandes agregados de dimensiones coloidales y estructura definida. El tipo de agregado que se forma depende tanto de la estructura del agente micelar como del medio dispersante. La

Tabla nº 2.- Agentes micelares más utilizados en química analítica.

Fórmula	Tipo	Abreviatura	c.m.c (mM)	Carácter
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{X}^-$	Bromuro de cetiltrimetil amonio	BrCTA	0'92	Catiónico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15} \text{N}^+ \text{C}_5\text{H}_5 \text{X}^-$	Bromuro de cetilpiridinio	BrCP	0'9	Catiónico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2 \text{C}_6\text{H}_5 \text{Cl}^-$	Cloruro de tetradecildimetilbenzil amonio	Zefilramina	-	Catiónico
$(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2^+ \text{Cl}^-$	Cloruro de dioctadecildimetil amonio	DODAC	-	Catiónico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$	Dodecil sulfato sódico	SDS	8	Aniónico
$(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{OCO})_2\text{CHSO}_3^- \text{Na}^+$	Bis(2-etilhexil)sulfosuccinato sódico	Aerosol OT	0'6	Aniónico
$(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{O})_2\text{PO}_2^-$	Dihexadecil fosfato	DHP	-	Aniónico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$	Polioxietileno(23)dodecanol	Brij 35	0'06	No iónico
$(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{CH}_2)_4 \text{C}_6\text{H}_4 (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{9,5}\text{OH}$	Polioxietileno(9'5)p-terocetil fenol	Triton X-100	0'24	No iónico
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_2^+ (\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$	4-(Dodecildimetil amonio) butirato		-	Anfótero
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_2^+ (\text{CH}_2)_3\text{OSO}^-$	3-(dodecildimetil amonio) propano-1-sulfonato	SB-12	-	Anfótero

formación de dichos agregados ocurre al superarse su c.m.c y por debajo de la cual el agente micelar se encuentra en forma de monómeros. En la Figura n° 5 se ilustran los tipos de agregados que puede formar un agente micelar en disolución acuosa, en función de su concentración: los agentes micelares con una sola cadena hidrocarbonada, tanto catiónicos como aniónicos, no iónicos o anfóteros, forman "micelas". La estructura de una micela es aproximadamente esférica a bajas concentraciones de agente micelar y elipsoidal a altas concentraciones o en presencia de electrolitos (Pelizzetti y Pramauro, 1985).

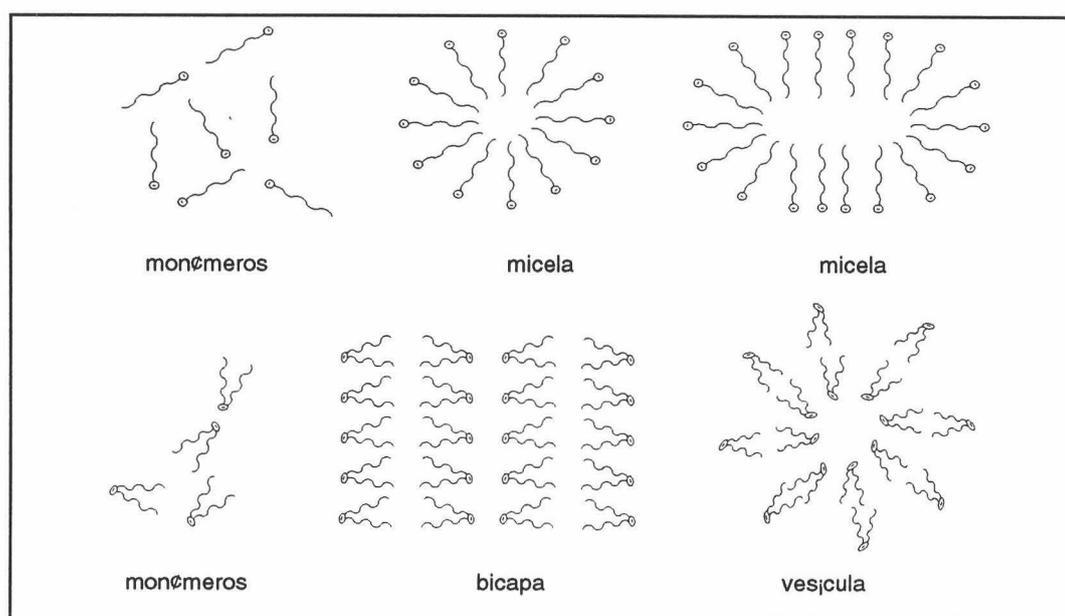


Figura n° 5.- Formación de agregados en disolución acuosa.

En una micela, los grupos polares están dirigidos hacia la fase acuosa y en contacto con ella, mientras que la cola del agente micelar está dirigida hacia el interior de la micela formando el núcleo no polar o hidrófobo. Los agentes micelares con dos "colas" (Figura n° 5) cuando se asocian en disolución acuosa no forman micelas clásicas sino "bicapas" o vesículas" (Thomas, 1980). La estructura de una vesícula se asemeja a dos esferas circunscritas con los grupos no polares formando una especie de doble capa que es no polar en su interior y polar en las dos caras externas. A este tipo de micelas el las cuales los agregados poseen el grupo iónico de cabeza hacia fuera y la cola no iónica hacia dentro se denominan **micelas normales**.

En medios diferentes al agua como orgánicos o acuo-orgánicos, los agentes micelares pueden formar dos tipos de estructuras, las micelas inversas y las microemulsiones. Las **micelas inversas** son agregados de moléculas de surfactante que se forman en disolventes no polares de una forma invertida, es decir, con los grupos polares de cabeza están orientados hacia el interior del agregado y las colas hidrofóbicas hacia fuera en contacto con el disolvente. Este tipo de micelas pueden solubilizar agua en su interior y la cantidad de agua presente en este centro de la micela va a influir mucho en el tamaño y características de estos agregados (ver Figura nº 6).

Las **microemulsiones** son mezclas homogéneas de agua y un compuesto orgánico apolar que se forman en presencia de grandes cantidades de un surfactante y un co-surfactante, normalmente un alcohol de tamaño mediano con un grupo alquilo de 4 a 8 carbonos (ver Figura nº 6). Es decir, microemulsiones son dispersiones homogéneas de gotas muy pequeñas de agua en compuesto polar (W/O) o de compuesto polar en agua (O/W). Las primeras contienen un interior o corazón acuoso y son similares a las micelas inversas. En cambio, las microemulsiones de compuesto polar en agua contienen un interior o corazón de hidrocarburos muy apolar y son similares a las micelas normales.

La gran ventaja de las microemulsiones con respecto a las micelas normales es que el carácter altamente hidrofóbico de su interior es muy adecuado para disolver moléculas hidrofóbicas a altas concentraciones (Ramis Ramos, 1988) e, incluso, moléculas orgánicas de gran tamaño con dimensiones que se aproximen a las de las micelas.

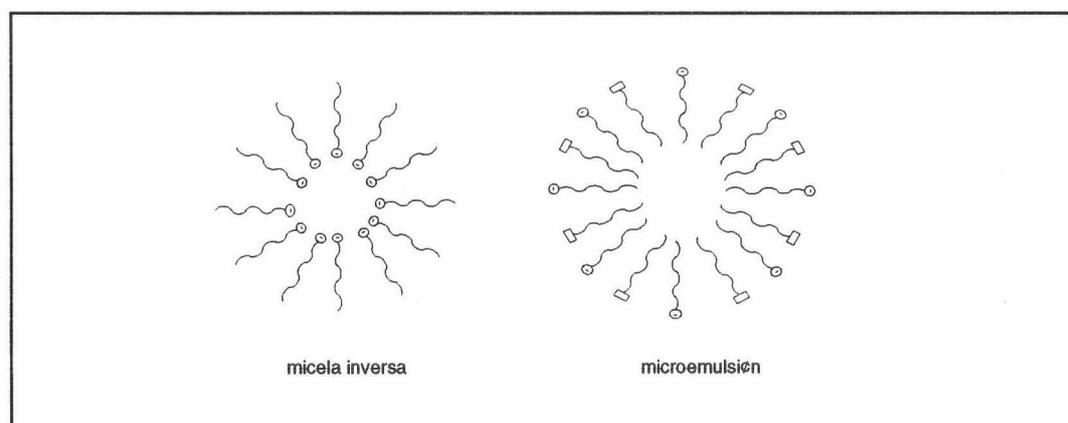


Figura nº 6.- Esquema de una micela inversa y una microemulsión.

Una micela está formada por un número aproximadamente fijo de monómeros del agente micelar (normalmente entre 60 y 100 monómeros dependiendo del agente micelar) llamado número de agregación. La concentración de monómeros del agente micelar en equilibrio con las micelas es aproximadamente constante e igual a la c.m.c. (Cline Love y col., 1984) .

Así, un incremento en la concentración de agente micelar por encima de la c.m.c. conduce a un incremento en el número de micelas en disolución sin modificarse sustancialmente la concentración de monómeros libres. La concentración de micelas en disolución acuosa puede calcularse entonces por la fórmula:

$$\text{Micelas} = \frac{C_T - c.m.c.}{N}$$

donde C_T es la concentración total del agente micelar (monómeros) considerada y N el número de agregación del mismo. La formación de micelas es el resultado de dos fuerzas primarias: por un lado las repulsiones entre las cadenas hidrocarbonadas y el medio acuoso y por otro las atracciones de Van der Waals entre dichas cadenas.

Otros dos tipos de interacciones secundarias que se han de tener en cuenta cuando se forma una micela son: la repulsión entre los grupos cabeza (cuando éstos son iónicos) y el efecto positivo de los contraiones del agente micelar disminuyendo dichas repulsiones. Por tanto, los factores que determinan el valor de la c.m.c. de un agente micelar, su número de agregación, el tamaño de la micela, etc. son la longitud de la cadena hidrocarbonada, el tamaño y estructura del grupo cabeza, la naturaleza del contraión, la presencia de electrolitos y de otras sustancias anfifílicas, etc., además de la temperatura, ya que todos estos factores influyen sobre alguna o varias de las interacciones antes mencionadas.

Durante mucho tiempo las micelas han sido consideradas como un núcleo hidrófobo rodeado de una corteza polar. Hoy en día hay bastante discrepancia acerca del nivel de penetración del agua en la micela (Fendler, 1982). Hay autores que proponen una penetración entre 2 y 4 átomos de carbono (Thomas, 1980) aunque ha habido sugerencias de una penetración más profunda del agua en el núcleo no polar (Menger, 1979).

Por medidas de fluorescencia polarizada se ha observado que el núcleo micelar se asemeja a un hidrocarburo líquido, con microviscosidades elevadas (entre 10 y 30 cP (Thomas, 1977)) y, por otro parte, las cadenas hidrocarbonadas presentan un grado de orden mayor que el alcano del mismo número de átomos de carbono (Kalyanasundaran y Thomas, 1976).

Según distintos experimentos llevados a cabo en medios micelares (Resonancia Magnética Nuclear y Dispersión de Neutrones fundamentalmente), Dill y *col.* (1984) han comparado diversos modelos teóricos de estructura micelar demostrando que el núcleo micelar se compone exclusivamente de segmentos de cadena hidrocarbonada distribuidos al azar con las únicas condiciones de la continuidad de la cadena y los impedimentos estéricos. Otros modelos deducidos para una distribución radial más o menos estática de las cadenas hidrocarbonadas o una penetración significativa de agua en el núcleo micelar no se ajustan a los resultados experimentales referidos (Dill y *col.*, 1984).

En consecuencia, el concepto actual sobre la estructura y características de las micelas está basado en estas predicciones de la teoría de las interfases y establece tres postulados o puntos básicos:

1. Existe un núcleo micelar hidrófobo prácticamente seco, pero rodeado de grupos polares.
2. Las cadenas hidrocarbonadas en la micela muestran una distribución aleatoria y desordenada, siendo los condicionamientos estéricos y la simple continuidad de la cadena los factores que determinarían la estructura micelar.
3. Debido al elevado desorden de las cadenas hidrocarbonadas, se produce una *exposición* o contacto importante entre las partes hidrófobas de la micela y el agua de la disolución en la interfase núcleo/superficie de la micela.

En resumen, se trata de un concepto de micela densa, desordenada y dinámica con un núcleo seco y un considerable contacto de las cadenas hidrocarbonadas móviles con el agua en la zona superficial (Dill y *col.*, 1984).

En lo que se refiere a la superficie micelar, en el caso de micelas iónicas, un alto porcentaje de los grupos cabeza están ionizados (aproximadamente un 20%) (Thomas, 1980) existiendo posibilidades de intercambio iónico con otros contraiones de la

disolución. La constante dieléctrica en la superficie micelar se ha medido utilizando solutos que se fijan en ella y que son muy sensibles al microentorno (pruebas de fluorescencia) obteniéndose valores de ϵ entre 32 y 35 (Mukerjee, 1979), muy inferiores al valor de 80, típico de la fase acuosa, pero superiores a los valores de la constante dieléctrica de los alcanos correspondientes.

Sin duda alguna, la propiedad más importante es su poder solubilizante sobre especies poco solubles o insolubles en fase acuosa tales como hidrocarburos, reactivos neutros, etc. El proceso de solubilización micelar es un proceso dinámico donde el soluto está en equilibrio entre la micela y la fase acuosa (Pelizzetti y Pramauro, 1985). Para una buena solubilización, el soluto ha de estar estadísticamente la mayor parte del tiempo en el interior o en la superficie micelar (Thomas, 1980), pudiendo hablar de "tiempos medios de residencia" del soluto en la micela. Dependiendo de las posibles interacciones electrostáticas o hidrófobas de un soluto con las micelas, pueden existir distintos lugares "preferentes" de solubilización (Hinze y *col.*, 1984). Así, un soluto poco polar se situará preferentemente en las proximidades del núcleo micelar en tanto que un soluto anfifílico estará colocado en las cercanías de la superficie y un soluto iónico, cuya carga sea contraria a la de los grupos cabeza del agente micelar, se fijará preferentemente sobre la superficie micelar.

Una segunda propiedad importante de los medios micelares es su capacidad para concentrar o separar reactivos: la solubilización selectiva de reactivos en la micela los acerca respecto a su situación en la disolución acuosa por tanto se favorecen reacciones que en la fase acuosa eran lentas.

La tercera propiedad de las micelas es el hecho de alterar el microentorno del soluto solubilizado en las mismas. Propiedades tales como acidez, viscosidad, coeficiente dieléctrico, polaridad, etc. cambian sustancialmente de la micela a la fase acuosa con la consecuencia inmediata de cambios en los equilibrios, en las propiedades espectrales y en la reactividad del soluto solubilizado (Hinze y *col.*, 1984).

El estudio de las propiedades espectrales, de absorción, fluorescencia y fosforescencia, de distintas moléculas orgánicas en medios micelares permite obtener una información muy valiosa sobre las propiedades básicas de tales sistemas micelares.

En general el microentorno micelar suele ofrecer una protección especial de los estados excitados (singulete y triplete) de una molécula frente a procesos de "quenching" o desactivación no radiante. El resultado de esta propiedad o característica de tipo general es que se han observado grandes aumentos en los rendimientos cuánticos luminiscentes (fluorescencia y fosforescencia) en el seno de un medio micelar (Cline Love y *col.*, 1984; Hinze y *col.*, 1984). La implicación práctico-analítica de este fenómeno es enorme para la puesta a punto de nuevos métodos analíticos más sensibles.

Por otra parte, una gran variedad de reacciones químicas y fotoquímicas se facilitan o dificultan en este nuevo medio. Resulta evidente, pues, la necesidad de investigar y comprender la naturaleza básica de estos cambios espectrales, equilibrios y reacciones que se producen en el medio micelar si se desean aplicar de forma inteligente estos conocimientos al desarrollo de nuevos métodos analíticos luminiscentes.

Los cambios observados hasta el momento en las propiedades luminiscentes de diversas moléculas en presencia de micelas se pueden atribuir, en primer lugar, a la solubilización de dicha molécula luminofórica en la micela con el consiguiente cambio de microentorno y, en segundo lugar, a la catálisis o inhibición de reacciones químicas o fotoquímicas.

La mayoría de los compuestos luminiscentes presentan distintas propiedades de la emisión radiante para distintos disolventes o en micelas. Al pasar de un disolvente a otro cambia la polaridad, viscosidad, capacidad de formar enlaces de hidrógeno, etc. lo que produce cambios en las propiedades luminiscentes del soluto.

Otro efecto importante que influye sobre la luminiscencia observada es la capacidad del disolvente de formar enlaces por puentes de hidrógeno solvatando de alguna manera, a la molécula luminiscente. Este nuevo efecto ha de considerarse combinado con el de cambio de polaridad ya que suelen ir relacionados.

Wolff (1981a) observó que cuando la concentración de agente micelar se incrementa por encima de la c.m.c. del mismo se observa una drástica reducción del rendimiento cuántico de fluorescencia de la acridina y que tal disminución de la intensidad de fluorescencia se puede aplicar a la determinación de concentraciones micelares críticas de los distintos agentes micelares (Wolff, 1981b). Esta disminución de la fluorescencia,

así como el desplazamiento hipsocrómico en el máximo (menor polaridad) puede atribuirse a la solubilización de la acridina en la parte apolar de la micela donde se ve dificultada la formación de enlaces de hidrógeno (Wolff, 1981a). La disminución de la fluorescencia es menor en agentes micelares aniónicos (por ejemplo SDS) que en los catiónicos o no iónicos debido a la mayor hidratación de las micelas aniónicas de SDS (Wolff, 1981a).

La presencia de agentes micelares tiene un efecto decisivo sobre los equilibrios de agregación de los compuestos luminiscentes que ocurren en la fase acuosa. Como regla general, cuando la concentración de agente micelar es ligeramente superior a la c.m.c. (baja concentración de micelas) y la concentración de luminóforo relativamente elevada, se favorece la formación de agregados (principalmente dímeros) que pueden ser luminiscentes o no. Sin embargo, cuando la concentración de agente micelar se encuentra por debajo de la c.m.c, se forman pares iónicos y si la concentración de agente micelar es muy superior a la c.m.c, el reactivo se "diluye" en las micelas de modo que, a una concentración suficientemente elevada de agente micelar, el número de micelas doblemente ocupadas es despreciable.

El primer trabajo que describe la obtención de RTP en medio micelar data de 1977 (Kalyanasundaram y *col.*, 1977), donde se obtienen señales de fosforescencia a temperatura ambiente de 1-bromonaftaleno y 1-bromopireno en disoluciones desoxigenadas de dodecilsulfato sódico. Turro y Aikawa (1980), examinaron igualmente los procesos fotofísicos de 1-cloronaftaleno en medio micelar.

La denominada **fosforescencia a temperatura ambiente en disolución en presencia de medios micelares** (Micelle stabilized room temperature phosphorescence) (MS-RTP) se está desarrollando en los últimos años como una técnica analítica alternativa muy prometedora (Miller, 1981; Hurtubise, 1983; Cline Love y *col.*, 1984; Pelizzetti y Pramauro, 1985; Weijun y Chansong, 1993a y 1993b; Gioia y Campiglia, 1994; Weijun, 1994; Ai-Jun, 1996). En 1979, Hinze (1979) ya apuntaba la posibilidad de utilizar la fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares para el análisis de sustancias orgánicas basándose en los resultados obtenidos por otros autores en estudios básicos de fosforescencia en medios micelares (Turro y *col.*, 1978). Cline Love y *col.* (Cline Love y *col.*, 1980; Skrilec y Cline Love, 1980) a principios de la década de los 80, fueron los

primeros en proponer la técnica MS-RTP para la determinación de compuestos orgánicos aromáticos. Dichos autores recomiendan el empleo de micelas aniónicas de SDS en conjunción con sales de Tl^+ o Ag^+ y una desoxigenación cuidadosa de las disoluciones (purga de N_2) para obtener señales de fosforescencia analíticamente útiles. Los límites de detección obtenidos por MS-RTP para naftaleno, bifenilo y pireno fueron $6 \cdot 10^{-9}$ M, $6 \cdot 10^{-10}$ M y $5 \cdot 10^{-9}$ M, respectivamente (Skrilec y Cline Love, 1980) siendo la relación óptima de contraiones átomo pesado/sodio de 3/7 en el dodecilsulfato sódico empleado.

La técnica MS-RTP también puede ser muy útil en el análisis de mezclas de hidrocarburos, ya sea por diferenciación de vidas medias de fosforescencia (Cline Love y *col.*, 1981) o por espectroscopía sincrónica (Femia y Cline Love, 1984, 1986). Asimismo en los últimos años se han publicado gran número de trabajos sobre el uso de la MS-RTP como nuevo método de detección en cromatografía líquida (Armstrong y *col.*, 1981; Yarmchuk y *col.*, 1982; Weinberger y *col.*, 1982; Arunyanart y Cline Love, 1984; Yarmchik y *col.*, 1984). El principal problema de esta nueva metodología frente a la fluorimetría convencional es la eliminación del oxígeno disuelto. Especialmente en cromatografía líquida, la eliminación del oxígeno es difícil y costosa, aunque la adición de Na_2SO_3 puede resolver de una manera elegante y fácil el problema (Díaz García y Sanz Medel, 1986). Esta nueva técnica se ha aplicado con éxito a la determinación de naftaleno obteniéndose un límite de detección de $4 \cdot 10^{-8}$ M (Díaz García y Sanz Medel, 1986) y puede ser aplicado fácilmente como un nuevo y prometedor sistema de detección en cromatografía líquida de alta resolución.

Teniendo en cuenta que la solubilidad del oxígeno es mayor en disolventes orgánicos que en agua, cabría esperar una mayor eficiencia en la amortiguación de la fosforescencia de compuestos orgánicos solubilizados en medios micelares debido al oxígeno disuelto. Sin embargo, parece demostrado que los medios micelares protegen al luminóforo de colisiones con el oxígeno por cuanto las constantes de amortiguación observadas son inferiores a las obtenidas en fase acuosa. Las razones apuntadas para tal comportamiento inesperado son variadas: por un lado se cree que dicho aumento se debe a la viscosidad del medio micelar frente al acuoso, lo que dificultará el acercamiento por difusión del oxígeno al luminóforo. En segundo lugar, el oxígeno se mueve libremente entre la micela y la fase acuosa por lo que experimenta una especie de "mezcla de

entre la micela y la fase acuosa por lo que experimenta una especie de "mezcla de disolventes" y la solubilidad del oxígeno en mezclas de disolventes en las que interviene el agua no es una función lineal de la fracción molar sino que se mantiene baja en un amplio rango de concentración de agua (Hautala y *col.*, 1973). Es decir, en un medio micelar la solubilidad del oxígeno debe ser muy semejante a su solubilidad en agua. En tal caso, si se considera que una disolución de SDS 0'1 M da lugar a una concentración de micelas de aproximadamente $2 \cdot 10^{-3}$ M y que la concentración de oxígeno es $3 \cdot 10^{-4}$ M esto indica que el número de moléculas de oxígeno por micela, \bar{n}_q , debe ser mucho menor que 1 (Thomas, 1980).

Turro y *col.* (1978) observaron que en disoluciones micelares de BrCTA, el 1,4-dibromonaftaleno producía una fosforescencia muy débil cuando dichas disoluciones se encontraban expuestas al aire pero la intensidad aumentaba sensiblemente al purgar las disoluciones con nitrógeno. Por otro lado, puesto que en ausencia de micelas la fosforescencia de dicho compuesto no era detectable, dichos autores concluyeron que los medios micelares ofrecen una inmunidad parcial frente al oxígeno. Sin embargo otros autores (Cline Love y *col.*, 1980; Skrilec y Cline Love, 1980; Leigh y Scalano, 1983; Hunter y Szczepanski, 1984) han comprobado la necesidad de eliminar el oxígeno disuelto para obtener señales de fosforescencia suficientemente intensas en disoluciones micelares a temperatura ambiente.

Turro y *col.* (1978), obtuvieron RTP de 1,4-dibromonaftaleno en acetonitrilo purificado y desgasificado al vacío, así como de naftaleno y trifenileno en 1,2-dibromoetano igualmente purificado. También, encontraron que las ciclodextrinas podían ser utilizadas de una manera similar a los medios micelares, para la observación de fosforescencia en disoluciones acuosas (Turro y *col.*, 1982a, 1982b, 1982c, 1983). Encontraron que 1-bromo- y 1-cloronaftaleno emitían fosforescencia en disoluciones desoxigenadas de β -ciclodextrina.

Cline Love y *col.* (1980, 1981; Skrilec y Cline Love, 1981a, 1980b; Weinberger y *col.*, 1982; Femia y Cline Love, 1984) fueron los primeros en obtener RTP en medio micelar (MS-RTP), con compuestos que no poseían átomos pesados en su estructura. Obtuvieron MS-RTP de varios hidrocarburos aromáticos polinucleares, de carbazol y

derivados y de drogas tales como propranolol y naproxeno. Las señales de fosforescencia se producían en disoluciones micelares desoxigenadas de dodecil sulfato sódico en presencia de átomos pesados como talio o plata.

Como se indicó anteriormente, Díaz García y Sanz-Medel (1986), propusieron la sustitución del paso de nitrógeno como sistema de desoxigenación, por el uso de sulfito sódico como desoxigenante químico y empleando este procedimiento, obtuvieron señales de RTP de varios hidrocarburos aromáticos polinucleares con dodecil sulfato sódico en presencia de talio. La técnica se aplicó a la determinación de niobio (Sanz-Medel y *col.*, 1987) en presencia de bromoformo como átomo pesado y de aluminio (Fernández de la Campa y *col.*, 1988; Díaz García y *col.*, 1988), por formación de sus respectivos complejos con ferrón en bromuro de cetiltrimetilamonio. La determinación de aluminio fue semiautomatizada en un sistema de inyección en flujo (Liu y *col.*, 1990).

De todo lo expuesto hasta el momento se puede deducir que los métodos luminiscentes de análisis (fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia) ofrecen como ventajas básicas su gran sensibilidad y selectividad y, concretamente, la fosforescencia a temperatura ambiente es sensible, práctica y un método eficiente para identificar y cuantificar compuestos orgánicos no sólo en mezclas simples sino también en sistemas complejos reales. Esta técnica ha sido utilizada en muchas áreas, análisis clínico, investigación biomédica, química agrícola y farmacéutica, y en control industrial y ambiental.

Sin embargo el principal inconveniente es que existen relativamente pocas sustancias que muestren propiedades luminiscentes en disolución acuosa y muchas de las que las poseen no son suficientemente sensibles y, por tanto, poco útiles desde el punto de vista analítico.

Aunque, en general, en cualquier intento de desarrollar un método luminiscente (fluorimétrico o fosforimétrico) de análisis para muestras reales se cuenta con la sensibilidad de la técnica como la característica más atractiva y útil, la selectividad es frecuentemente inadecuada como consecuencia de la estructura de banda ancha de los espectros luminiscentes. Tal limitación impide a los sistemas de medida convencionales resolver las bandas solapadas que se observan frecuentemente en mezclas de compuestos

luminiscentes, siendo necesario emplear procedimientos de separación que incluyen, principalmente, técnicas cromatográficas.

Las medidas de intensidad de luminiscencia son función de tres variables independientes: longitud de onda de excitación, longitud de onda de emisión y tiempo de decaimiento. En consecuencia, las medidas de luminiscencia son potencialmente más selectivas que las medidas espectrofotométricas. Esta selectividad teórica ha sido difícil de demostrar en la práctica debido a que, en la mayoría de los casos, los espectros de luminiscencia son muy anchos y las medidas requieren aparatos especializados. Así, Miller (1981) ya apuntó la importancia de mejorar la selectividad espectral si se quiere explicar el uso potencial de esta técnica.

Los avances más recientes en tales métodos luminiscentes se han centrado principalmente en el desarrollo de nuevos instrumentos mejor diseñados y la aplicación de microprocesadores y tecnología informática para mejorar la detección y especificidad (Wehry, 1982, 1984). Una vía moderna para aumentar la sensibilidad analítica de tales métodos es la utilización de los conocimientos existentes sobre la química en disolución de los sistemas micelares. Es un hecho que con ayuda de sistemas micelares (Cline Love y col., 1984; Hinze y col., 1984) se pueden poner a punto métodos luminiscentes de análisis extremadamente sensibles y selectivos para un gran número de sustancias.

Otra alternativa rápida y de bajo coste que no incluye la manipulación de la química de la muestra, teniendo como objetivo mejorar la selectividad espectral mediante el estrechamiento de los espectros a bajas temperaturas (Whery, 1981), la espectroscopía de derivadas (Green y O' Haver, 1974), barridos sincrónicos (Lloyd, 1971; Lloyd y Evett, 1977; Vo-Dihn, 1978; Vo-Dihn, 1982; García Sánchez y Cruces Blanco, 1984), sincrónico-derivados (García Sánchez y Cruces Blanco, 1984; Rubio y col., 1986), adquisición de matrices complejos de excitación-emisión (EEMs) (Christian y col., 1981), o barridos de ángulo variable (André, 1977; Cabaniss, 1991), lo cual ha aumentado el campo de aplicación y ha mejorado las características analíticas de estos métodos.

La técnica de **espectroscopía de derivadas** se introdujo en los años 50 e inicialmente fue aplicada a la espectrofotometría de absorción UV-Visible (Hammond y Price, 1953; Morrison, 1953; French y Church, 1954). En 1955, Giese y French (1955)

publicaron un trabajo discutiendo la ventaja potencial de la primera derivada de una curva de transmisión con respecto a la longitud de onda para la resolución de bandas solapadas. Estos primeros trabajos han sido seguidos por otros muchos debido al interés de la técnica, tanto para sus aplicaciones analíticas cualitativas como cuantitativas (Levillain, 1986; Berzas Nevado y *col.*, 1992; Espinosa-Mansilla y *col.*, 1993; Morelli, 1994).

Otra técnica que ofrece una mejora en la selectividad del análisis luminiscente sin tener que sacrificar simplicidad es la técnica de **barrido sincrónico**. Sus principales atributos son el efecto de estrechamiento de banda y la simplificación de los perfiles espectrales. El método consiste en el barrido de los monocromadores de excitación y emisión simultáneamente con una diferencia constante entre ambas longitudes de onda. El resultado es la obtención de un espectro sencillo y estrecho característico de la sustancia en cuestión (Vo-Dihn, 1978).

Los beneficios obtenidos en los espectros de derivadas sugirieron a John y Soutar (1976) el acoplar ambas técnicas conjuntamente, produciéndose la primera aplicación de la técnica sincrónica-derivada para la determinación de tirosina en presencia de triptófano (Miller, 1982). Desde entonces han sido muchas las aplicaciones de esta técnica tanto para obtener aumentos en la sensibilidad como en la selectividad en el análisis de muestras complejas.

Así, han sido frecuentes los análisis de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Wakeham, 1977; Vo-Dinh, 1978; Gammage, 1978; Vo-Dinh, 1981; Tacibana y Furosawa, 1992), plaguicidas (Cruces Blanco, 1984a; Cruces Blanco, 1986; García Sánchez y Cruces Blanco, 1986; García Sánchez y Cruces Blanco, 1988a; García Sánchez, Cruces Blanco y *col.*, 1988b), alcaloides (Ramos Rubio, 1986; García Sánchez y *col.*, 1990a), productos farmacéuticos (André, 1977; Salinas, 1991) y productos de interés bioquímico (Miller, 1982; Valcárcel, 1985).

En cuanto a la aplicación de estas técnicas a la determinación de trazas de iones inorgánicos, también existen numerosos trabajos en la bibliografía. Así, Cruces Blanco y García Sánchez (1984b) determinaron trazas de magnesio en aguas mediante fluorescencia convencional y sincrónica. Posteriormente, otros trabajos tales como los de Rubio y *col.* (1985), Salinas y *col.* (1985), García Sánchez y Hernández López (1986), Salinas y *col.*

(1988), García Campaña y *col.* (1992), Cruces Blanco y *col.* (1993), etc... han demostrado que la técnica sincrónica-derivada eleva los niveles de tolerancia de los iones que se ensayan como interferentes, permitiendo la determinación de iones metálicos en muestras complejas.

Aunque las técnicas de derivadas (Levillain y Fompeydie, 1986) por sí solas no producen más información sobre los datos espectroscópicos, sí permiten discriminar entre espectros de diferentes anchuras, debido a que para dos espectros de la misma intensidad, la derivada del espectro más estrecho tendrá más intensidad que la derivada correspondiente al espectro más ancho lo cual, en muchos casos, permite una discriminación más satisfactoria de las señales espectrales.

Por tanto, el efecto de estrechamiento de las bandas de luminiscencia que origina la aplicación de la técnica sincrónica junto con las ventajas que conlleva la utilización de la técnica de derivadas ha hecho que, desde su primera aplicación (John y Soutar, 1976) haya sido ampliamente utilizada para la determinación individual de compuestos fluorescentes o para la resolución de mezclas de compuestos con o sin fluorescencia nativa.

Como puede verse por el número de datos existentes en la bibliografía, la combinación de la fluorescencia sincrónica con la técnica de derivación sigue siendo la más ampliamente utilizada ya que su principal interés radica en la posibilidad de resolver, de forma fácil y rápida, muestras complejas.

Las características de la técnica sincrónica y/o derivada han sido ampliamente discutidas en Memorias de Licenciatura (Cruces Blanco, 1983; Ramos Rubio, 1984; Muñoz de la Peña, 1985), Tesis Doctorales (Cruces Blanco, 1987; Ortega Labajos, 1988; Aguilar Gallardo, 1990; Durán Pérez, 1990; Alarcón Molina, 1992) y numerosos artículos científicos. Estas referencias y las discusiones realizadas hasta el momento son suficientes para destacar la importancia que la luminiscencia molecular acoplada a las técnicas avanzadas ha tenido en el diseño y desarrollo de la presente Memoria.

Para una aplicación satisfactoria de la técnica sincrónica y posterior derivación de los espectros sincrónicos obtenidos que permitan aumentar la selectividad de los métodos fluorimétricos convencionales es de vital importancia una correcta selección de los $\Delta\lambda$ más

apropiados para la resolución de la mezcla objeto de estudio.

Los espectros de excitación y emisión convencionales no suponen una descripción completa de la distribución espectral de un compuesto, debido a que el espectro de excitación es obtenido a una sola longitud de onda de emisión (λ_{em}) y el espectro de emisión es obtenido, igualmente, a una longitud de onda fija de excitación (λ_{ex}).

Para adquirir una información luminiscente completa de un compuesto es necesario obtener un gran número de espectros de emisión a longitudes de onda de excitación diferentes y los correspondientes espectros de excitación a longitudes de onda de emisión, también diferentes. La representación de estos datos constituye lo que se denomina espectros tridimensionales o espectros de luminiscencia total. Estos consisten en una proyección isométrica tridimensional donde uno de los ejes representa la longitud de onda de excitación, otro la longitud de onda de emisión y el tercero, el eje vertical, la intensidad de luminiscencia.

Estas **matrices completas de excitación-emisión (EEMs)** pueden representarse, también, en forma de curvas de nivel de igual intensidad de luminiscencia denominadas contornos o *mapas de contorno*. Se trata de una representación bidimensional donde los ejes X e Y constituyen las longitudes de onda de excitación y emisión y las intensidades de luminiscencia como un conjunto de curvas obtenidas al unir puntos que presentan igual intensidad de luminiscencia. Este método es aún más informativo que la observación de los espectros tridimensionales, ya que la obtención de las λ_{em} y λ_{ex} que dan lugar a la máxima intensidad de luminiscencia (máxima proximidad de las curvas de nivel) se deduce fácilmente.

La luminiscencia de barrido sincrónico consiste en mantener constante un intervalo de longitudes de onda ($\Delta\lambda$) entre la longitud de onda de excitación y la de emisión. Para obtener buenos resultados mediante la aplicación de esta técnica, principalmente para la resolución de mezclas de compuestos fluorescentes o fosforescentes, es necesario conocer previamente el valor óptimo de $\Delta\lambda$.

Una de las ventajas más importantes que proporciona la adquisición de los mapas de contorno por medio de la utilización de espectrofluorímetros más modernos es la posibilidad de la observación minuciosa de los mismos que permita seleccionar fácilmente

el valor de $\Delta\lambda$ más apropiado para la obtención de un espectro sincrónico simple y estrecho, sin perder sensibilidad y ganando, en la mayoría de los casos, selectividad.

El espectro sincrónico convencional corresponde a una sección recta, a través del mapa de contorno, de 45°. El $\Delta\lambda$ más apropiado para la determinación de un compuesto será aquel cuya diferencia de longitudes de onda de lugar a un máximo de luminiscencia.

Recientemente se ha propuesto una modificación del barrido sincrónico convencional (sección recta a través del mapa de contorno de 45°) que consiste en el uso de ángulos diferentes que permite explorar algunas zonas del mapa de contorno donde exista más información y, por tanto, resolver espectros solapados que no pueden ser resueltos mediante los barridos sincrónicos convencionales.

A este tipo de modificación de los barridos sincrónicos convencionales se le ha denominado **barrido sincrónico de ángulo variable** y su introducción se debe a Kubic y col. (1980). Esta técnica consiste en variar el incremento de longitud de onda ($\Delta\lambda$) de un forma controlada, siendo la forma más sencilla mantener la línea recta. El trazado del barrido sincrónico puede ser de *ángulo variable lineal*, que es lo más frecuente o de *ángulo variable no lineal*, que ha sido mucho menos utilizado.

Las aplicaciones de esta técnica son, hasta el momento, algo limitadas, debido a la dificultad en la obtención de estos barridos en los espectrofluorímetros convencionales (Kubic, 1983; Kubic y Sheman, 1983; Clark y col. 1985) Sin embargo, recientemente, con la mejora en la instrumentación analítica, las ventajas de esta técnica se han puesto de manifiesto en la resolución de mezclas complejas de numerosos compuestos (García Sánchez y col. 1990b; Oms y col. 1990; Sánchez y col., 1990; Yaoqun y col., 1990; Lee y col., 1991; García Sánchez y col. 1993; Yaoqun, 1993; García Sánchez y col., 1995; Capitán-Vallvey y col., 1995).

Como se observa hasta el momento, para poner a punto un método basado en la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución e incrementar las características inherentes de sensibilidad y selectividad de la determinación mediante la aplicación de modificaciones espectrales es necesario una selección minuciosa de numerosas variables. Convencionalmente, cuando se trataba de evaluar el efecto de cada variable, éstas se variaban secuencialmente. Ésta aproximación univariante consistía en fijar cada uno de las

otras variables a un valor constante e ir variando la variable de interés, midiendo, en cada caso, la respuesta del método.

Este método de optimización de variables paso a paso, aunque ha sido y sigue siendo ampliamente usado, requiere un gran número de análisis independientes y puede ser sustituido por protocolos experimentales estadísticamente diseñados en los cuales se varían simultáneamente varios factores (Cela, 1994; Deming, 1993). Esta aproximación multivariante supone una reducción del número de experimentos y de tiempo de análisis, permitiendo una evaluación estadística que permite conocer la interacción entre parámetros, cosa que no es posible en la optimización univariante.

Por todo ello, la aplicación de **diseños experimentales** tales como diseños factoriales, factoriales fraccionados y compuestos en los métodos fosforimétricos a temperatura ambiente puede ser extremadamente beneficiosa.

A pesar de las dificultades que, como cualquier otra técnica, conlleva la puesta a punto de un método fosforimétrico a temperatura ambiente en disolución, la simplificación que proporciona la utilización de estos diseños experimentales va a permitir que ésta constituya una excelente herramienta para la determinación cuantitativa de numerosos compuestos en el campo del análisis ambiental.





Reactivos, instrumentación y metodología



1. *Reactivos, disolventes y disoluciones.*

1.1. *Reactivos.*

Los reactivos empleados en esta memoria se pueden clasificar, según su función en los siguientes grupos: agentes micelares, átomos pesados, agentes desoxigenantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos, fitohormonas e insecticidas. Estos grupos se muestran, junto con los datos correspondientes a su pureza, casa suministradora y referencia, en las Tablas nº R-1, R-2, R-3, R-4 y R-5, respectivamente.

Tabla nº R-1.- *Agentes micelares.*

Agente micelar	Casa suministradora	Pureza	Referencia
SDS	Sigma	95 %	L-5750
Triton X-100	Merck	98 %	8603
Brij-35	Merck	95 %	801962
BrCTA	Sigma	99 %	H-5882

Tabla nº R-2.- *Átomos pesados.*

Átomos pesados	Casa suministradora	Pureza	Referencia
Pb(AcO) ₂ .3H ₂ O	Merck	99'5 %	7375
KI	Panreac	98 %	141542
KBr	Merck	98'5 %	4905
Pb(NO ₃) ₂	Merck	99'5 %	7398
AgNO ₃	Probus	99 %	0797
ZrCl ₄	Merck	98 %	808913
Th(NO ₃) ₄ .5H ₂ O	Merck	99 %	8162
TlNO ₃	Aldrich	99'9 %	30,923-0
CsCl	Merck	99'9 %	2039
Sr(NO ₃) ₂	Carlo Erba	99'5 %	485605
Hg ₂ (NO ₃) ₂ .2H ₂ O	Merck	97 %	4437

Tabla nº R-3.- *Desoxigenantes.*

Desoxigenantes	Casa suministradora	Pureza	Referencia
Na ₂ SO ₃	Merck	98 %	6657
H ₂ SO ₄	Merck	95-97 %	732

Tabla n° R-4.- Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

HAP	Casa suministradora	Pureza	Referencia
Acenafteno	Sigma	99 %	A 9394
Fluoreno	Sigma	99'5 %	F 6379
Fluoranteno	Aldrich	99 %	F 80-7
Naftaleno	Sigma	99 %	N 2380
Fenantreno	Sigma	96 %	P 2528
Pireno	Sigma	99'5 %	P 2146
Benz[a]antraceno	Sigma	95'5 %	B 2750
Benzo[a]pireno	Sigma	98 %	B 1760
Benzo[e]pireno	Sigma	98 %	B 8382
Antraceno	Sigma	98 %	A 8637

Tabla n° R-5.- Fitohormonas e insecticidas.

Fitohormonas	Casa suministradora	Pureza	Referencia
Ácido β -naftiloxiacético	Sigma	99 %	N-6500
α -Naftaleneacetamida	Sigma	99 %	N-0250
Carbaril	Dr. Ehrenstorfer	99'9 %	E 109800
Ácido p-clorofenoxiacético	Sigma	99 %	C-0413
α -Naftol	Sigma	99 %	N-1000
2-(4-Tiazolil)-benzimidazol	Aldrich	98 %	28,951-5
Carbendazima	Aldrich	98 %	37,867-4
2-Aminofenol	Aldrich	99 %	A 7,130-1
3-Amino 1,2,4-triazol	Sigma	95 %	A-8056
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Sigma	95 %	D-8407

1.2. Disolventes orgánicos.

Los disolventes orgánicos utilizados para el estudio del medio en las condiciones de trabajo, así como para la preparación de las distintas disoluciones se indican en la Tabla n° R-6, junto con los datos de pureza, casa suministradora y referencia correspondiente.

Tabla n° R-6.- *Disolventes.*

Disolvente	Casa suministradora	Pureza	Referencia
1-Pentanol	Carlo Erba	P.A.	413783
1-Butanol	Panreac	P.A.	131884
1-Octanol	Probus	P.A.	231810
Hexano	Merck	P.A.	4373
Heptano	Merck	P.A.	4379
Pentano	Carlo Erba	P.A.	468156
Diclorometano	Panreac	P.A.	131254
Cloroformo	Merck	P.A.	2432
Tetracloruro de carbono	Carlo Erba	P.A.	434621
Ciclohexano	Panreac	P.A.	131250

1.3. *Disoluciones.*

1.3.1. *Agentes micelares.*

Se utilizaron cuatro tipos de agentes micelares. Sus disoluciones se prepararon siguiendo los siguientes procedimientos:

- Disolución de SDS: Se preparó disolviendo 14'41 g de SDS en 100 ml de agua, obteniendo así una disolución madre 0'5 M.
- Disolución de TX-100: Se preparó disolviendo 1'29 g de TX-100 en 100 ml de agua, obteniendo así una disolución 0'02 M. De ésta se tomó 1 ml enrasándola hasta 100 ml, obteniendo una concentración final de $2 \cdot 10^{-4}$ M.
- Disolución de Brij-35: Se preparó disolviendo 0'21 g de Brij-35 en 250 ml de agua, obteniendo así una disolución madre $7 \cdot 10^{-4}$ M.
- Disolución de BrCTA: Se preparó disolviendo 2'92 g de BrCTA en 100 ml de agua, obteniendo así una disolución madre 0'08 M.

En todos los casos se hizo uso de un baño de ultrasonidos para favorecer la disolución de los agentes micelares, siendo además necesario mantener la disolución de BrCTA en un baño de agua a una temperatura de 30 °C. Las concentraciones de las disoluciones formadas fueron del orden de 100 veces la concentración crítica micelar de cada agente micelar, para que, por sucesivas diluciones, la concentración final se aproximara a dicha c.m.c..

1.3.2. Átomos pesados.

El procedimiento seguido fue el siguiente: En un matraz de 100 ml se añaden distintas cantidades de átomos pesados (9'48 g de $\text{Pb}(\text{AcO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 4'15 g de KI, 2'98 g de KBr, 8'28 g de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 4'25 g de AgNO_3 , 6'66 g de TlNO_3 , 5'8 g de ZrCl_4 , 14'25 g de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4'2 g de CsCl, 5'24 g de $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ y 14'25 g de $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y se llevó a volumen final con agua destilada, introduciéndolo durante unos minutos en un baño de ultrasonidos o mediante agitación magnética y calentamiento, para favorecer la disolución. De esta forma la disolución obtenida, en todos los casos, fue de 0'25 M.

1.3.3. Sulfito sódico y ácido sulfúrico.

En este apartado se han agrupado los dos compuestos implicados en la desoxigenación de las muestras:

- Disolución de Na_2SO_3 : Se preparó una disolución 0'1 M, introduciendo 0'3 g de Na_2SO_3 en un matraz de 25 ml. Esta disolución debe ser preparada diariamente y mantenerla siempre en un matraz cerrado.
- Disolución de H_2SO_4 : Se preparó una disolución 0'02 M, por dilución de 2 ml de un ácido sulfúrico 0'5 M hasta 50 ml. Esta disolución se preparó de igual forma, por dilución a partir de una muestra de H_2SO_4 concentrado (95-97 %).

1.3.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Las disoluciones madre de hidrocarburos aromáticos policíclicos se obtuvieron según el procedimiento siguiente: Se prepararon unas disoluciones de éstos $2'4 \cdot 10^{-2}$ M disolviendo la cantidad necesaria de cada HAP en un hidrocarburo (n-pentano, n-hexano, n-heptano); las disoluciones madre se prepararon añadiendo a 100 μl de estas disoluciones, 100 μl de co-surfactante (1-butanol, 1-pentanol, y 1-octanol) y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. La concentración final de HAP fue de $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en todos los casos.

1.3.5. Fitohormonas e insecticidas.

Las disoluciones de las fitohormonas e insecticidas estudiadas se prepararon siguiendo los procedimientos que se indican a continuación:

- Disolución de ANOA: Se preparó disolviendo 5 mg en agente micelar (SDS 0'5 M, TX-100 $2 \cdot 10^{-4}$ M o Brij-35 $7 \cdot 10^{-4}$ M) y enrasando a 50 ml. De esta forma la concentración de ANOA final fue de $100 \mu\text{g/ml}$ ($4'95 \cdot 10^{-4}$ M).
- Disolución de NAD: Se preparó disolviendo 5 mg en 50 ml de SDS 0'5 M. De esta forma la concentración final de NAD fue de $100 \mu\text{g/ml}$ ($5'49 \cdot 10^{-4}$ M).
- Disolución de CBL: Se preparó, en primer lugar, una disolución $1'98 \cdot 10^{-2}$ M disolviendo la cantidad necesaria de CBL en un hidrocarburo (n-pentano, n-hexano, n-heptano, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , CCl_4 y ciclohexano); la disolución madre se preparó añadiendo a $100 \mu\text{l}$ de esta disoluciones, $100 \mu\text{l}$ de co-surfactante (1-butanol, 1-pentanol, y 1-octanol) y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. De esta forma la concentración final de CBL fue de $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en todos los casos estudiados.

Las disoluciones del resto de fitohormonas e insecticidas estudiadas como interferentes se prepararon en acetona a distintas concentraciones.

2. Instrumentación.

2.1. Medidas de intensidad de fluorescencia y fosforescencia.

Las medidas de intensidad de fluorescencia y fosforescencia y el registro de espectros se han llevado a cabo en:

- Espectrofluorímetro y espectrofosforímetro AMINCO-Bowman Series 2: Equipado con dos lámparas de Xenón, una continua de 150 W y otra de pulso de 7 W (duración de pulso aproximadamente $12 \mu\text{s}$). Está conectado a través de una interfase GPIB (IEEE-488) con un ordenador tipo PC compatible con microprocesador 386 (33 MHz) bajo sistema operativo OS/2 versión 2.0. El ordenador lleva instalado un programa de gestión de datos AB2 (Aminco-Bowman) versión 1.40.

En todos los casos, las disoluciones a medir se añadieron sobre:

- Cubetas de cuarzo Hellma modelo Suprasil (10'00 mm), provistas de cierre hermético con tapón de teflón, con capacidad aproximada de 4 ml.

El control de la temperatura y su mantenimiento en la realización de las medidas fluorimétricas y fosforimétricas se efectuó con:

- Ultratermostato Selecta modelo Frigiterm, capaz de regular la temperatura entre -10 y 99'9 °C, con una precisión de $\pm 0'1$ °C, provisto de sistema circulatorio. El equipo fue conectado al soporte de cubetas del espectrofosforímetro, adecuado para mantener el control de temperatura de las mismas, mediante circulación continua de agua.

2.2. Pesada.

Las pesadas se llevaron a cabo mediante la utilización de un granatario y una balanza de precisión:

- Granatario Sartorius (sensibilidad 0'1 g).
- Balanza Mettler modelo AE240 (sensibilidad 0'01 mg).

2.3. Material adicional.

Otro material adicional del cual se dispuso para el trabajo experimental fue:

- Lámpara UV Atom modelo A/70, provista de un interruptor para seleccionar 254 y 360 nm de longitud de onda.
- Placa calefactora Selecta modelo Agitamatic-n, provista de agitador magnético.
- Estufa de secado Selecta modelo Theroven, provista de termostato y selector de temperaturas desde 40 a 170 °C.
- Baño de agua Selecta modelo Precistern S-387, provisto de termostato y selector de temperaturas desde 0 a 200 °C.
- Baño de ultrasonidos Selecta modelo Ultrasons, de 40 KHz de frecuencia.
- Rotavapor Buchi modelo R-110, conectado a una trompa de vacío y provisto de un baño termostático de 30-110 °C, con un regulador de temperatura.
- Sistema de vacío Buchi modelo B-169.
- Frigorífico-congelador Corberó modelo FC 450.
- Micropipetas Transferpette Brand, Typ Digital: Referencia nº 7041 72 (10-50 μ l), referencia nº 7041 76 (50-250 μ l) y referencia nº 7041 80 (200-1000 μ l).

- Material de vidrio, como pipetas, graduadas y aforadas de diversos volúmenes comprendidos entre 1 y 50 ml, tubos de ensayo, tubos de tapón con rosca, matraces aforados y vasos diversos.

Los recursos informáticos utilizados en la presente Memoria:

- Ordenador personal tipo PC. ICL modelo DRS M75, Intel-486, 60 MHz.
- Statgraphics, versión 6.0, STSC, Inc., Statistical Graphics Corporation, USA (1993), Licencia Universidad de Granada.
- Alamín 1.0, J.L. Sierra Fernández, A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero y M. Román Ceba (Memoria Doctoral A.M. García Campaña, 1995).

3. Metodología.

3.1. Características espectroscópicas.

Se procedió al registro de los espectros de excitación y emisión fluorescentes, siendo importante determinar la longitud de onda de excitación, ya que coincide prácticamente con la longitud de onda de excitación fosforescente. Para el caso de mezclas de HAP, se registraron los espectros de fluorescencia total restándoles, en todos los casos, un blanco preparado en las mismas condiciones.

Se registraron, también, los espectros de excitación y emisión fosforescentes, el espectro de fosforescencia total y la curva de decaimiento fosforescente a los máximos de excitación y emisión. Estos datos experimentales aportan información suficiente sobre todas las características espectroscópicas de los compuestos en estudio. Los espectros de excitación y emisión fosforescentes muestran las longitudes de onda de máxima intensidad. Una información parecida se puede conseguir del espectro de fosforescencia total, el cual permite conocer, de forma global, la zona espectral donde existe señal fosforescente así como su mapa de contorno. La curva de decaimiento fosforescente ayuda al establecimiento de dos parámetros instrumentales: tiempo de decaimiento (t_d) y tiempo de integración (t_g). El primero indica el tiempo a partir del cual se integra la señal fosforescente, debe estar comprendido entre el tiempo que dura el pulso de la lámpara (aproximadamente 12 μ s) y el impuesto por la forma de la curva de decaimiento. El

tiempo de integración es el tiempo durante el cual se integra la señal fosforescente. Ambos parámetros se muestran en la Figura n° R-1, sobre una curva de decaimiento. A partir de la curva de decaimiento también se calcula el parámetro vida media mediante el ajuste a una exponencial de dicha curva llevado a cabo por el espectrofotómetro.

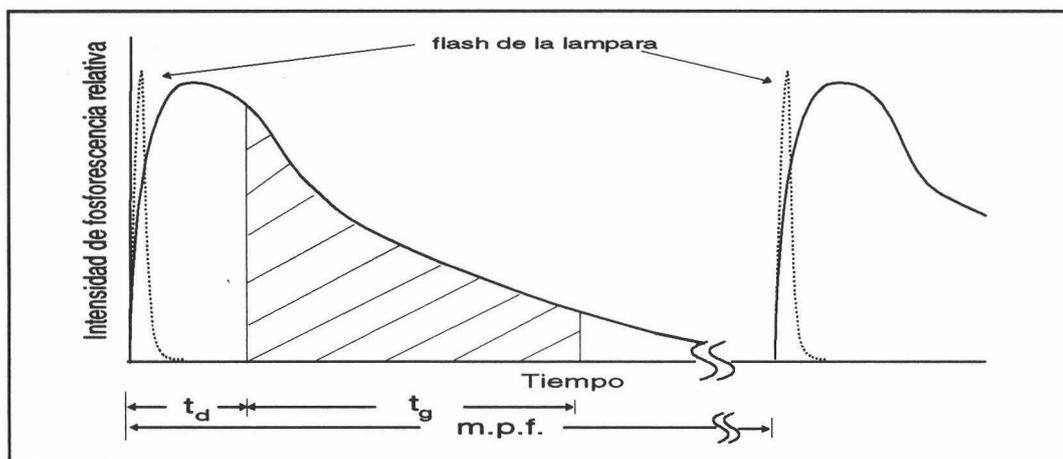


Figura n° R-1.- Esquema general de una curva de decaimiento.

3.2. Selección de variables experimentales.

3.2.1. Optimización de reactivos.

a) Tipos de sistemas.

Es conocido que un amplio grupo de compuestos aromáticos en disolución son capaces de generar señales de fosforescencia. Este hecho ocurre sólo en determinadas condiciones experimentales entre las que se incluyen la presencia de:

- Un agente micelar que aumente la rigidez estructural del medio que rodea al analito: Dodecil sulfato sódico (SDS), Polioxietileno(23)dodecanol (Brij-35), Bromuro de cetiltrimetil amonio (BrCTA) y Polioxietileno(9'5)p-teroctilfenol (TX-100).
- Un agente desactivante del estado singlete que favorezca el cruce intersistemas: $Pb(AcO)_2 \cdot 3H_2O$, KI, KBr, $Pb(NO_3)_2$, $AgNO_3$, $TiNO_3$, $ZrCl_4$, $Th(NO_3)_4 \cdot 5H_2O$, CsCl, $Sr(NO_3)_2$ y $Hg_2(NO_3)_2$.
- Un agente desoxigenante que favorezca la eliminación del oxígeno del medio que rodea al analito, puesto que este es un importante desactivador de la fosforescencia: Na_2SO_3 en combinación con H_2SO_4 .

El primer problema que surge a la hora de desarrollar los distintos métodos espectrofosforimétricos es la gran posibilidad de combinaciones que pueden generar fosforescencia, existen un total de 44 posibilidades, de las cuales sólo algunas serán útiles. Se probaron todas las combinaciones posibles para varios HAP y fitohormonas, llegando a las conclusiones mostradas en la Tabla nº R-7; conclusiones que parecen ser independientes del compuesto del que se trate, y dependientes de los reactivos combinados en cada caso. Se observa que se producen fenómenos de precipitación en varios de los múltiples casos probados, Pb^{2+} , Ag^+ , Th^{4+} , precipitan con el SDS, y con el SO_3^{2-} ; mientras que el I^- y el Br^- lo hacen sólo con el SDS, no obteniéndose resultados concluyentes para el resto de casos ensayados, exceptuando el caso del Tl^+ donde si se ha llegado a encontrar señales de fosforescencia.

Para el caso de la utilización de microemulsiones, se complica aún más esta amalgama de posibilidades, manteniéndose invariables las conclusiones hasta ahora obtenidas. Los compuestos totalmente apolares no son solubles en agua, ni siquiera, a veces, en disoluciones acuosas de agentes micelares, las cuales poseen cierta capacidad solubilizadora. Este hecho obliga a recurrir a la utilización de las microemulsiones, mezclas homogéneas de agua y un hidrocarburo apolar en la presencia de grandes cantidades de agente micelar y un co-surfactante. Entre los hidrocarburos apolares que se estudiaron están: N-pentano, n-hexano, n-heptano, CH_2Cl_2 , $CHCl_3$, CCl_4 y ciclohexano; y entre los co-surfactantes: 1-Butanol, 1-pentanol y 1-octanol. A la mezcla del hidrocarburo apolar y el co-surfactante se le denominará agente emulsionante.

Las combinaciones entre los hidrocarburos y los co-surfactantes son 21. Sin embargo, sólo el agente micelar SDS, es capaz de formar microemulsiones estables y no todas las combinaciones posibles son estables. Para la comprobación de este hecho experimental se prepararon distintas microemulsiones abarcando todas las posibilidades. La microemulsión se preparó mezclando 100 μ l de hidrocarburo con 100 μ l de co-surfactante y enrasando la disolución hasta 10 ml con el agente micelar (SDS 0'5 M, BrCTA 0'08 M, Brij-35 $7 \cdot 10^{-4}$ M, TX-100 0'02 M o TX-100 $2 \cdot 10^{-4}$ M). Los resultados se reflejan en la Tabla nº R-8. De ésta se concluye que sólo se forman microemulsiones estables para el caso del SDS y ni siquiera para todos los agentes emulsionantes ensayados.

Tabla n° R-7.- Comportamiento de distintas combinaciones de agente micelar y átomo pesado.

		Agentes micelares			
		SDS	Brij-35	TX-100	BrCTA
Á t o m o s p e s a d o s	Pb ²⁺ Ag ⁺ Th ⁴⁺	Problemas de precipitación con el SDS y con el SO ₃ ²⁻	Problemas de precipitación con el SO ₃ ²⁻	Problemas de precipitación con el SO ₃ ²⁻	Problemas de precipitación con el SO ₃ ²⁻
	Tl ⁺	Posibilidad de desarrollo de método fosforimétrico	Posibilidad de desarrollo de método fosforimétrico	Posibilidad de desarrollo de método fosforimétrico	Problemas de precipitación con el BrCTA
	I ⁻ Br ⁻	Problemas de precipitación con el SDS	No se ha conseguido óptimo de fosforescencia	No se ha conseguido óptimo de fosforescencia	No se ha conseguido óptimo de fosforescencia
	Cs ⁺ Zr ⁴⁺ Sr ²⁺ Hg ⁺	No se ha conseguido óptimo de fosforescencia	No se ha conseguido óptimo de fosforescencia	No se ha conseguido óptimo de fosforescencia	No se ha conseguido óptimo de fosforescencia

Tabla n° R-8.- Estabilidad de las microemulsiones.

Agente emulsionante	SDS	TX-100	Brij-35	BrCTA
N-pentano/1-butanol	Estable	No estable	No estable	No estable
N-pentano/1-pentanol	Estable	No estable	No estable	No estable
N-pentano/1-octanol	No estable	No estable	No estable	No estable
N-hexano/1-butanol	Estable	No estable	No estable	No estable
N-hexano/1-pentanol	Estable	No estable	No estable	No estable
N-hexano/1-octanol	No estable	No estable	No estable	No estable
N-heptano/1-butanol	Estable	No estable	No estable	No estable
N-heptano/1-pentanol	Estable	No estable	No estable	No estable
N-heptano/1-octanol	No estable	No estable	No estable	No estable
CH ₂ Cl ₂ /1-pentanol	Estable	No estable	No estable	No estable
CHCl ₃ /1-pentanol	No estable	No estable	No estable	No estable
CCl ₄ /1-pentanol	No estable	No estable	No estable	No estable
Ciclohexano/1-pentanol	No estable	No estable	No estable	No estable
CH ₂ Cl ₂ /1-butanol	Estable	No estable	No estable	No estable
CHCl ₃ /1-butanol	No estable	No estable	No estable	No estable
CCl ₄ /1-butanol	No estable	No estable	No estable	No estable
Ciclohexano/1-butanol	Estable	No estable	No estable	No estable

El esquema de un sistema micelar, para un determinado analito utilizando TlNO_3 como átomo pesado y Na_2SO_3 como agente micelar, se muestra en al Figura n° R-2.

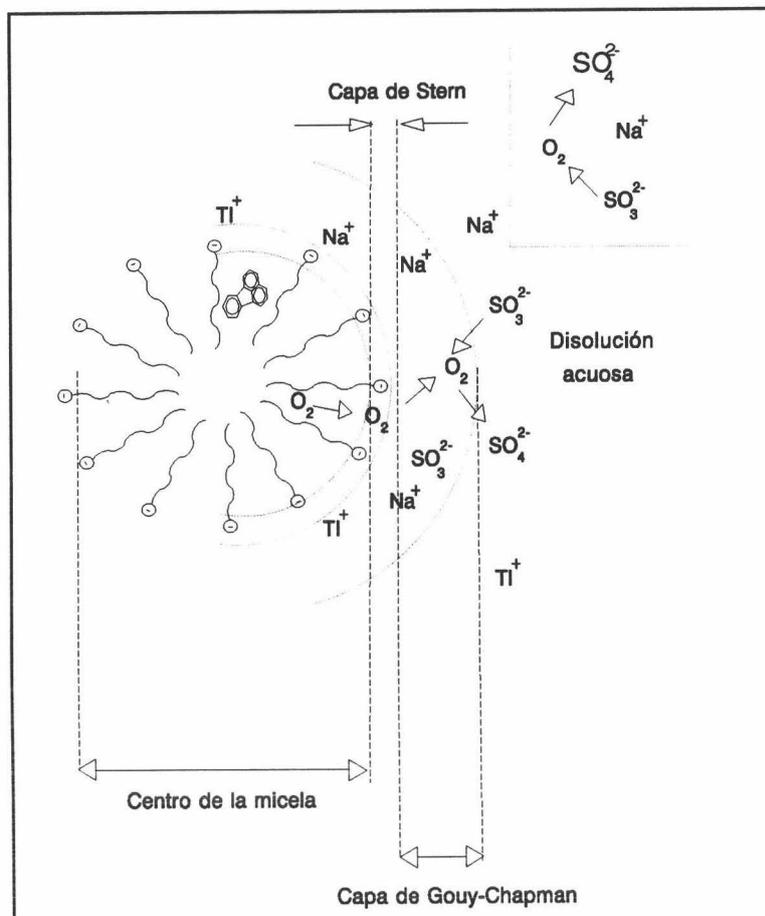


Figura n° R-2.- Esquema general de un sistema micelar.

En el caso de las microemulsiones, el agente emulsionante se situaría en el corazón micelar, tal y como ya se indicó en la introducción de la presente memoria.

En el caso del agente micelar SDS, existen ciertos problemas de precipitación en presencia del TlNO_3 a determinados rangos de concentración (Nugara y King, 1989), si bien éstos disminuyen por efecto de ion común en presencia del Na_2SO_3 . A las concentraciones empleadas en los métodos propuestos de esta memoria, no existen problemas de precipitación de este tipo, excepto para algunos puntos de los diseños experimentales o del simplex en los cuales ha sido necesario calentar las muestras a $40\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 minuto. Los equilibrios que tienen lugar se indican en la Figura n° R-3.

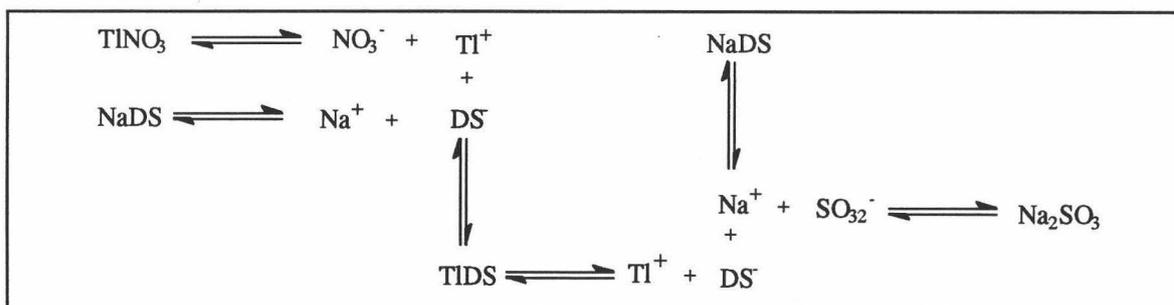
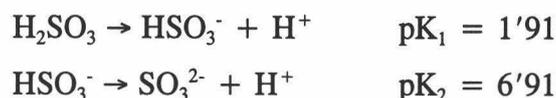
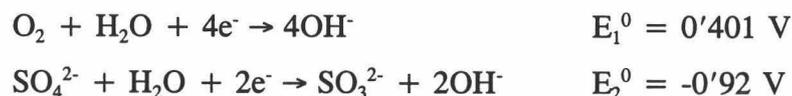


Figura n° R-3.- *Equilibrios presentes en el sistema micelar utilizado.*

Al observar la Figura n° R-2, se comprueba que el O_2 contenido en el corazón de la micela se elimina al reaccionar en la superficie de ésta con grupos SO_3^{2-} . Esta reacción se favorece por la presencia de H_2SO_4 en el medio (Weijun y col., 1994). Para explicar este hecho es necesario conocer los equilibrios de desprotonización del ácido H_2SO_3 y los potenciales redox del O_2 y del SO_3^{2-} . Los equilibrios de desprotonización del H_2SO_3 serían:



Por otro lado, las reacciones redox correspondientes a la reducción del O_2 y a la oxidación del SO_3^{2-} serían, respectivamente:



A la vista de estos equilibrios redox, conforme aumenta la concentración de OH^- se dificulta la reducción del O_2 , mientras que se favorece la oxidación del ion sulfito. Por otro lado, conforme aumenta la concentración de H^+ en el medio, el grupo SO_3^{2-} tiende a transformarse en HSO_3^- .

Existe, no obstante, un intervalo de pH comprendido entre 6-7'5 para el cual se favorece el proceso de desoxigenación de las muestras, intervalo que es la resultante de los equilibrios que intervienen en este tipo de sistemas. El pH que genera la adición de SO_3^{2-} es del orden de 9, por ello es necesaria la adición de pequeñas cantidades de H_2SO_4 para conseguir que el pH se encuentre entorno a 7. Al adicionar H_2SO_4 al medio aparece, in situ, una disolución tampón formada por SO_3^{2-} y HSO_3^- , que ayuda al mantenimiento del valor del pH próximo a 7, evitando el problema que el empleo de este pH suponga.

b) Metodología de optimización.

Las señales de fosforescencia se obtienen con un control muy preciso de las variables experimentales. Además, existe una importante interacción entre la rigidez estructural generada por el medio micelar, la presencia de átomo pesado para favorecer el cruce intersistemas y la necesidad de un agente desoxigenante. Por estas razones es aconsejable el uso de sistemas de optimización multivariante. Estas técnicas además de abordar la optimización conjunta de un amplio número de variables experimentales, suponen un ahorro de tiempo y dinero, puesto que necesitan un número relativamente pequeño de experimentos. Existen dos importantes metodologías a la hora de llevar a cabo la optimización conjunta de variables experimentales:

- Métodos secuenciales
- Diseños experimentales

- Métodos secuenciales.

Los más conocidos dentro de los métodos secuenciales son los métodos simplex, y dentro de éstos el simplex geométrico. El simplex geométrico es un algoritmo secuencial de búsqueda directa, que se caracteriza por la no utilización de derivadas de la respuesta y por basarse en un estudio secuencial de observaciones (Spentley, 1962 y Long, 1969). Cada valor de respuesta se compara, en cada caso, con los obtenidos anteriormente y del examen de ellos se decide cual es el siguiente punto experimental.

Es un método ciego, no conoce, ni evalúa en ningún momento la superficie de respuesta. Se mueve en una dirección determinada, necesita para una nueva experiencia de los resultados anteriores, va moviéndose hasta un cierto punto. Su utilización no es muy extendida pues no aporta información adicional sobre el sistema y habría que hacer nuevos puntos experimentales (por ejemplo un diseño experimental). Sin embargo, presenta dos grandes ventajas: Se mueve bien con un gran número de variables ($n > 6$) y se hace indispensable cuando la respuesta está afectada de grandes errores aleatorios.

El simplex es una figura geométrica caracterizada por un número de vértices igual al número de variables más una, de forma que para dos variables se forma un triángulo equilátero, para tres variables un tetraedro y para cuatro o más variables no se podría representar; donde de los n vértices posibles, $n-1$ están en el mismo plano o hiperplano.

Esta propiedad hace que siempre se pueda formar un nuevo simplex sobre cualquier cara del anterior sin más que añadir un nuevo vértice.

Para alcanzar el óptimo se calcula el vértice donde la respuesta adquiere su peor valor, se busca un punto simétrico a ese vértice y se realiza un nuevo experimento. Puede ocurrir que el simplex se "despiste", localice un óptimo relativo, para "enderezarlo" se cambia el tamaño o se relocaliza el simplex original. Cuando llega al máximo absoluto, gira entorno a él hasta formar un hexágono (para el caso de dos variables). En el caso de que un valor sea erróneo, si éste es más bajo, el simplex rebota, se reorienta y, si es más alto, lo toma como un máximo y gira alrededor de él.

No siempre las variables presentan un máximo dentro del dominio de respuesta; en ese caso el simplex indica la dirección, a veces no posible. Cuando un punto experimental requiere un valor de alguna de las variables fuera del dominio experimental, no se hace el experimento y se le asigna una respuesta muy mala; así el simplex rebota, toma otra dirección y enfila a otro óptimo, o bien vuelve originalmente a embestir con el mismo punto concluyendo de este modo que no hay máximo. Lo correcto sería repetir la estrategia con un simplex de menor tamaño.

En un simplex geométrico, las distancias entre los distintos vértices han de ser iguales, hecho que no se puede cumplir si las magnitudes que se optimizan mediante el simplex no tienen las mismas unidades o bien teniendo las mismas difieren en varios órdenes de magnitud. En este caso, las variables se representarán mediante valores codificados relacionados con los valores reales de las variables a través de factores de conversión (f).

Para el cálculo de cada nuevo vértice en un simplex geométrico se utiliza el siguiente procedimiento:

- 1) Se calcula el punto medio correspondiente a los vértices retenidos (M), como la suma de las coordenadas dividida por el número de estos vértices.
- 2) Se calcula la distancia entre este punto y el vértice rechazado (R). A esta distancia se le denominará Δ .
- 3) El nuevo vértice (N) se obtiene sumando al punto M la distancia calculada anteriormente.

Existen modificaciones del método simplex que se basan en procurar que avance más rápido cuando está alejado del óptimo y más lento cuando está cerca, reduciendo por consiguiente el número de experimentos. Entre estas modificaciones se pueden destacar la del Simplex Modificado (Nelder y Mead, 1965), Contracción Masiva, de Centroide Compensado (Ryan y *col.*, 1980), las cuales no se van a desarrollar en la presente Tesis.

Se deben de realizar al menos cinco operaciones previas a la optimización por métodos simplex; donde las tres primeras son generales a cualquier método de optimización multivariante y las dos últimas son específicas de los métodos simplex:

- 1) Definición de las magnitudes a optimizar.
- 2) Selección de los factores a optimizar.
- 3) Identificación de la región experimental.
- 4) Selección del tamaño del simplex inicial.
- 5) Localización del punto inicial de partida.

- Diseños experimentales.

Consisten en la realización de una serie de pruebas en las que se varían los valores de una serie de variables experimentales observando como influyen en la variable respuesta (Box y *col.*, 1978). Se requieren una serie de principios básicos y trabajar con técnicas estadísticas (para elegir los factores, sus valores y las conclusiones):

- Aleatorización, el orden del conjunto de experimentos y del sistema experimental debe de elegirse aleatoriamente.
- Replicación, si se replica el experimento se van a obtener datos para evaluar el error experimental.
- Homogeneidad de las varianzas, para aumentar la precisión de un experimento se debe mantener en el conjunto de experimentos realizados.

Cuando se plantea un diseño se deben realizar unas operaciones previas a la optimización, parte de las cuales han sido ya mencionadas en los métodos simplex:

- 1) Evaluar el problema.
- 2) Elección de los factores y niveles. Factores o tratamientos, variables de las que depende la respuesta (n). Niveles, posibles valores que puede tomar cada uno de los factores en el tipo de diseño que se esté utilizando.

- 3) Selección de la variable respuesta.
- 4) Selección del diseño experimental.
- 5) Realización del experimento.
- 6) Análisis estadístico de los datos: Comprobación del modelo y evaluación de los factores que influyen en la variables respuesta.

En el caso que se está estudiando, evaluado el problema y conocidos los factores y niveles así como la variable respuesta, hay que elegir el diseño experimental a utilizar. Existen distintos tipos de diseños experimentales que se pueden agrupar en tres grupos:

- Completamente aleatorizados: Es un diseño donde los factores no interaccionan entre sí (No se suele utilizar).
- Factoriales: En este caso, existe interacción entre los factores, se pueden subdividir a su vez en varios grupos (a dos niveles, a tres niveles, en bloques, con punto central y fraccionados) presentado una serie de ventajas como son el hecho de poder estudiar muchos factores con pocas experiencias, requerir pocos puntos experimentales.
- Compuestos: Es un diseño factorial y puntos adicionales, se suele utilizar cuando el número de variables experimentales es elevado; para crearlo se desarrolla un factorial completo a dos niveles, 2^n , añadimos $2n$ puntos experimentales que se sitúan a una distancia X del centro del diseño y K puntos centrales.

En la presente memoria se eligió un diseño experimental compuesto ya que amplía el número de niveles de las variables experimentales a cinco, ampliando la región experimental, además, posee puntos centrales replicados lo que permite evaluar el error puro y por tanto comprobar el modelo. Son diseños ortogonales y está incluido en el paquete estadístico STATGRAPHICS.

La matriz del diseño, sin aleatorizar, que se empleará, básicamente, se muestra en la Tabla nº R-9. Los valores, -1 y 1, corresponderían a los niveles menor y mayor de cada variable, análogamente a un diseño factorial, y el valor 0 al punto medio de estos dos valores, el cual coincidiría a su vez con el centro del diseño. Los valores, $-2'05798$ y $2'05798$, son los niveles de las variables correspondientes a los puntos experimentales en forma de estrella de los que se compone el diseño.

Tabla nº R-9.- Matriz del diseño

Punto	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
1	0	0	0	0
2	-1	-1	-1	-1
3	1	-1	-1	-1
4	-1	1	-1	-1
5	1	1	-1	-1
6	-1	-1	1	-1
7	1	-1	1	-1
8	-1	1	1	-1
9	1	1	1	-1
10	0	0	0	0
11	-1	-1	-1	1
12	1	-1	-1	1
13	-1	1	-1	1
14	1	1	-1	1
15	-1	-1	1	1
16	1	-1	1	1
17	-1	1	1	1
18	1	1	1	1
19	0	0	0	0
20	-2'05798	0	0	0
21	2'05798	0	0	0
22	0	-2'05798	0	0
23	0	2'05798	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	-2'05798	0
26	0	0	2'05798	0
27	0	0	0	-2'05798
28	0	0	0	2'05798
29	0	0	0	0

Generado el diseño experimental por el programa STATGRAPHICS, se introducen los valores de la variable respuesta para cada punto. Aplicado el diseño experimental se sigue la metodología de la superficie de respuesta: Análisis de la varianza, comprobación del modelo, estimación de los coeficientes del modelo de segundo orden y estudio de la superficie de respuesta estimada obteniendo los valores óptimos. Se eligió segundo orden por su sencillez, porque se pueden representar muchos tipos de superficies de respuesta, es generado por STATGRAPHICS y si la región experimental es amplia, el ajuste genera resultados aceptables.

El análisis de la varianza (ANOVA) ofrece la posibilidad de conocer los niveles de significación, P, para cada uno de los coeficientes de regresión del modelo de segundo orden. La tabla general del análisis de la varianza para el diseño anterior sería de la siguiente forma:

Tabla nº R-10.- ANOVA

Coeficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	SC _{a1}	1	MC _{a1}	F _{a1}	P _{a1}
a ₂	SC _{a2}	1	MC _{a2}	F _{a2}	P _{a2}
a ₃	SC _{a3}	1	MC _{a3}	F _{a3}	P _{a3}
a ₄	SC _{a4}	1	MC _{a4}	F _{a4}	P _{a4}
a ₁₂	SC _{a12}	1	MC _{a12}	F _{a12}	P _{a12}
a ₁₃	SC _{a13}	1	MC _{a13}	F _{a13}	P _{a13}
a ₁₄	SC _{a14}	1	MC _{a14}	F _{a14}	P _{a14}
a ₂₃	SC _{a23}	1	MC _{a23}	F _{a23}	P _{a23}
a ₂₄	SC _{a24}	1	MC _{a24}	F _{a24}	P _{a24}
a ₃₄	SC _{a34}	1	MC _{a34}	F _{a34}	P _{a34}
a ₁₁	SC _{a11}	1	MC _{a11}	F _{a11}	P _{a11}
a ₂₂	SC _{a22}	1	MC _{a22}	F _{a22}	P _{a22}
a ₃₃	SC _{a33}	1	MC _{a33}	F _{a33}	P _{a33}
a ₄₄	SC _{a44}	1	MC _{a44}	F _{a44}	P _{a44}
Fallo de ajuste	SC _{FA}	10	MC _{FA}	F _{FA}	P _{FA}
Error Puro	SC _{EP}	4	MC _{EP}		
Total	SC _T				

A cada coeficiente del polinomio al cual se ajusta el modelo de segundo orden, el programa STATGRAPHICS le calcula su correspondiente suma de cuadrados (SC) y su media de cuadrados (MC) dividiendo la primera por los grados de libertad (g.l.) correspondientes a cada coeficiente de regresión. Un cálculo similar se lleva a cabo para las dos componentes del error que existen en estos modelos, el fallo de ajuste y el error aleatorio o error puro.

Dividiendo las MC de cada coeficiente de la regresión por la MC del error puro se obtiene la F de Snedecor para cada término. Comparando la F calculada con una F tabulada para estos grados de libertad y un nivel de significación del 5%, se tiene que:

$F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ La variabilidad del coeficiente de regresión es menor que la generada por el error puro y por tanto que no es significativo.

$F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ La variabilidad del coeficiente de regresión es mayor que la generada por el error puro y por tanto que es significativo.

A esta misma conclusión se puede llegar observando los niveles de significación. De este modo, si P es menor de un 5% se dirá que el coeficiente de regresión es significativo; si por el contrario P es mayor que un 5%, dicho coeficiente no será significativo. El valor de P representaría la probabilidad de que el efecto del coeficiente de regresión sea debido únicamente al error aleatorio.

Si un coeficiente de regresión es significativo significaría que la variable respuesta varía con la concentración de esa variable experimental en el orden que implica el coeficiente.

La comprobación del modelo puede ser de forma gráfica y mediante el test de hipótesis o fallo de ajuste y el coeficiente de determinación (r^2). La comprobación de forma gráfica se puede llevar a cabo representando los residuales frente a cada una de las variables experimentales o bien mediante la gráfica de probabilidad normal. En esta memoria sólo se ha utilizado el test de fallo de ajuste y el coeficiente de determinación.

Para el test de hipótesis o fallo de ajuste se compara la media de cuadrados del fallo de ajuste (MC_{FA}) con la del error puro (MC_{EP}). Al dividir estas dos medias se obtiene un valor de F_{cal} y al comparar éste con una F_{tab} para estos grados de libertad y un nivel de significación del 5%, se tiene que:

$F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ La variabilidad del fallo de ajuste es menor que la generada por el error puro y por tanto no es significativa, el modelo se ajusta.

$F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ La variabilidad del fallo de ajuste es mayor que la generada por el error puro y por tanto es significativa, el modelo no se ajusta.

El coeficiente de determinación se calcula como la diferencia de la suma de cuadrados total (SC_{T}) y la suma de cuadrados de los residuales (SC_{Res}) dividida por la suma de cuadrados de total. Por otro lado la suma de cuadrados de los residuales se obtiene como la suma de SC_{FA} y SC_{EP} . De esta forma, cuanto más cerca esté el coeficiente

de determinación de 1, el modelo se ajustará mejor.

$$r^2 = \frac{SC_{TC} - SC_{Res}}{SC_{TC}}$$

Estimados los coeficientes de regresión del modelo de segundo orden, el ajuste se va a regir por la siguiente ecuación polinómica: $I_{Fosf.} = a + a_1 [\text{Agente micelar}] + a_2 [\text{TINO}_3] + a_3 [\text{Na}_2\text{SO}_3] + a_4 [\text{H}_2\text{SO}_4] + a_{12} [\text{Agente micelar}][\text{TINO}_3] + a_{13} [\text{Agente micelar}][\text{Na}_2\text{SO}_3] + a_{14} [\text{Agente micelar}][\text{H}_2\text{SO}_4] + a_{23} [\text{TINO}_3][\text{Na}_2\text{SO}_3] + a_{24} [\text{TINO}_3][\text{H}_2\text{SO}_4] + a_{34} [\text{Na}_2\text{SO}_3][\text{H}_2\text{SO}_4] + a_{11} [\text{Agente micelar}]^2 + a_{22} [\text{TINO}_3]^2 + a_{33} [\text{Na}_2\text{SO}_3]^2 + a_{44} [\text{H}_2\text{SO}_4]^2$, las coordenadas del óptimo se pueden calcular igualando las primeras derivadas parciales con respecto a las cuatro variables a cero y resolviendo el sistema de cuatro ecuaciones con cuatro incógnitas que aparece. El hecho de que alguno de los coeficientes no sea significativo, al valorar el ANOVA, no significa que haya que eliminarlo en el cálculo del óptimo; no significativo significa que no se sabe si su efecto es debido al error aleatorio o a él mismo y, en cualquier caso, no tenerlo en cuenta implicaría hacerlo cero variando el valor de los otros coeficientes.

Conocidas las coordenadas de un extremo de la función, para saber si es un máximo o un mínimo se debe recurrir a alguno de los distintos criterios que existen para la clasificación de las funciones cuadráticas. Uno de ellos se basa en el estudio del determinante hessiano correspondiente, así de este modo si:

$$A_x = \det (D_{ij} F(a)) \text{ donde } 1 \leq i \leq K \text{ y } 1 \leq j \leq K$$

donde F es la forma cuadrática asociada al hessiano de la función, se podrá decir:

i) F definida:

$$\text{positiva "+" , sii } A_x > 0 \quad K=1 \dots n$$

o sea que para cualquier (x_1, \dots, x_n) de \mathfrak{R}^n

$$(x_1, \dots, x_n) * \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 F}{\partial x_1^2} & \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_2} & \dots & \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_n} \\ \vdots & & & \vdots \\ \frac{\partial^2 F}{\partial x_n \partial x_1} & \frac{\partial^2 F}{\partial x_n \partial x_2} & \dots & \frac{\partial^2 F}{\partial x_n^n} \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix} > 0$$

negativa "-", sii $(-1)^k A_x < 0$ $K=1 \dots n$

o sea que para cualquier (x,y,z) de \mathcal{R}^3

$$(x_1, \dots, x_n) * \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 F}{\partial x_1^2} & \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_2} & \dots & \frac{\partial^2 F}{\partial x_1 \partial x_n} \\ \vdots & & & \vdots \\ \frac{\partial^2 F}{\partial x_n \partial x_1} & \frac{\partial^2 F}{\partial x_n \partial x_2} & \dots & \frac{\partial^2 F}{\partial x_n^n} \end{pmatrix} * \begin{pmatrix} x_1 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix} < 0$$

siendo esta condición necesaria y suficiente. Estas condiciones, son a su vez, necesarias y suficientes para garantizar la presencia de un mínimo o un máximo relativo respectivamente para dicha función cuadrática en un punto.

ii) F semidefinida:

positiva "+", entonces $A_x \geq 0$ $K=1 \dots n$

negativa "-", entonces $(-1)^k A_x \geq 0$ $K=1 \dots n$

siendo esta condición necesaria pero no suficiente y algún A_k $K=1 \dots n$ distinto de cero.

Para sistemas de dos, tres o cuatro variables hay que comprobar el signo de los A_k de órdenes 1,2, 3 y/o 4 en el hessiano, y sus signos correspondientes deberían ser -, +, - y/o +, alternándose de esta forma para que se cumpla la condición de máximo impuesta por el criterio; ya que como se puede comprobar, la condición de máximo es que el producto $(-1)^k A_x$ sea positivo para lo cual A_1 debe ser negativo puesto que $(-1)^k$ para $K=1$ es negativo, A_2 debe ser positivo puesto que $(-1)^2$ es positivo, A_3 debe ser negativo puesto que $(-1)^3$ es también negativo y A_4 debe ser positivo puesto que $(-1)^4$ es también positivo. Estas conclusiones se pueden extender fácilmente a cinco o más variables, ya que sólo sería ir comprobando el signo de los distintos A_k del hessiano creado a partir de las segundas derivadas parciales de dicha función con respecto a las distintas variables.

De igual forma, a partir de esta función polinómica de segundo orden se pueden conocer las distintas funciones que relacionan, la intensidad de fosforescencia con las variables de forma univariante, bivariante o trivariante, manteniendo constantes las otras variables experimentales a las condiciones óptimas o a otras condiciones cualesquiera.

Durante la presente Memoria, se ha desarrollado un pequeño programa en BASIC (véase Anexo I) para calcular, a partir de los coeficientes de regresión del polinomio de segundo orden, los valores extremos de dicha función, correspondientes al valor óptimo de las variables experimentales, los hessianos (para su clasificación) y se pueden obtener las funciones que pasando por las coordenadas del óptimo relacionan la variable respuesta con cada una de las variables experimentales de forma univariante, bivariante o trivariante.

3.2.2. Optimización del volumen de muestra.

En todos los métodos espectrofosforimétricos que utilizan Na_2SO_3 como agente desoxigenante, existe una cinética en la reacción de eliminación del oxígeno presente en las disoluciones. La velocidad de esta reacción está afectada por la cantidad de luz que llega a la cubeta de medida, esta energía en forma de luz debe repartirse por toda la muestra contenida en la cubeta, por lo que es lógico pensar en que el tiempo de estabilización de la señal dependa de dicho parámetro. Este estudio fue llevado a cabo introduciendo distintos volúmenes de muestra en la cubeta de medida y registrando la variación de la intensidad de fosforescencia con el tiempo.

3.2.3. Influencia del orden de adición.

Se comprobaron, en todos los casos, distintos órdenes de adición de los analitos y los reactivos experimentales (agente micelar, TlNO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4), para establecer su posible influencia en los métodos establecidos. Para ello se prepararon varias muestras siguiendo distintos órdenes de adición de los reactivos y registrando la intensidad de fosforescencia emitida.

3.2.4. Influencia de la temperatura.

Aunque los métodos propuestos se caracterizan por desarrollarse a temperatura ambiente, es necesario conocer la influencia de la temperatura para una mejor comprensión de los sistemas en estudio. Dicho estudio fue llevado a cabo mediante la termostatación de la célula de medida con un baño de agua, registrando la intensidad de fosforescencia de las muestras a distintas temperaturas que oscilaban entre 10 y 50 °C.

3.2.5. Estabilidad con el tiempo.

Existe una cierta cinética en la reacción de desoxigenación de las disoluciones, pero una vez transcurrida, la señal permanece estable. Es necesario conocer durante cuanto tiempo la señal es estable o al menos, si permanece estable durante un tiempo adecuado para poder realizar las medidas analíticas. Para ello, se registró la intensidad de fosforescencia emitida por las muestras durante un tiempo de una o dos horas.

3.2.6. Influencia de la concentración de analito.

La señal fosforescente no varía linealmente con la concentración de analito en todo el rango posible de concentraciones, ya que, a una cierta concentración se produce una reabsorción de la intensidad emitida, es la zona de saturación. Los métodos analíticos se desarrollan en el rango dinámico lineal, por ello es necesaria su determinación de una forma precisa. Para esto, se estudia la influencia de la concentración de analito, se preparan distintas muestras con diferente cantidad de analito registrando la emisión fosforescente, hasta que la respuesta deja de tener una relación lineal con la concentración.

3.3. Selección de parámetros instrumentales.

3.3.1. Optimización del mínimo período de flash.

Este parámetro es el tiempo entre pulsos, es decir, el tiempo transcurrido entre un flash y el siguiente. La duración del flash es del orden de $12 \mu\text{s}$, pudiendo variar este período de flash entre 5 y 10000 ms. Su optimización es necesaria ya que influye en el tiempo de estabilización de la señal y en la reproducibilidad de las medidas. La cantidad de luz que llega a la cubeta depende del m.p.f., por lo que la cinética de estabilización que depende, a su vez, de la cantidad de luz que llegue a la cubeta, dependerá de este parámetro. Las medidas de emisión fosforescente directa son una media durante un cierto tiempo que va de 0 a 10 s, de las señales que llegan al detector, el m.p.f. está directamente relacionado con ese número de medidas, por tanto, influye en la reproducibilidad de las mismas. Un hecho análogo ocurre en el registro de los espectros, la reproducibilidad de los mismos está relacionada con este parámetro y con la velocidad de barrido. La relación entre m.p.f. y frecuencia se muestra en la Tabla n° R-11.

Tabla nº R-11.- Relación m.p.f./frecuencia de los flash.

m.p.f. (ms)	Frecuencia Flash (Hz)
5	200
10	100
20	50
50	20
100	10
500	2
10000	0'1

3.3.2. Optimización de las longitudes de onda de excitación.

Otra posibilidad de disminuir los tiempos de estabilización de la señal consistió en la utilización de otras longitudes de onda de excitación distintas a la del máximo de excitación del compuesto. Al irradiar las muestras con otras longitudes de onda de excitación se aportan distintas cantidades de energía que pueden influir en el tiempo de estabilización. Sin embargo, la gama de longitudes de onda a utilizar depende de la anchura del espectro de excitación, ya que utilizar un valor fuera de este intervalo supone no poder registrar señales de emisión fosforescente; esto hace que sólo se observen influencias notables en el caso de disponer de un amplio espectro de excitación, no siendo importante su optimización en caso contrario.

3.3.3. Optimización del incremento de longitud de onda.

La optimización del incremento de longitud de onda ($\Delta\lambda$) es necesaria en los casos en los que se desarrollen métodos sincrónicos y sincrónicos-derivados. Dicha optimización se llevó a cabo registrando a una muestra los espectros sincrónicos a distintos incrementos de longitud de onda, y eligiendo como óptimo aquel incremento que genere el espectro sincrónico de mayor intensidad y más estrecho (mayor simplificación espectral).

3.3.4. Optimización de la ruta de trabajo.

En el caso de resolución de mezclas de compuestos por espectrofosforimetría de ángulo variable, es necesario el establecimiento de la ruta de trabajo. Elegidas las condiciones instrumentales óptimas para cada uno de los componentes de la mezcla de

forma independiente, se eligió la ruta más adecuada por el método de ensayo y error, buscando siempre una resolución máxima de todos los analitos así como la mayor sensibilidad posible. Esta ruta está formada por varios tramos consistentes en espectros asincrónicos, en la mayoría de los casos, que transcurren por las coordenadas óptimas de excitación y emisión de cada analito de la mezcla. Los valores de intensidad de fosforescencia se registraron variando conjuntamente los monocromadores de excitación y emisión a las condiciones instrumentales establecidas para cada tramo. En ningún caso se llevó a cabo la utilización de espectros derivados de dichos espectros asincrónicos.

3.3.5. Características espectroscópicas.

Dentro de estas características espectroscópicas se incluyen, los distintos espectros de excitación y emisión directa, el espectro sincrónico y sincrónico-derivados, registrándolos en todos los casos junto a sus blancos, preparados siguiendo el mismo procedimiento operatorio que en las muestras pero sin contener el analito, e indicando sobre dichos espectros las longitudes de onda de medida.

3.3.6. Parámetros instrumentales establecidos.

Como resumen de las optimizaciones instrumentales, se esquematizan todos los parámetros instrumentales establecidos a lo largo de todo el método. Entre estos parámetros se pueden destacar: Longitudes de onda de excitación/emisión de fluorescencia, y fosforescencia, longitudes de onda espectros sincrónicos y derivados, rendijas de excitación/emisión, mínimo período de pulso de la lámpara, velocidad de barrido de los espectros, incremento de longitud de onda de los espectros sincrónicos, tiempo de decaimiento e integración y sensibilidad del detector.

3.4. Establecimiento del método analítico.

3.4.1. Procedimiento operatorio.

Optimizados todos los parámetros experimentales e instrumentales se procede al establecimiento del procedimiento operatorio a seguir en el desarrollo de los métodos propuestos, indicando las condiciones a las cuales se han de llevar a cabo las medidas.

3.4.2. Rectas de calibrado.

Se registraron las distintas rectas de calibrado de los métodos establecidos para cada compuesto estudiado, variando la concentración de dicho compuesto dentro del rango lineal y registrando los distintos espectros a las condiciones expuestas en su procedimiento operatorio correspondiente. A las muestras preparadas se les registraron los espectros de emisión directa, sincrónicos y sincrónico-derivados obteniendo de esta forma distintos métodos espectrofotométricos, excepto para el caso de mezclas de compuestos donde se ha desarrollado el método sincrónico de ángulo variable.

3.4.3. Parámetros de fiabilidad.

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo por dos procedimientos distintos. En un primer lugar, se llevó a cabo el tratamiento propuesto por la IUPAC y en segundo lugar, y de forma comparativa se realizó un método estadístico para el cálculo de estos mismos parámetros basado en la experiencia de calibrado.

a) Según la IUPAC.

El tratamiento estadístico se lleva a cabo mediante los cálculos descritos por la IUPAC (IUPAC, 1978) que indican que es posible establecer unos límites alrededor del valor medio estimado, dentro de los cuales se puede esperar hallar la media de la población con cierto grado de probabilidad. Estos límites se denominan límites de confianza o probabilidad de que sea cierto que la media de la población está comprendida entre ellos. El intervalo definido por los límites alrededor de la media estimada se denomina intervalo de confianza. Se usará, durante todos los cálculos, un nivel de confianza del 95 %.

El intervalo dentro del cual se puede afirmar que se encuentra la media de la probabilidad o nivel de confianza, se puede escribir

$$\bar{x} \pm \frac{t s}{\sqrt{n}}$$

donde \bar{x} es la concentración media obtenida a partir de las muestras analizadas, t es el valor de Student y s es la desviación estándar de estos valores.

Además de estos intervalos, se obtiene el valor del error relativo sobre el valor medio (E_r (conc.)), que evalúa conjuntamente la precisión y exactitud, y el valor de la desviación estándar relativa (DER), que evalúa la precisión de la determinación, y cuyas expresiones son:

$$DER_{conc.} = \frac{100 s}{\bar{x} \sqrt{n}}$$

$$E_r (conc.) = \frac{100 t s}{\bar{x} \sqrt{n}}$$

donde s es la desviación estándar obtenida en los ensayos de repetitividad, expresados en unidades de "señal analítica".

La sensibilidad de un método analítico se define como la capacidad de dicho método para distinguir entre dos concentraciones de analito. Este parámetro viene expresado por la pendiente de la curva de calibrado y se expresa por:

$$S_c = \frac{dA}{dC} = m$$

donde dA/dC es la variación de señal que produce una determinada variación de la concentración del analito.

Los límites de detección y cuantificación (c_L y c_Q) se han calculado en base a los criterios establecidos por la IUPAC, que define dicho límite de detección como la mínima cantidad de analito, expresada en unidades de concentración, distinguible de la correspondiente señal del blanco con un cierto nivel de confianza, y viene expresado por:

$$c_L = \frac{K s_{señal}}{m}$$

donde m es la pendiente de la curva de calibrado y k es un valor numérico elegido, según el nivel de confianza que se desee. Se ha utilizado un valor de $k=3$ correspondiente a un nivel de confianza del 99'86 %.

El límite de cuantificación (ACS Committee on Environmental Improvement, 1980) se establece como el límite inferior del rango dinámico lineal, es decir, como límite inferior de concentraciones por debajo del cual las medidas no ofrecen un determinado nivel de confianza. Viene dado por la expresión:

$$c_Q = \frac{K s_{\text{señal}}}{m}$$

utilizando un valor de $k = 10$.

El término precisión se refiere a la repetitividad o reproducibilidad de un conjunto de medidas repetidas, o el grado de dispersión de las medidas individuales, en torno a su media. El parámetro más útil para establecer la precisión del método de análisis es la desviación estándar. Por otra parte, el término exactitud, se refiere a la diferencia o error entre la media del conjunto de resultados y un valor que se acepta como verdadero o correcto.

El rango dinámico lineal se define como el rango de concentración en el que la curva de la señal analítica es lineal, o la zona donde la pendiente de dicha curva de calibración permanece constante.

Recientemente se define, en la zona más baja, por el límite de determinación, y en la zona más alta por una concentración de analito en la que la señal sufre una desviación específica en términos relativos (por ejemplo un 5%) de la porción de la curva extrapolada, o en la que la pendiente se desvía una determinada cantidad relativa de la pendiente en la porción lineal.

b) Según el método de regresión lineal.

Además del método propuesto por la IUPAC se ha llevado a cabo la estimación de los parámetros de calidad del método analítico instrumental propuesto, a partir de los datos de la experiencia de calibrado, según proponen Cuadros y *col.* (1993).

Este procedimiento propone estimar los parámetros de calidad del método a partir de una serie de réplicas de distintos patrones; para ello es necesario obtener la recta de calibrado, se recomiendan 3 réplicas para 5 valores de concentración, (ACS Committee

on Environmental Improvement, 1980). Estos patrones deben incluir al "blanco" como otro valor más, ya que su señal instrumental está sujeta al mismo tipo de errores que las demás medidas. Miller (1988) recomienda no restar su valor de los obtenidos para el resto de los patrones antes de calcular la ecuación de la recta de regresión, ya que esta operación afectaría a la imprecisión asociada a la determinación de cada valor de concentración. La ecuación de la recta sería:

$$R = a + b c$$

donde **R** indica la señal del instrumento, **c** la concentración, **a** la ordenada en el origen y **b** la pendiente; el cálculo de la ecuación de la recta de calibrado se hace aplicando el modelo estadístico de la regresión lineal, que permite, no sólo encontrar dicha ecuación con el menor error a partir de las medidas experimentales, sino que también suministra una medida de la imprecisión de este cálculo.

Con los datos obtenidos, se calculan los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen, a partir de las ecuaciones correspondientes. Hay que destacar que deben tomarse todas las parejas de valores de forma individual y no calcular la media de las señales para cada patrón de concentración.

Asimismo, se calcula la desviación estándar de regresión de **R** sobre **c**, $s_{R,c}$, mediante la ecuación:

$$s_{R,c} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum (R_i - R_i^c)^2}$$

donde R_i representa el valor de la señal del instrumento, R_i^c es el valor de la señal calculado sobre la recta de regresión correspondiente a la concentración c_i y **n** es el número total de parejas de puntos utilizados para calcular la recta de regresión.

A partir del valor de la desviación estándar de regresión $s_{R,c}$, se calculan las desviaciones estándar de la pendiente s_b , y de la ordenada en el origen, s_a , a través de las ecuaciones:

$$s_b = s_{R,c} \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

$$s_a = s_{R,c} \sqrt{\frac{\sum c_i^2}{n \sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

La determinación de las concentraciones de analito de una disolución problema se puede obtener aplicando la ecuación de la recta de regresión. Sin embargo la estimación de la imprecisión asociada a dicha determinación es más compleja, ya que depende tanto del error en la medida de la señal, como de los errores que implica el uso de la pendiente y de la ordenada en el origen.

La expresión general que calcula la desviación estándar de la concentración sobre los valores obtenidos en una serie de análisis repetitivos (Martín 1990), es:

$$s_c = \frac{s_{R,c}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(R - \bar{R})^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

donde los distintos términos representan:

b: pendiente de la recta de regresión.

$s_{R,c}$: desviación estándar de regresión de R en c.

m: número de repeticiones del análisis.

n: número total de parejas de valores utilizados para calcular la recta de regresión.

R: media aritmética de los valores de señal obtenidos a partir de los m análisis.

\bar{R} : media aritmética de todos los valores de señal utilizados en el cálculo de la recta de regresión.

c_i : cada uno de los valores de concentración determinados en el análisis.

\bar{c} : media aritmética de todos los valores de concentración utilizados en el calibrado.

Se utiliza un valor de la t de Student para un nivel de confianza de $1-\alpha$ (generalmente $\alpha=0.05$) con $n-2$ grados de libertad. El valor de s_c dependerá del número de puntos de calibración y del número de determinaciones realizadas, pudiéndose minimizar la desviación estándar de la concentración haciendo que m sea igual a n.

Operando de esta forma se puede establecer los distintos parámetros de calidad del método basándose en los distintos valores obtenidos:

- Linealidad: En este método se propone a la desviación estándar de la pendiente, **D.S.R. (b)** como medida matemática de la linealidad, que se calcula por el cociente del valor de s_b entre **b**. De esta forma la linealidad vendrá determinada por la diferencia **1-D.S.R. (b)** (expresada en forma de porcentaje).

- Sensibilidad: En este método se propone una expresión derivada del análisis de regresión, cuyo valor es característico del calibrado del método instrumental e independiente del instrumento y de las transformaciones matemáticas llevadas a cabo para la lectura de la señal, siendo así este un buen criterio de comparación:

$$sens. = \frac{s_{R,c}}{b}$$

- Precisión: Matemáticamente, la precisión se puede expresar por la desviación estándar relativa (o coeficiente de variación). Ésta se calcula dividiendo la desviación estándar, s_c , entre el valor medio de concentración determinada, **c**, (generalmente se expresa en forma de porcentaje). De esta forma la desviación estándar relativa de la concentración **D.S.R. (c)**, quedaría como se indica a continuación:

$$DSR (c) = \frac{s_c}{c} 100$$

Este cálculo sólo se puede realizar para las concentraciones utilizadas en la recta de calibrado. Sin embargo, el modelo utilizado permite representar los datos obtenidos para cada valor de concentración y, por interpolación, estimar la precisión para cualquier valor del intervalo de concentraciones del calibrado.

- Límites de detección y determinación: Hay diversas maneras de calcular el límite de detección, aunque para métodos instrumentales la IUPAC recomienda tres veces el valor de la desviación estándar de la señal analítica correspondiente al "blanco", obtenida para, al menos, siete determinaciones, dividida por la pendiente de la recta de calibrado (en realidad se está calculando la desviación estándar de la concentración correspondiente al blanco y no se toma la imprecisión del valor de la pendiente).

En este método se propone la utilización de s_c , utilizando los valores de la señal del "blanco" medidos para establecer la recta de calibrado. De esta forma, el límite de detección se calcularía, utilizando la aproximación de la IUPAC, como indica la ecuación:

$$LD = 3 s_0$$

El límite de determinación (Analytical Methods Committee, 1987), vendría dado únicamente sustituyendo en la misma ecuación el valor 3 por el de 10.

3.4.4. Estudio de interferencias.

Por último, se estudiarán una serie de interferencias que se puedan encontrar habitualmente con el analito. Una interferencia es una sustancia presente en la muestra analítica y que afecta a la magnitud de la señal espectral procedente del analito. La selectividad de un método está relacionada, por tanto, con la ausencia relativa de interferencias.

El criterio de tolerancia para interferencias, según la IUPAC, se basa en el criterio establecido por Sommer (1978), que indica que la concentración limitante del agente interferente debe ser aquella que produce una desviación del valor de la señal analítica mayor que un determinado múltiplo de la desviación estándar de una serie de medidas de la disolución de referencia. Así se ha utilizado como error tolerable el valor de $2s_R$, $6s_R$ o $t_\alpha s_R$ (s_R desviación estándar de la señal calculada a partir de un estudio de la repetitividad de la señal para la concentración de analito deseada utilizando $[\Sigma(R_i - \bar{R})^2 / n - 1]^{1/2}$ y t_α , t de Student al nivel de significación α).

El método basado en la recta de calibrado propone calcular el valor de la desviación estándar de la señal, s_R , utilizando el conjunto de datos obtenidos para establecer la recta de calibrado, valor que es característico del procedimiento analítico utilizado. A partir de él y aplicando el criterio anterior, se puede establecer el nivel mínimo de interferente que produce un error sistemático igual o superior al error accidental de la determinación de analito a una concentración dada.

Para decidir si una sustancia produce interferencia en la determinación de un analito, se mide la señal analítica correspondiente a la concentración de analito seleccionada en presencia del posible interferente. Si el valor obtenido de la señal no está incluido en el intervalo de confianza deducido a partir del calibrado, se supone que se ha producido un error sistemático superior al error aleatorio del método analítico y por tanto,

concluimos que es interferente, mientras que, si la señal está incluida en el intervalo de confianza calculado, se concluye que no hay interferencia.

Para estimar el nivel de tolerancia de una sustancia extraña se mide la señal instrumental para una determinada disolución patrón de analito, R_x , con diferentes concentraciones decrecientes de interferente, c_x , hasta lograr que, al menos, dos medidas consecutivas estén incluidas en el intervalo de confianza de la señal. Con los datos obtenidos y utilizando un método gráfico propuesto por Sommer y *col.* (1978) se representa la señal, R_x , frente a la concentración, c_x . El resultado puede ser una línea recta o, más frecuentemente, una curva que se extrapola para hallar el punto de corte con la línea horizontal superior o inferior (según el caso), que indica la banda de confianza sobre la predicción de la señal. La abcisa de ese punto evaluará el nivel de tolerancia de interferente, expresado en concentración, c_t .

3.5. Aplicaciones.

Optimizadas todas y cada una de las variables experimentales e instrumentales y establecidas las rectas de calibrado y sus parámetros de fiabilidad, así como los niveles de interferentes que toleran los métodos propuestos se procedió a su aplicación en distintas matrices de interés ambiental.



Anexo I

```

10 CLEAR : COLOR 15, 1, 1: SCREEN 12: CLS
20 PRINT "Dado un polinomio de segundo grado con tres variables"
30 PRINT "P(x) = a + a1 [Agente micelar] + a2 [TiNO3] + a3 [Na2SO3] + a4
[H2SO4] + a12 [Agente micelar][TiNO3] + a13 [Agente micelar][Na2SO3] + a14
[Agente micelar][H2SO4] + a23 [TiNO3][Na2SO3] + a24 [TiNO3][H2SO4] + a34
[Na2SO3][H2SO4] + a11 [Agente micelar]2 + a22 [TiNO3]2 + a33 [Na2SO3]2 + a44
[H2SO4]2"
40 PRINT "Donde:"
50 INPUT "a = "; a
60 INPUT "a1 = "; a1
70 INPUT "a2 = "; a2
80 INPUT "a3 = "; a3
90 INPUT "a4 = "; a4
100 INPUT "a12 = "; a12
110 INPUT "a13 = "; a13
120 INPUT "a14 = "; a14
130 INPUT "a23 = "; a23
140 INPUT "a24 = "; a24
150 INPUT "a34 = "; a34
160 INPUT "a11 = "; a11
170 INPUT "a22 = "; a22
180 INPUT "a33 = "; a33
190 INPUT "a44 = "; a44
200 o = (a2 * a12) - (2 * a1 * a22)
210 p = a12 ^ 2 - (4 * a11 * a22)
220 q = (a23 * a12) - (2 * a13 * a22)
230 r = (a24 * a12) - (2 * a14 * a22)
240 s = (a12 * a3) - (a1 * a23)
250 t = (a12 * a13) - (2 * a11 * a23)
260 u = (2 * a33 * a12) - (a13 * a23)
270 v = (a34 * a12) - (a14 * a23)
280 w = (a4 * a12) - (a24 * a1)
290 x = (a14 * a12) - (2 * a11 * a24)
300 y = (a34 * a12) - (a24 * a13)
310 z = (2 * a44 * a12) - (a14 * a24)
320 [Na2SO3] = (((t * r) - (v * p)) * ((w * p) - (o * x)) + ((p * s) - (o * t)) * ((z * p)
- (x * r))) / (((v * p) - (t * r)) * ((y * p) - (q * x)) + ((z * p) - (x * r)) * ((q * t)
- (u * p)))
330 [H2SO4] = (((q * t) - (u * p)) * [Na2SO3] + ((o * t) - (p * s))) / ((v * p) - (t * r))
340 [Agente micelar] = ((-q * [Na2SO3]) - (r * [H2SO4]) - o) / p
350 [TiNO3] = (-a1 - (a13 * [Na2SO3]) - (a14 * [H2SO4]) - (2 * a11 * [Agente micelar]))
/ a12
360 PRINT "[Agente micelar]= "; [Agente micelar]

```

370 PRINT "[TINO₃] = "; [TINO₃]
 380 PRINT "[Na₂SO₃] = "; [Na₂SO₃]
 390 PRINT "[H₂SO₄] = "; [H₂SO₄]
 400 PRINT "F([Agente micelar]) = "; a₁₁; "[Agente micelar]^2 +"; (a₁ + (a₁₂ * [TINO₃]) + (a₁₃ * [Na₂SO₃]) + (a₁₄ * [H₂SO₄])); "[Agente micelar] +"; ((a₂ * [TINO₃]) + (a₃ * [Na₂SO₃]) + (a₄ * [H₂SO₄]) + (a₂₃ * [TINO₃] * [Na₂SO₃]) + (a₂₄ * [TINO₃] * [H₂SO₄]) + (a₃₄ * [Na₂SO₃] * [H₂SO₄]) + (a₂₂ * [TINO₃] * [TINO₃]) + (a₃₃ * [Na₂SO₃] * [Na₂SO₃]) + (a₄₄ * [H₂SO₄] * [H₂SO₄]) + a)

410 PRINT "F([TINO₃]) = "; a₂₂; "[TINO₃]^2 +"; (a₂ + (a₁₂ * [Agente micelar]) + (a₂₃ * [Na₂SO₃]) + (a₂₄ * [H₂SO₄])); "[TINO₃] +"; ((a₁ * [Agente micelar]) + (a₃ * [Na₂SO₃]) + (a₄ * [H₂SO₄]) + (a₁₃ * [Agente micelar] * [Na₂SO₃]) + (a₁₄ * [Agente micelar] * [H₂SO₄]) + (a₃₄ * [Na₂SO₃] * [H₂SO₄]) + (a₁₁ * [Agente micelar] * [Agente micelar]) + (a₃₃ * [Na₂SO₃] * [Na₂SO₃]) + (a₄₄ * [H₂SO₄] * [H₂SO₄]) + a)

420 PRINT "F([Na₂SO₃]) = "; a₃₃; "[Na₂SO₃]^2 +"; (a₃ + (a₁₃ * [Agente micelar]) + (a₂₃ * [TINO₃]) + (a₃₄ * [H₂SO₄])); "[Na₂SO₃] +"; ((a₁ * [Agente micelar]) + (a₂ * [TINO₃]) + (a₄ * [H₂SO₄]) + (a₁₂ * [Agente micelar] * [TINO₃]) + (a₁₄ * [Agente micelar] * [H₂SO₄]) + (a₂₄ * [TINO₃] * [H₂SO₄]) + (a₁₁ * [Agente micelar] * [Agente micelar]) + (a₂₂ * [TINO₃] * [TINO₃]) + (a₄₄ * [H₂SO₄] * [H₂SO₄]) + a)

430 PRINT "F([H₂SO₄]) = "; a₄₄; "[H₂SO₄]^2 +"; (a₄ + (a₁₄ * [Agente micelar]) + (a₂₄ * [TINO₃]) + (a₃₄ * [Na₂SO₃])); "[H₂SO₄] +"; ((a₁ * [Agente micelar]) + (a₂ * [TINO₃]) + (a₃ * [Na₂SO₃]) + (a₁₂ * [Agente micelar] * [TINO₃]) + (a₁₃ * [Agente micelar] * [Na₂SO₃]) + (a₂₃ * [TINO₃] * [Na₂SO₃]) + (a₁₁ * [Agente micelar] * [Agente micelar]) + (a₂₂ * [TINO₃] * [TINO₃]) + (a₃₃ * [Na₂SO₃] * [Na₂SO₃]) + a)

440 PRINT "F([Agente micelar],[TINO₃]) = "; a₁₁; "[Agente micelar]^2 +"; a₂₂; "[TINO₃]^2 +"; (a₁ + (a₁₃ * [Na₂SO₃]) + (a₁₄ * [H₂SO₄])); "[Agente micelar] +"; (a₂ + (a₂₃ * [Na₂SO₃]) + (a₂₄ * [H₂SO₄])); "[TINO₃] +"; a₁₂; "[Agente micelar]*[TINO₃] +"; ((a₃ * [Na₂SO₃]) + (a₄ * [H₂SO₄]) + (a₃₄ * [Na₂SO₃] * [H₂SO₄]) + (a₃₃ * [Na₂SO₃] * [Na₂SO₃]) + (a₄₄ * [H₂SO₄] * [H₂SO₄]) + a)

450 PRINT "F([Agente micelar],[Na₂SO₃]) = "; a₁₁; "[Agente micelar]^2 +"; a₃₃; "[Na₂SO₃]^2 +"; (a₁ + (a₁₂ * [TINO₃]) + (a₁₄ * [H₂SO₄])); "[Agente micelar] +"; (a₃ + (a₂₃ * [TINO₃]) + (a₃₄ * [H₂SO₄])); "[Na₂SO₃] +"; a₁₃; "[Agente micelar]*[Na₂SO₃] +"; ((a₂ * [TINO₃]) + (a₄ * [H₂SO₄]) + (a₂₄ * [TINO₃] * [H₂SO₄]) + (a₂₂ * [TINO₃] * [TINO₃]) + (a₄₄ * [H₂SO₄] * [H₂SO₄]) + a)

460 PRINT "F([Agente micelar],[H₂SO₄]) = "; a₁₁; "[Agente micelar]^2 +"; a₄₄; "[H₂SO₄]^2 +"; (a₁ + (a₁₂ * [TINO₃]) + (a₁₃ * [Na₂SO₃])); "[Agente micelar] +"; (a₄ + (a₂₄ * [TINO₃]) + (a₃₄ * [Na₂SO₃])); "[H₂SO₄] +"; a₁₄; "[Agente micelar]*[H₂SO₄] +"; ((a₂ * [TINO₃]) + (a₃ * [Na₂SO₃]) + (a₂₃ * [TINO₃] * [Na₂SO₃]) + (a₂₂ * [TINO₃] * [TINO₃]) + (a₃₃ * [Na₂SO₃] * [Na₂SO₃]) + a)

470 PRINT "F([TINO₃],[Na₂SO₃]) = "; a₂₂; "[TINO₃]^2 +"; a₃₃; "[Na₂SO₃]^2 +"; (a₂ + (a₁₂ * [Agente micelar]) + (a₂₄ * [H₂SO₄])); "[TINO₃] +"; (a₃ + (a₁₃ * [Agente micelar]) + (a₃₄ * [H₂SO₄])); "[Na₂SO₃] +"; a₂₃; "[TINO₃]*[Na₂SO₃] +"; ((a₁ * [Agente micelar]) + (a₄ * [H₂SO₄]) + (a₁₄ * [Agente micelar] * [H₂SO₄]) + (a₁₁

```

* [Agente micelar] * [Agente micelar]) + (a44 * [H2SO4] * [H2SO4] + a)
480 PRINT "F([TINO3],[H2SO4])= "; a22; "[TINO3]^2 +"; a44; "[H2SO4]^2 +"; (a2 +
(a12 * [Agente micelar] + (a23 * [Na2SO3])); "[TINO3] +"; (a4 + (a14 * [Agente
micelar] + (a34 * [Na2SO3])); "[H2SO4] +"; a24; "[TINO3]*[H2SO4] +"; ((a1 *
[Agente micelar] + (a3 * [Na2SO3] + (a13 * [Agente micelar] * [Na2SO3]) + (a11
* [Agente micelar] * [Agente micelar] + (a33 * [Na2SO3] * [Na2SO3]) + a)
490 PRINT "F([Na2SO3],[H2SO4])= "; a33; "[Na2SO3]^2 +"; a44; "[H2SO4]^2 +"; (a3
+ (a23 * [TINO3] + (a13 * [Agente micelar])); "[Na2SO3] +"; (a4 + (a14 * [Agente
micelar] + (a24 * [TINO3])); "[H2SO4] +"; a34; "[Na2SO3]*[H2SO4] +"; ((a1 *
[Agente micelar] + (a2 * [TINO3] + (a12 * [Agente micelar] * [TINO3]) + (a11
* [Agente micelar] * [Agente micelar] + (a22 * [TINO3] * [TINO3]) + a)
500 A1 = 2 * a11
510 A2 = (2 * a11 * 2 * a22) - (a12 ^ 2)
520 A3 = (2 * a11 * 2 * a22 * 2 * a33) + (a12 * a23 * a13) + (a23 * a12 * a13) - ((a13 ^ 2)
* 2 * a22) - ((a12 ^ 2) * 2 * a33) - ((a23 ^ 2) * 2 * a11)
530 A41 = (2 * a22 * 2 * a33 * 2 * a44) + (a23 * a34 * a24) + (a23 * a34 * a24) - ((a24 ^ 2)
* 2 * a33) - ((a34 ^ 2) * 2 * a22) - ((a23 ^ 2) * 2 * a44)
540 A42 = (a12 * 2 * a33 * 2 * a44) + (a24 * a34 * a13) + (a14 * a23 * a34) - (a24 * a14 * 2
* a33) - (a34 ^ 2 * a12) - (a13 * a23 * 2 * a44)
550 A43 = (a12 * a23 * 2 * a44) + (a24 * a24 * a13) + (a34 * a14 * 2 * a22) - (a23 * a24 *
a14) - (a24 * a34 * a12) - (a13 * 2 * a22 * 2 * a44)
560 A44 = (a12 * a23 * a24) + (a14 * 2 * a33 * 2 * a22) + (a23 * a13 * a24) - ((a23 ^ 2) *
a14) - (a24 * a12 * 2 * a33) - (a13 * a34 * 2 * a22)
570 A4 = (2 * a11) * A41 - a12 * A42 + a13 * A43 - a14 * A44
580 PRINT "A1 ="; A1
590 PRINT "A2 ="; A2
600 PRINT "A3 ="; A3
610 PRINT "A4 ="; A4

```



Parte A

Hidrocarburos aromáticos policíclicos



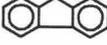
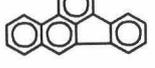
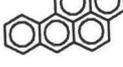
Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos orgánicos constituidos por tres o más anillos aromáticos que pueden estar unidos linealmente, angularmente o bien condensados. En la bibliografía existente acerca de este tipo de compuestos se utilizan otras denominaciones como la de *compuestos aromáticos polinucleares*, *compuestos aromáticos policíclicos*, *materias orgánicas policíclicas* o *compuestos orgánicos policíclicos*. En la presente Memoria se ha optado por emplear el nombre de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su abreviatura de HAP.

En la Tabla nº A-1 se presentan los HAP ordenados por orden creciente de su peso molecular entre los considerados prioritarios por la Environmental Protection Agency (EPA) de E.E.U.U. En dicha tabla se resumen datos sobre su nombre, abreviatura, estructura y puntos de fusión.

Los HAP más simples son los homocíclicos que sólo contienen carbono e hidrógeno, aunque existen cientos de HAP con uno o varios grupos sustituyentes tales como alquilo, amino, cloro, ciano, hidroxilo, oxo o tio. En otro subgrupo se sitúan los derivados heterocíclicos de los HAP que contienen uno o varios heteroátomos en su estructura aromática, tales como nitrógeno, oxígeno o azufre.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se forman por pirólisis o combustión incompleta de combustibles fósiles (petróleos y derivados) y también por combustión de basuras y maderas, por condensación de los radicales etilénicos generados en fase gaseosa, dando lugar a la síntesis de grandes moléculas de HAP (Badger y Kimber, 1960; Badger y Novotny, 1963), estando presentes, por tanto, en los humos y gases de combustión. Ésta es la principal fuente de contaminación por parte de estos compuestos (Fourth annual report on carcinogens, 1985) aunque existen otras como los derrames de crudos petrolíferos o refinados que contienen, de forma natural estos compuestos, por transformación de petróleo y carbón en sus industrias (Funk, 1991) o en los alimentos cocinados a la parrilla, fritos, asados o ahumados, así como el humo del tabaco. Los alimentos que presentan los mayores niveles de HAP (del orden de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) son las carnes asadas a la parrilla de carbón y las ahumadas, las verduras de hoja, los granos, las grasas y los aceites (Menzei y col., 1992).

Tabla n° A-1.- Hidrocarburos aromáticos policíclicos más habituales.

Nombre	Abreviatura	Estructura	Peso molecular (g/mol)
Naftaleno	Naf		128'2
Acenaftileno	Aci		152'2
Acenafteno	Ace		154'2
Fluoreno	Flu		166'2
Fenantreno	Fen		178'2
Antraceno	Ant		178'2
Fluoranteno	Flt		202'3
Pireno	Pir		202'3
Criseno	Cri		228'3
Benz[a]antraceno	BaA		228'3
Benzo[k]fluoranteno	BkF		252'3
Benzo[b]fluoranteno	BbF		252'3
Benzo[a]pireno	BaP		252'3
Benzo[e]pireno	BeP		252'3
Indeno[1,2,3-cd]-pireno	IcdP		276'3
Benzo[g,h,i]perileno	BghiPe		276'3
Dibenzo[a,h]antraceno	DahA		278'4

También se ha detectado la presencia de HAP en el medio interestelar a través del estudio de la emisión infrarroja, en concreto de la llamada fracción no identificada (UIR) y de las bandas interestelares difusas (DIB) (Latter, 1991). Un estudio de este espectro infrarrojo (Siebenmorgen y Krügel, 1992) señala la presencia de tres componentes, entre otros, en el medio interestelar: partículas de carbón de radio $>100 \text{ \AA}$, pequeños granos de grafito de tamaño comprendido entre 4 y 100 \AA e HAP.

En el medio laboral la fuente más importante de HAP es el alquitrán de hulla que se forma por pirólisis de la hulla en fábricas de gas y coquerías, donde se producen emisiones de humos procedentes de la brea caliente. Los operarios que trabajan en las proximidades de los hornos están muy expuestos a estos productos y de forma general, los trabajadores de las industrias del gas y del coque, incluso en instalaciones modernas. En la industria del aluminio también hay una gran exposición a estos HAP debido al proceso electrolítico a alta temperatura, sobre todo cuando se utiliza el electrodo Söderberg que está formado por una mezcla de coque y alquitrán de hulla, y en general en todas aquellas industrias donde se utilicen electrodos de grafito, formados también por coque y alquitrán.

Otras fuentes profesionales de exposición son los procesos siderometalúrgicos donde el alquitrán entra en contacto con el metal fundido. Otra importante fuente es el asfalto que se utiliza para pavimentar calles y carreteras que procede de residuos de destilación de petróleo.

Por la amplia incidencia de estos compuestos y el hecho de que actúen a muy bajas concentraciones, junto con los estudios realizados sobre la posible incidencia de los mismos en la aparición de cáncer en el ser humano, está haciendo que su distribución en los más variados ambientes y productos sea objeto de notable atención por parte tanto de investigadores de diverso tipo, autoridades sanitarias y, cada vez con más fuerza, ciudadanos, asociaciones y partidos políticos.

De lo expuesto hasta el momento se deduce que estos compuestos que están presentes en los gases y humos de combustión llegarán a la superficie de la Tierra a través de la lluvia, alcanzando a las aguas superficiales y subterráneas y, por último, a la cadena alimenticia, es decir, podrán encontrarse en casi todas partes, tanto procedentes de fuentes naturales como antropogénicas. La contribución de las fuentes naturales es mínima si la

se compara con las emisiones causadas por el hombre. Entre las más relevantes se pueden citar las que se originan en los volcanes, durante los incendios forestales, en el proceso de carbonización a temperaturas moderadamente altas durante largos períodos de tiempo a través de síntesis vegetales y bacterianas. Los valores de HAP en aguas superficiales se encuentran entre 0'1 y 830 ng/l, la concentración en este tipo de agua es mayor que en agua subterránea ya que estas son filtradas de forma natural al pasar por diversos terrenos quedando allí retenidos. La atmósfera es un importante camino para el transporte de diversos compuestos incluyendo los HAP. Según los datos obtenidos por el Proyecto National Particulate Network de la EPA (1986-1989), el contenido de HAP en aire ambiente varía entre 1 y cientos de ng/m³, con un valor medio de 2'6 ng/m³, siendo el 72% de los resultados menores de 10 ng/m³.

Los HAP se encuentran en todo tipo de suelos, en suelos de bosque el intervalo de concentraciones encontradas oscila entre 5 y 100 µg/Kg, valores que indican tanto contribución natural como antropogénica. Los suelos de las áreas metropolitanas tienen los mayores niveles de HAP, entre 600 y 3000 µg/Kg debido a las fuentes de combustión de combustibles fósiles.

A la vista de esto se deduce que los HAPs son ubicuos, por lo que cualquier persona se encontrará expuesta a alguno de estos compuestos a lo largo de su vida diaria (Tabla n° A-2).

Tabla n° A-2.- Concentraciones de HAP en el ambiente.

Medio	Concentración media	Rango
Agua	<u>ng/l</u>	<u>ng/l</u>
Superficial	8'0	0'1-830
Manantial	1'2	0'2-6'9
Potable	2'8	0'1-62
Aire	<u>ng/m³</u>	<u>ng/m³</u>
Exterior	5'7	0'2-65
Interior		
Oficinas	1'5	0'6-29
Viviendas	8	1'0-80
Viviendas fumador	13	7-29
Suelo	<u>mg/kg</u>	<u>mg/kg</u>
Bosque	0'05	0'01-1'3
Agrícola	0'07	0'01-1'01
Urbano	1'10	0'06-5'8

Respecto a la dosis potencial que un individuo medio puede recibir diariamente de HAP, debido a que existen muchas fuentes de contaminación (alimentos, aire, agua, suelo, humo de tabaco, etc...) dependerá de la exposición de cada individuo a los mismos. Los valores para cada fuente de contaminación han sido establecidos por Menzie y *col.* (1992). Los alimentos son la principal fuente de HAP para individuos no fumadores; para el caso de zonas urbanas altamente contaminadas el aire es el principal factor. El humo del tabaco es una importante fuente de HAP, por ello los fumadores de cigarrillo sin filtro tienen una dosis potencial doble que los no fumadores.

Dentro de las propiedades químicas de los HAP se deben destacar, por su continuo comentario dentro de la presente Memoria, su solubilidad. Son muy solubles en disolventes apolares dada su naturaleza apolar y muy poco solubles en agua, tanto menos cuanto mayor sea su peso molecular. La solubilidad es una característica que señala la extensión y velocidad de la disolución de los HAP en agua y su persistencia en el ambiente acuático y la extensión en que la biota acuática está expuesta a la acción de los diferentes HAP está controlada, en gran extensión, por su solubilidad.

La solubilidad en agua de los HAP ha sido estudiada por numerosos investigadores (Hill, 1922; Vermillion, 1939; Booth y Everson, 1948; Bohon y Claussen, 1951; Hayashi y Sasaki, 1956; Arnold y *col.*, 1958; McAulliffe, 1966; Franks y *col.*, 1973; Brown y Wasik, 1974; Stears y *col.*, 1974; Mackay y Shiu, 1975; Sutton y Clader, 1975; May y *col.*, 1978; Davis y *col.*, 1942) utilizando diversas técnicas. Entre ellas se puede destacar la equilibración con el HAP seguida de filtración, extracción y determinación por espectrofotometría UV o cromatografía de gases. También se han usado la nefelometría (Davis y *col.*, 1942 y la cromatografía líquida de columna dinámica acoplada (May y *col.*, 1978).

Un aspecto que no hay que olvidar es que los detergentes y los compuestos capaces de producir emulsiones en agua pueden incrementar el contenido en HAP de aguas residuales o naturales, así como la adsorción en partículas sólidas de diversa naturaleza.

Como se observa por amplia incidencia de estos compuestos, las matrices objeto de análisis van a ser muy variadas, por lo que la elección de la técnica de análisis va a depender, básicamente, de las propiedades de los HAP y de la matriz donde se encuentran.

Generalmente se necesitan etapas de extracción y separación previas que eliminan posibles interferencias y, en el caso del análisis de trazas, suele ser necesaria una etapa de preconcentración que permita situar la concentración del analito dentro del intervalo dinámico del método elegido.

Generalmente, debido a la complejidad de las muestras a analizar, es necesaria una separación previa a la detección en la que, las técnicas más empleadas son la cromatografía de gases, cromatografía líquida y cromatografía de fluidos supercríticos, aunque se están desarrollando mucho últimamente la separación mediante electroforesis capilar. Los sistemas de detección más comúnmente empleados son los métodos fotométricos, fluorimétricos o fosforimétricos.

Concretamente, la cromatografía de gases permite la determinación de sustancias que sean suficientemente volátiles y estables térmicamente. Los HAP son moléculas térmicamente estables pero su volatilidad va a depender tanto del número de átomos de carbono como del grado de condensación entre ellos. Se puede situar el límite de aplicación de la técnica en HAP planares con estructuras muy condensadas en un máximo de 24 átomos de carbono (Lesage, 1991; Robbat y *col.*, 1992; Trevelin y *col.*, 1992). La sensibilidad, selectividad y poder de resolución van a depender del tipo de columna y detector empleado. El detector más común empleado es el de ionización de llama, debido tanto a su precio como a su respuesta universal pero su uso es limitado en mezclas complejas, mientras que el empleo del detector de masas prácticamente resuelve toda la problemática de estos compuestos.

La aplicación de la cromatografía líquida al análisis de HAP data de 1976 en que Boden (1976) la aplicaron a la determinación de residuos en muestras de interés ambiental. El requerimiento básico para que un analito pueda ser determinado por esta técnica es que sea suficientemente soluble en la fase móvil, propiedad que, en el caso de los HAP, está relacionada con el número total de átomos de carbono presentes así como su grado de aromaticidad. Así por CLAR se pueden determinar desde derivados alquilbencénicos hasta HAP con 38 átomos de carbono (13 anillos). En cuanto al grado de aromaticidad, al aumentar éste disminuye su solubilidad en disolventes como diclorometano o clorobenceno. Desde la primera aplicación de esta técnica, son numerosos los artículos publicados empleando como sistema de detección, métodos fotométricos o fluorimétricos

(Götze y col., 1991; Velasco y col., 1991; Muñoz de la Peña y col., 1991; Marengo y col., 1992; López y col., 1992; Mori y col., 1993).

Las propiedades físicas de los fluidos supercríticos determinan la mayor eficiencia cromatográfica de la cromatografía que emplea dichos disolventes respecto a la CLAR y CG, observándose un futuro prometedor en el análisis de HAP, principalmente en mezclas complejas ampliando considerablemente las limitaciones impuestas (volatilidad y solubilidad) por la CG y CLAR en cuanto al número de átomos de carbono se refiere. Las propiedades físicas de los fluidos supercríticos permiten el empleo de detectores de ionización de llama, espectrofotométricos, de fluorescencia y proporcionan también posibilidades de acoplar con facilidad detectores de masas aumentando considerablemente la potencialidad de la técnica.

Esta técnica ha permitido la resolución mezclas del naftaleno y coroneno empleando una columna capilar de 20 m y pentano como fase móvil (Smith y col., 1982). Los límites de detección se mejoran sensiblemente al emplear ionización química en lugar de impacto electrónico, situándose en el intervalo 0'1-10 pg. La cromatografía de fluidos supercríticos también se ha aplicado a muestras reales que contenían HAP tales como alquitranes (Sie y Rijnders, 1967) y humos de los tubos de escape de automóviles (Jentoft y Gouw, 1970, 1976).

Debido a que los HAP poseen estructuras altamente condensadas, presentan espectros de absorción UV-Vis muy característicos, con bandas estrechas y generalmente muy bien definidas, propiedad que ha permitido la detección de los mismos por espectrofotometría de UV/Visible. Para mejorar la selectividad de la técnica sin necesidad de una separación previa por los métodos anteriormente citados, se han propuesto métodos de análisis multicomponente empleando para ello tanto la espectrofotometría convencional (Rossi y col., 1984; Rossi y Pardue, 1985) como de derivadas (Ares, 1992), aunque cuando aumenta la complejidad de las muestras y dadas las pequeñas diferencias entre las longitudes de onda de los distintos HAP, estas determinaciones presentan sus limitaciones.

Además de métodos selectivos de análisis, por la incidencia de estos compuestos en matrices complejas, para llevar a cabo la determinación de pequeñas cantidades de los mismos se requerirán metodologías muy sensibles. Las técnicas luminiscentes presentan

como característica inherente la sensibilidad, por lo que constituyen, desde hace varias décadas, procedimiento de rutina en los laboratorio de análisis.

Todos los HAP poseen fluorescencia intrínseca por lo que existen numerosos métodos espectrofluorimétricos directos para su determinación individual (Velapoldi y *col.*, 1983) poniéndose de manifiesto la gran sensibilidad de la técnica, que permite alcanzar límites de detección 100 veces inferiores a los conseguidos por espectrometría de absorción molecular. Sin embargo, existe un gran solapamiento de las bandas fluorescentes de los distintos HAP lo que limita la aplicación de la técnica a muestras muy complejas por falta de selectividad.

La limitación de la selectividad de esta técnica para el análisis de muestras complejas puede ser soslayada de distintas formas, bien aplicando una técnica de separación previa a la detección como la cromatografía líquida o la cromatografía de fluidos supercríticos o bien mediante los procedimientos desarrollados en los últimos años como son el uso de medios micelares o la manipulación instrumental.

La utilización de sistemas organizados ha supuesto un gran avance en este tipo de análisis, pues no sólo se consigue un gran aumento en la selectividad, sino que los analitos al ordenarse en este tipo de medios experimentan una auténtica preconcentración aumentando la sensibilidad y disminuyendo los límites de detección. Su aplicación a la resolución de mezclas de HAP por espectrofluorimetría sincrónica data de hace unos años. Como medios organizados se han utilizado: α -ciclodextrina (Bello y Hurtubise, 1987), β -ciclodextrina (Rubio y *col.*, 1991; Schuette y Warner, 1994; Tachibana y Furusawa, 1994), γ -ciclodextrina (Imasaka y *col.*, 1991; Schuette y Warner, 1994), TX-100 (Santana y *col.*, 1991), cloruro de bencil-dimetil-hexadecilamonio (Rubio Barroso y *col.*, 1991), Pluronic-F 68 (159), Brij-96 (Santana y *col.*, 1992) y polioxietileno 10 lauril éter (Santana y *col.*, 1992) entre otros. Se han propuesto también métodos para la resolución de diferentes mezclas binarias, terciarias (benzo[a]pireno, perileno y criseno (Santana y *col.*, 1992) y cuaternarias, así Yao Qun Li y *col.* (1992) determinan fluoreno, carbazol, antraceno y perileno en mezclas sintéticas por fluorescencia sincrónica derivada de energía constante con límites de detección de 0'75, 1'2, 0'32 y 0'16 $\mu\text{g/l}$ respectivamente.

En cuanto a la manipulación que se puede llevar a cabo a nivel instrumental para

el aumento de selectividad en la detección fluorimétrica se puede destacar la aplicación de la espectrofluorimetría de tiempo resuelto, la obtención de espectros de luminiscencia total (Giering y Horning, 1988), espectros sincrónicos (Lloyd, 1971; Vilchez y *col.*, 1994; Tachibana y Furusawa, 1995), espectros sincrónicos de ángulo variable (Clark y *col.*, 1985; García y Ramos, 1990; Yao Qun y *col.* 1991b; Cabaniss, 1991; Capitán-Vallvey y *col.*, 1995) o la posibilidad de manipular la señal analítica (Jonh y Soutar, 1976; Lloyd y Evett, 1977; Vo-Dinh, 1978; Vo-Dinh y *col.*, 1978; Vo-Dinh y Martínez, 1981; Rubio y *col.*, 1986; Yao Qun y *col.*, 1992).

El desarrollo de la instrumentación con fuentes de excitación moduladas ha permitido el desarrollo de la Espectrofluorimetría a tiempo resuelto. Excitada la muestra se mide la intensidad de fluorescencia a un tiempo determinado, lo que supone un aumento de selectividad de estas técnicas, pues con frecuencia sistemas que poseen espectros de fluorescencia prácticamente idénticos se diferencian en los tiempos de vida media del proceso de relajación. De esta forma midiendo la intensidad de fluorescencia a tiempos adecuados se puede resolver la mutua interferencia. Como fuentes de excitación moduladas se han propuesto la lámpara de xenon y el láser disminuyendo en un orden de magnitud los límites de detección (Yamada, 1992; Panne y *col.*, 1992).

La espectrofluorimetría sincrónica fue introducida por Lloyd (1971) en 1971 quien la aplicó a la resolución de una mezcla de benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno y perileno. Sus principales ventajas en la elucidación de mezclas, respecto a la espectrofluorimetría convencional, radica en el estrechamiento de bandas espectrales y en la simplificación del espectro al desaparecer algunas de ellas. Desde que Lloyd publicase el primer artículo, mediante esta técnica se han resuelto algunas mezclas de HAP (Lloyd, 1971; Jonh y Soutar, 1976; Lloyd y Evett, 1977; Vo-Dinh, 1978; Vo-Dinh y *col.*, 1978; Vo-Dinh y Martínez, 1981; Rubio y *col.*, 1986; Yao Qun y *col.*, 1992; Santana Rodríguez y *col.*, 1993).

Otra técnica de detección muy empleada para la determinación de HAP en numerosas muestras es la fosforescencia a baja temperatura y a temperatura ambiente (Zander, 1968; Vo-Dinh y *col.*, 1981; Vo-Dinh y Martínez, 1981; Scypinski y Cline Love, 1984; Femia y Cline Love, 1985; Ramis y *col.*, 1988; Alak y Vo-Dinh, 1988; Bello y Hurtubise, 1988; Ramis Ramos y *col.*, 1988; Jones y *col.*, 1989; Ramasay y Hurtubise,

1989; Muñoz de la Peña y *col.*, 1991; Weijun y Changsong, 1993a y 1993b; Weijun y *col.*, 1994). Esta técnica supone un considerable aumento de la selectividad al existir la posibilidad de modificar tiempos de vida de luminiscencia mediante la adición de átomos pesados, formación de medios micelares e incluso de adsorción de los HAP sobre soportes como papel, gel de sílice, etc. Ramis y *col.* (1988) establecieron las longitudes de onda fosforescentes de varios HAP a 77 K (medio N₂ líquido) y a temperatura ambiente empleando heptano como disolvente y papel como soporte.

Luego, dependiendo del tipo de hidrocarburo policíclico aromático y la complejidad de la matriz en la que se encuentre presente, la selección de un método u otro de análisis será diferente y requerirá una mayor sensibilidad o selectividad para obtener unos buenos resultados.

A continuación se proponen una serie de métodos de determinación de distintos HAP empleando la técnica de fosforescencia a temperatura ambiente en disolución cuya selectividad es mejorada mediante la manipulación instrumental por medio de la obtención de espectros de fosforescencia sincrónicos, sincrónico-derivados y de ángulo variable, permitiendo el análisis de los mismos en diversas matrices de interés ambiental.



Capítulo I

Determinación fosforimétrica de Acenafteno



1. Características espectroscópicas.

1.1. Características fluorescentes.

Con objeto de conocer las características fluorescentes del acenafteno, se procedió a llevar a cabo un barrido de excitación y emisión en el modo de fluorescencia. Para ello se preparó una disolución madre añadiendo a 100 μl de una disolución $2'4 \cdot 10^{-2}$ M de Ace en *n*-heptano, 100 μl de 1-butanol y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A una alícuota de 50 μl de esta disolución se le añadió 600 μl de SDS 0'5 M y se enrasó con agua destilada hasta 10 ml. Se siguió la técnica operatoria que se describe a continuación: Se fijó el monocromador de excitación a 295 nm, con rendijas de excitación y emisión de 4 nm, la sensibilidad en 520 V y la velocidad de barrido de los monocromadores en 8 nm/s. Se registró el espectro de emisión observando dos máximos a 323 y 340 nm, siendo el primero más intenso. Fijada la longitud de onda de este máximo en el monocromador de emisión, se registró el espectro de excitación, trabajando con las mismas condiciones instrumentales, obteniéndose un máximo de excitación a 294 nm, eligiendo, por tanto, 294 y 323 como longitudes de excitación y emisión fluorescentes del Ace. Dichos espectros se encuentran en la Figura nº I-1.

1.2. Espectros de fosforescencia.

Conocidas las características fluorescentes del Ace, se llevó a cabo un estudio minucioso sobre las posibilidades de determinación fosforescente a temperatura ambiente y en disolución. El procedimiento utilizado fue el siguiente: Se preparó una disolución madre añadiendo a 100 μl de una disolución $2'4 \cdot 10^{-2}$ M de Ace en *n*-heptano, 100 μl de 1-butanol y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A una alícuota de 50 μl de disolución madre se le añadió 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M y se enrasa hasta 10 ml con agua destilada. Se registraron los espectros de excitación y emisión fosforescente; para ello, se fijó la longitud de onda de excitación en 294 nm y se registró el espectro de emisión con una velocidad de barrido de 4 nm/s, m.p.f. 5 ms, la sensibilidad del detector en 750 V, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, un tiempo de decaimiento de 500 μs y un tiempo de integración de 2000 μs , obteniendo dos máximos a 488 y 524 nm, siendo el primero más intenso. Fijando este máximo de emisión en el monocromador respectivo, siempre en las mismas

condiciones instrumentales, se registró el espectro de excitación obteniendo un máximo a 294 nm, considerando que 294 y 488 son los máximos de excitación y emisión fosforescente del Ace. El espectro de fosforescencia se muestra en la Figura n° I-2.

Para una mejor visualización de la emisión fosforescente se ha registrado el espectro de luminiscencia total del Acenafteno. A una disolución preparada de la forma anteriormente descrita se le ha registrado el espectro en las siguientes condiciones instrumentales: Emisión entre 425 y 700 nm, excitación entre 250 y 350 nm, con una velocidad de barrido de 4 nm/s y un paso de monocromador de 2 nm y 4 nm para el de emisión y excitación respectivamente, sensibilidad 750 V, tiempo de decaimiento 500 μ s y tiempo de integración 2000 μ s. El espectro fosforescente de luminiscencia total obtenido en estas condiciones junto con su respectivo mapa de contorno se encuentra representado en la Figura n° I-3.

Luego, las longitudes de onda fosforescentes de medida para el resto del trabajo experimental son:

$$\lambda_{\text{exc}}: 294 \text{ nm y } \lambda_{\text{em}}: 488 \text{ nm}$$

1.2.1. Curva de decaimiento.

Otra característica interesante de los compuestos fosforescentes es la vida media. Para su cálculo se registró la curva de decaimiento de la intensidad de fosforescencia con el tiempo de una muestra preparadas siguiendo la misma metodología que en el apartado anterior, registrando dicha curva a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16, resolución 50 μ s, 100 repeticiones, m.p.f. 5ms y sensibilidad 750 V. La curva de decaimiento obtenida se presenta en la Figura n° I-4.

El ajuste de dicha curva de decaimiento a una función exponencial utilizando el mismo programa del espectrofotómetro conduce al cálculo del parámetro vida media para el acenafteno. Se concluye que, en estas condiciones experimentales la vida media del acenafteno es:

$$\text{Vida media: } 1000 \mu\text{s}$$

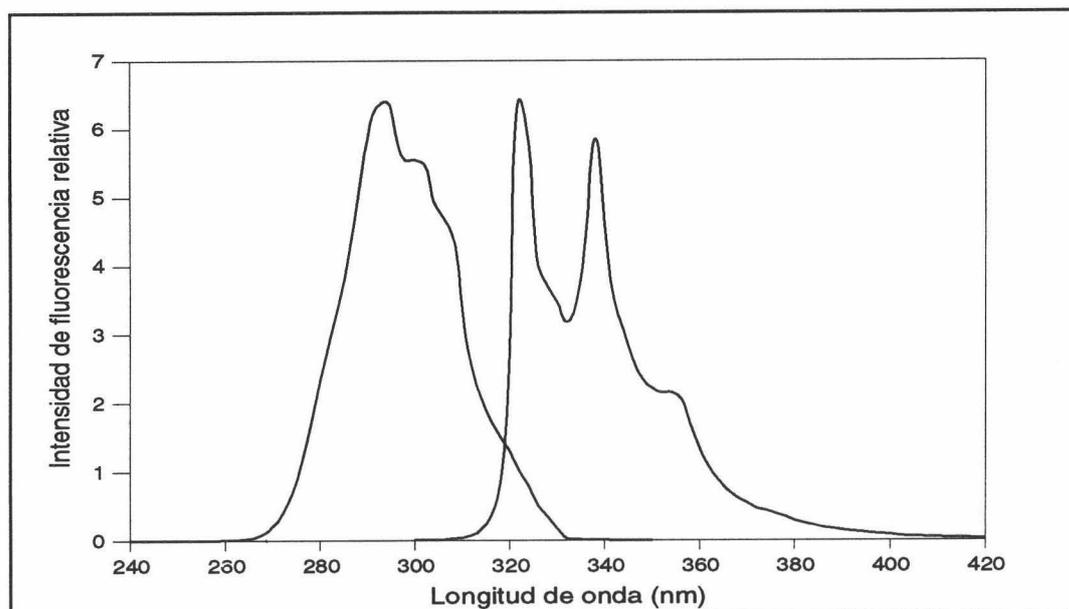


Figura nº I-1.- *Espectros de excitação y emisión de fluorescencia. [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y n-heptano.*

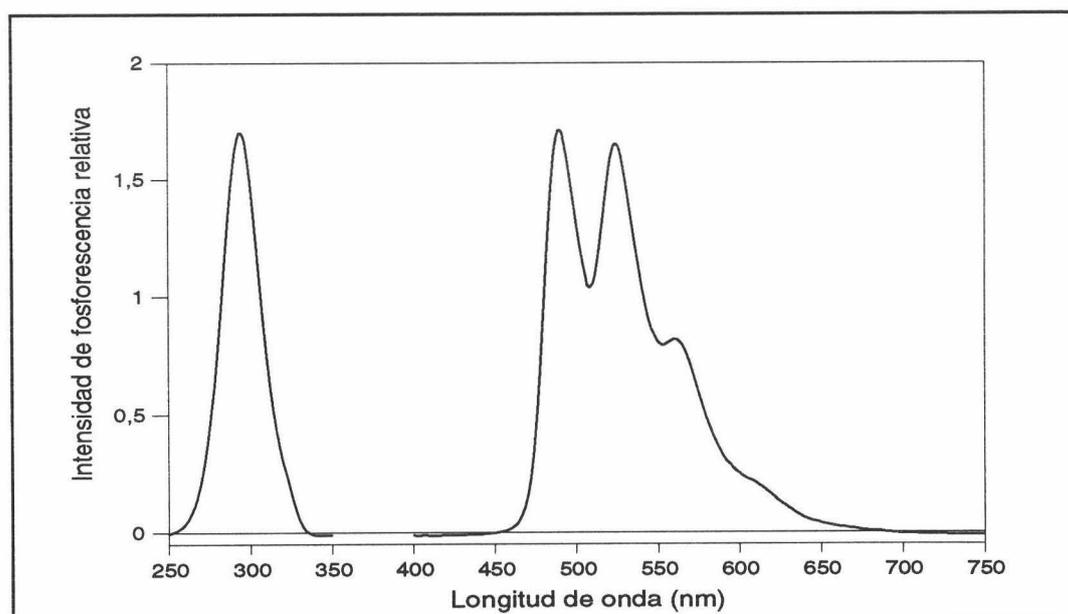


Figura nº I-2.- *Espectros de excitação y emisión de fosforescencia. [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y n-heptano, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

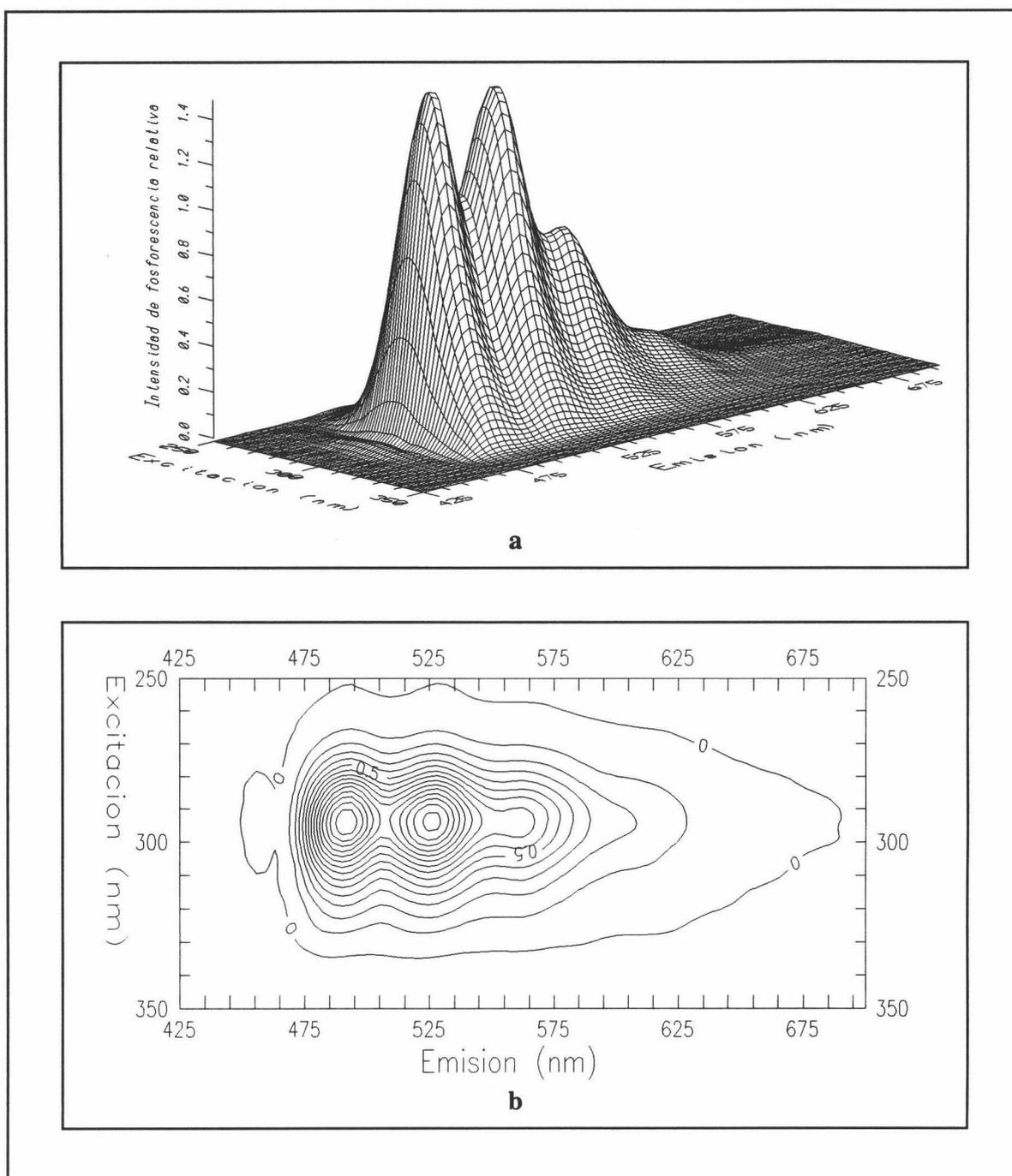


Figura n° I-3.- Espectro de fosforescencia total (a) y mapa de contorno (b). [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y n-heptano, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

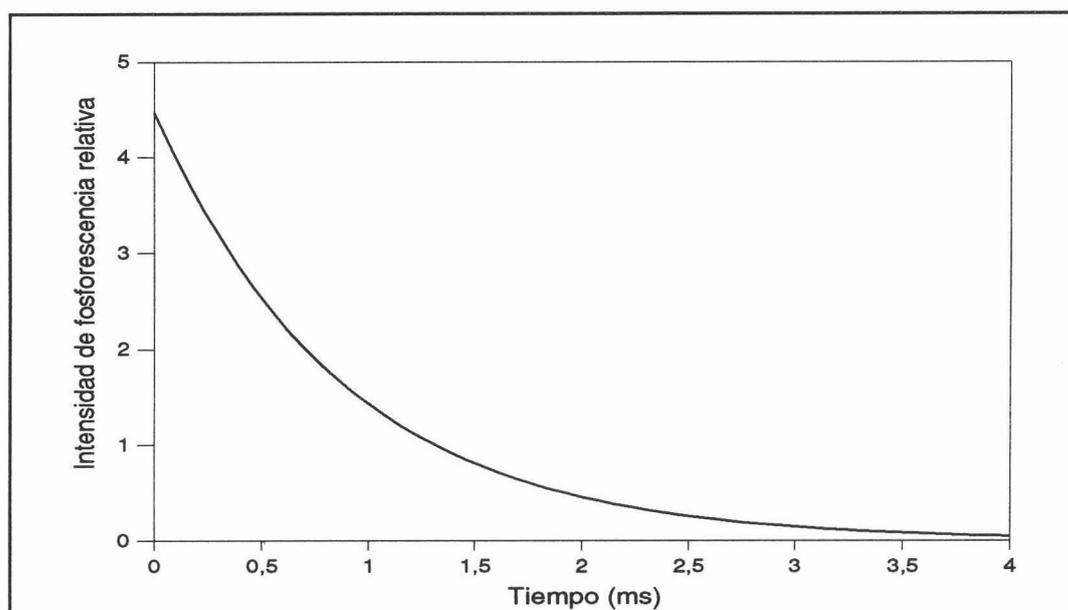


Figura n° I-4.- Curva de decaimiento. *[Ace] 185 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y n-heptano, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

2. Selección de variables experimentales.

2.1. Optimización conjunta de agente micelar, TiNO₃, Na₂SO₃ y H₂SO₄.

Aunque existe bibliografía sobre este tipo de sistemas, la optimización comenzó con la localización de la región experimental óptima. Suponiendo que los óptimos de concentración para SDS, TiNO₃, Na₂SO₃ y H₂SO₄ van a permanecer inalterables para los diferentes tipos de agentes emulsionantes, se optimizaron dichas concentraciones fijando el tipo de agente emulsionante (n-heptano/1-butanol).

La optimización de las concentraciones de estos cuatro reactivos se llevó a cabo, en un primer momento, mediante métodos simplex. Se comenzó por la localización de los óptimos de SDS y TiNO₃, a unas concentraciones constantes de Na₂SO₃ y H₂SO₄. Para ello, a 50 μ l de disolución madre de Ace $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en microemulsión heptano/1-butanol/SDS, se le añaden cantidades variables de SDS 0'5 M y TiNO₃ 0'25 M, tal y como requiere el simplex, así como 500 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 800 μ l de H₂SO₄ 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. A esta disolución se le midió la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em}

16/16 nm, tiempo de decaimiento 500 μ s, tiempo de integración 2000 μ s, m.p.f. de 5 ms y sensibilidad de 750 V. El desarrollo del simplex se muestra en la Tabla n° I-1, y su representación gráfica correspondiente en la Figura n° I-5.

Tabla n° I-1.- Desarrollo del simplex para el sistema Ace - SDS - $TiNO_3$.

Punto	Coord. x	Coord. y	[SDS]	[$TiNO_3$]	$I_{Fosf.}^1$
			$f_x=1'0\cdot 10^{-2}$	$f_y=5'0\cdot 10^{-3}$	
a	0'400	1'000	4'00 $\cdot 10^{-3}$	5'00 $\cdot 10^{-3}$	0'50
b	1'107	1'707	1'11 $\cdot 10^{-2}$	8'54 $\cdot 10^{-3}$	0'65
c	1'366	0'741	1'37 $\cdot 10^{-2}$	3'71 $\cdot 10^{-3}$	0'45
Primer triángulo abc Desecho c: a, b.					
d	0'141	1'966	1'41 $\cdot 10^{-3}$	9'83 $\cdot 10^{-3}$	0'60
Nuevo triángulo abd Desecho a: b, d.					
e	0'848	2'673	8'48 $\cdot 10^{-3}$	1'34 $\cdot 10^{-2}$	0'80
Nuevo triángulo bde Desecho d: b, e.					
f	1'813	2'410	1'81 $\cdot 10^{-2}$	1'21 $\cdot 10^{-2}$	0'70
Nuevo triángulo bef Desecho b: e, f.					
g	1'558	3'377	1'56 $\cdot 10^{-2}$	1'69 $\cdot 10^{-2}$	1'00
Nuevo triángulo efg Desecho f: e, g.					
h	0'606	3'640	6'06 $\cdot 10^{-3}$	1'82 $\cdot 10^{-2}$	0'85
Nuevo triángulo egh Desecho e: g, h.					
i	1'313	4'346	1'31 $\cdot 10^{-2}$	2'17 $\cdot 10^{-2}$	1'40
Nuevo triángulo ghi Desecho h: g, i.					
j	2'270	4'074	2'27 $\cdot 10^{-2}$	2'04 $\cdot 10^{-2}$	1'05
Nuevo triángulo gij Desecho g: i, j.					
k	2'030	5'043	2'03 $\cdot 10^{-2}$	2'52 $\cdot 10^{-2}$	1'20
Nuevo triángulo ijk Desecho j: i, k.					
l	1'067	5'315	1'07 $\cdot 10^{-2}$	2'67 $\cdot 10^{-2}$	1'32
Nuevo triángulo ikl Desecho k: i, l.					
m	0'350	4'610	3'50 $\cdot 10^{-3}$	2'31 $\cdot 10^{-2}$	1'20

¹ $\lambda_{exc/em}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V

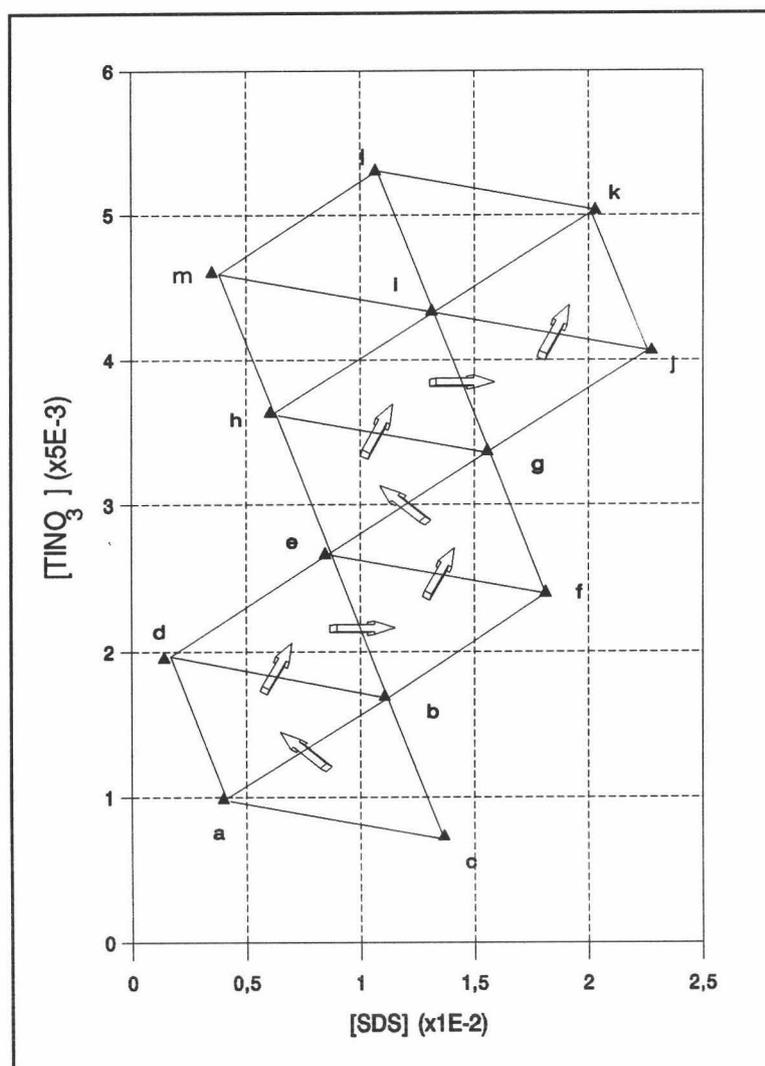


Figura n° I-5.- Simplex bidimensional del sistema: Ace - SDS - $TiNO_3$.

El simplex conduce hasta valores de SDS y de $TiNO_3$ del orden de $1'30 \cdot 10^{-2}$ M y $2'20 \cdot 10^{-2}$ M, respectivamente. Conocidos los óptimos de concentración para los reactivos, SDS y $TiNO_3$, se procedió a la localización de los rangos para las concentraciones de Na_2SO_3 y H_2SO_4 . Para ello se procedió de forma análoga al caso anterior, a $50 \mu l$ de disolución madre de Ace $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en microemulsión heptano/1-butanol/SDS, se le añaden cantidades variables de Na_2SO_3 0'1 M y H_2SO_4 0'02 M, tal y como requiere el simplex, así como $300 \mu l$ de SDS 0'5 M y $900 \mu l$ de $TiNO_3$ 0'25 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. El desarrollo del simplex se muestra en la Tabla n° I-2, y su representación gráfica correspondiente en la Figura n° I-6.

Tabla n° I-2.- Desarrollo del simplex bidimensional para el sistema
Ace - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

Punto	Coord. x	Coord. y	$\frac{[\text{Na}_2\text{SO}_3]}{f_x=1'0\cdot 10^{-3}}$	$\frac{[\text{H}_2\text{SO}_4]}{f_y=3'0\cdot 10^{-4}}$	$I_{\text{Fosf.}}^1$
a	0'500	1'000	$5'00\cdot 10^{-4}$	$3'00\cdot 10^{-4}$	0'40
b	1'500	1'000	$1'50\cdot 10^{-3}$	$3'00\cdot 10^{-4}$	0'50
c	1'000	1'866	$1'00\cdot 10^{-3}$	$5'60\cdot 10^{-4}$	0'60
Primer triángulo abc					
Desecho a: b, c.					
d	2'000	1'866	$2'00\cdot 10^{-3}$	$5'60\cdot 10^{-4}$	0'92
Nuevo triángulo bcd					
Desecho b: c, d.					
e	1'500	2'732	$1'50\cdot 10^{-3}$	$8'20\cdot 10^{-4}$	1'02
Nuevo triángulo cde					
Desecho c: d, e.					
f	2'500	2'732	$2'50\cdot 10^{-3}$	$8'20\cdot 10^{-4}$	1'16
Nuevo triángulo def					
Desecho d: e, f.					
g	2'000	3'600	$2'00\cdot 10^{-3}$	$1'08\cdot 10^{-3}$	1'30
Nuevo triángulo dfg					
Desecho e: f, g.					
h	3'000	3'600	$3'00\cdot 10^{-3}$	$1'08\cdot 10^{-3}$	1'40
Nuevo triángulo fgh					
Desecho f: g, h.					
i	2'500	4'466	$2'50\cdot 10^{-3}$	$1'34\cdot 10^{-3}$	1'42
Nuevo triángulo ghi					
Desecho g: h, i.					
j	3'500	4'466	$3'00\cdot 10^{-3}$	$1'34\cdot 10^{-3}$	1'45
Nuevo triángulo hij					
Desecho h: i, j.					
k	3'000	5'330	$4'00\cdot 10^{-3}$	$1'60\cdot 10^{-3}$	1'50
Nuevo triángulo ijk					
Desecho i: j, k.					
l	4'000	5'330	$3'50\cdot 10^{-3}$	$1'60\cdot 10^{-3}$	1'40
Nuevo triángulo jkl					
Desecho l: k, l.					
m	3'500	6'196	$2'50\cdot 10^{-3}$	$1'86\cdot 10^{-3}$	1'35
Nuevo triángulo klm					
Desecho l: k, m.					
n	2'500	6'196	$2'00\cdot 10^{-3}$	$1'86\cdot 10^{-3}$	1'38
Nuevo triángulo kmn					
Desecho m: k, n.					
ñ	2'000	5'330	$3'50\cdot 10^{-3}$	$1'60\cdot 10^{-3}$	1'30

¹ $\lambda_{\text{exc/em}}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V

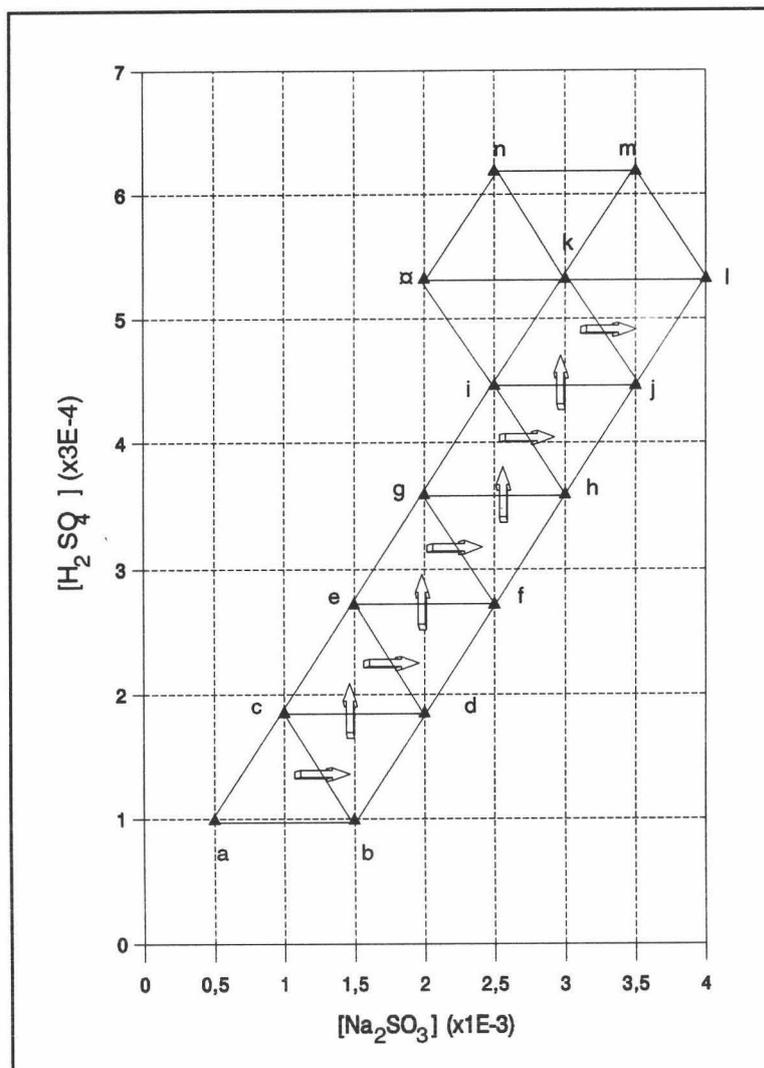


Figura nº I-6- Simplex bidimensional del sistema: Ace - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

El simplex conduce hasta valores de Na_2SO_3 y H_2SO_4 del orden de $3'00 \cdot 10^{-3}$ M y $1'60 \cdot 10^{-3}$ M, respectivamente. Conocidos los rangos de concentración óptimos para las cuatro variables experimentales se llevó a cabo un diseño experimental compuesto hiper-cúbico estrellado. Para ello, a $50 \mu\text{l}$ de disolución madre de Ace $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en microemulsión heptano/1-butanol/SDS, se le añaden cantidades variables de SDS $0'5$ M, TINO_3 $0'25$ M, Na_2SO_3 $0'1$ M y H_2SO_4 $0'02$ M, tal y como lo requiere el diseño. A esta disolución se le midió la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 294/488 nm, rendijas $_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, tiempo de decaimiento $500 \mu\text{s}$, tiempo de integración $2000 \mu\text{s}$, m.p.f. de 5 ms y sensibilidad de 750 V.

La matriz del diseño empleado junto con los valores de pH y de intensidad de fosforescencia se muestran en la Tabla n° I-3. Mediante la observación de la tabla del análisis de la varianza (Tabla n° I-4), se puede conocer el tipo de influencia que ejercen cada una de las variables experimentales sobre la intensidad de fosforescencia. Tanto los coeficientes tanto lineales como cuadráticos correspondientes a las concentraciones de SDS y TINO₃, son significativos, mientras que la relación de la intensidad de fosforescencia con las concentraciones de Na₂SO₃ y H₂SO₄ es sólo cuadrática. Los dos únicos términos cruzados significativos son los que relacionan las concentraciones de SDS y Na₂SO₃ y Na₂SO₃ con H₂SO₄. El modelo de segundo orden propuesto se ajusta a los datos experimentales tal y como se deduce al observar el valor de significación del fallo de ajuste en la tabla del ANOVA y del valor del coeficiente de determinación 0'9347.

La valoración del diseño permite la localización del óptimo del sistema y establecer de forma gráfica la dependencia de la intensidad de fosforescencia con las concentraciones de SDS, TINO₃, Na₂SO₃ y H₂SO₄, en el rango de concentraciones que comprende el diseño (véase Figura n° I-7). Los coeficientes de regresión así como el óptimo calculado con su correspondiente verificación se presentan en la Tabla n° I-5. De igual forma, se puede conocer la variación de la intensidad de fosforescencia para cada dos variables; este estudio se refleja en la Figura n° I-8, donde se muestran las superficies de respuesta de la intensidad de fosforescencia frente a las concentraciones de SDS y TINO₃ o SDS y Na₂SO₃ o SDS y H₂SO₄ o TINO₃ y Na₂SO₃ o TINO₃ y H₂SO₄ o Na₂SO₃ y H₂SO₄, manteniendo constantes, en cada caso, las otras variables a las concentraciones óptimas calculadas a partir del diseño. Las curvas de respuesta están representadas mediante líneas isofosforescentes que localizan, de una forma gráfica, la posición del óptimo para cada dos variables.

Para el resto del trabajo experimental, se han seleccionado las siguientes concentraciones de trabajo:

$$\begin{aligned}[\text{SDS}] &= 1'92 \cdot 10^{-2} \text{ M} \\[\text{TINO}_3] &= 2'42 \cdot 10^{-2} \text{ M} \\[\text{Na}_2\text{SO}_3] &= 4'34 \cdot 10^{-3} \text{ M} \\[\text{H}_2\text{SO}_4] &= 1'37 \cdot 10^{-3} \text{ M}\end{aligned}$$

Tabla nº I-3.- *Diseño experimental: Ace - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Punto	Variables experimentales				pH	I _{Fosf.} ¹
	[SDS] (·10 ⁻²)	[TlNO ₃] (·10 ⁻²)	[Na ₂ SO ₃] (·10 ⁻³)	[H ₂ SO ₄] (·10 ⁻³)		
1	3'00(0)	2'50(0)	5'00(0)	1'60(0)	6'64	1'50
2	2'00(-1)	2'00(-1)	4'50(-1)	1'80(1)	6'44	1'27
3	2'00	3'00(1)	4'50	1'80	6'27	1'28
4	2'00	2'00	4'50	1'40(-1)	6'67	1'47
5	4'00(1)	3'00	4'50	1'40	6'70	1'37
6	2'00	2'00	5'50(1)	1'40	6'88	1'16
7	4'00	2'00	5'50	1'40	6'93	1'14
8	4'00	3'00	4'50	1'80	6'51	1'10
9	4'00	2'00	4'50	1'40	6'75	1'39
10	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	1'54
11	4'00	2'00	5'50	1'80	6'93	1'51
12	2'00	3'00	5'50	1'40	6'84	1'06
13	4'00	3'00	5'50	1'40	6'90	1'19
14	4'00	2'00	4'50	1'80	6'57	1'09
15	2'00	3'00	4'50	1'40	6'62	1'47
16	2'00	3'00	5'50	1'80	6'59	1'43
17	4'00	3'00	5'50	1'80	6'68	1'42
18	2'00	2'00	5'50	1'80	6'70	1'34
19	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	1'57
20	0'94(-2'058)	2'50	5'00	1'60	6'60	1'50
21	3'00	3'52(2'058)	5'00	1'60	6'61	1'20
22	5'06(2'058)	2'50	5'00	1'60	6'66	1'24
23	3'00	1'47(-2'058)	5'00	1'60	6'75	1'40
24	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	1'55
25	3'00	2'50	5'00	1'19(-2'058)	6'90	1'26
26	3'00	2'50	5'00	2'01(2'058)	6'40	1'23
27	3'00	2'50	3'97(-2'058)	1'60	6'44	1'21
28	3'00	2'50	6'03(2'058)	1'60	6'84	1'20
29	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	1'58

¹ [Ace] 185 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 294/488 nm, $rendijas_{exc/em}$ 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V.

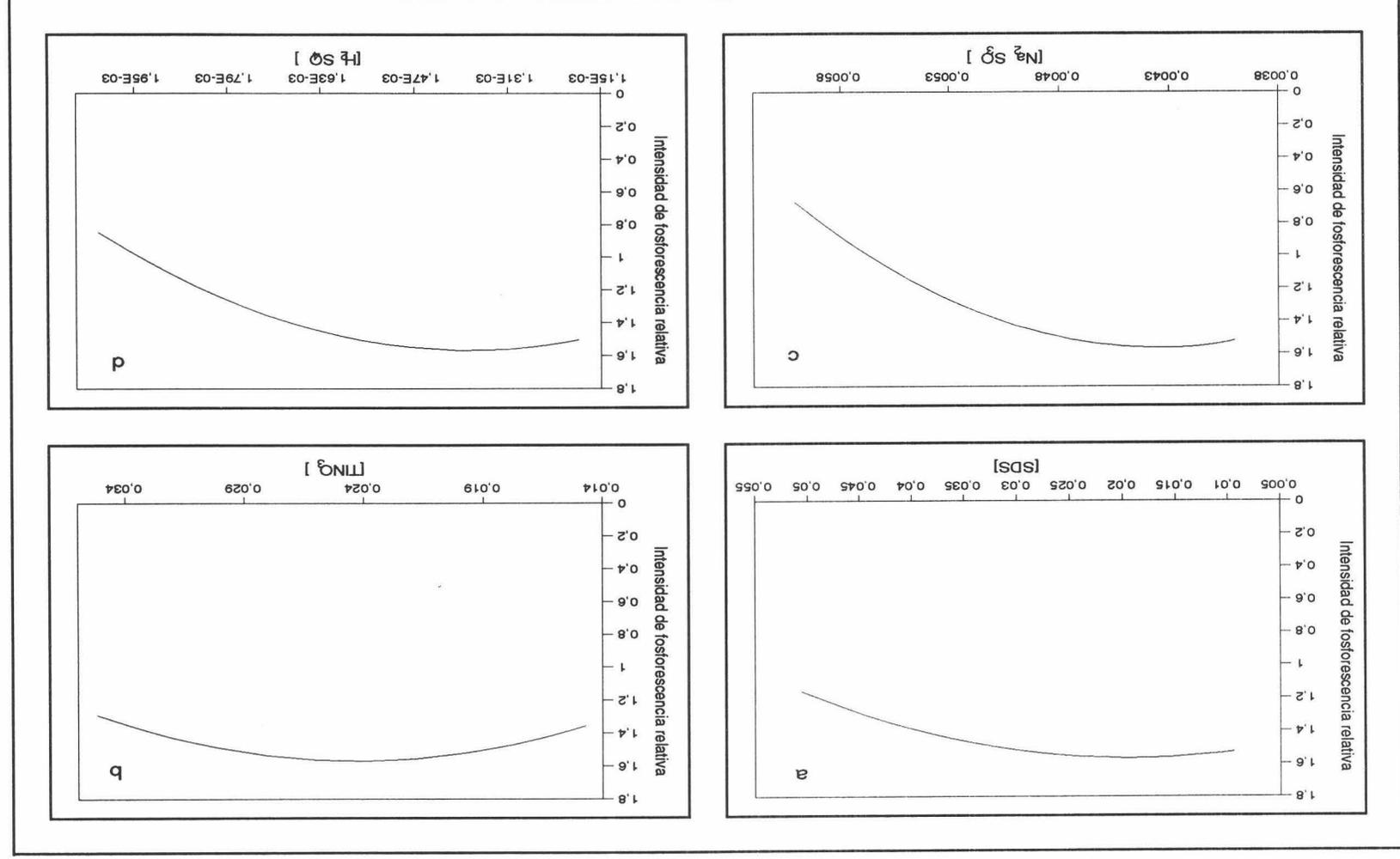
Tabla n° I-4.- *Análisis de la varianza.*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0264868	1	0'0264868	27'31	0'0064
a ₂	0'0087072	1	0'0087072	8'98	0'0401
a ₃	0'0018121	1	0'0018121	1'87	0'2435
a ₄	0'0006723	1	0'0006723	0'69	0'4603
a ₁₂	0'0001562	1	0'0001562	0'16	0'7127
a ₁₃	0'0410062	1	0'0410062	42'27	0'0029
a ₁₄	0'0010563	1	0'0010563	1'09	0'3556
a ₂₃	0'0001562	1	0'0001562	0'16	0'7121
a ₂₄	0'0005063	1	0'0005063	0'52	0'5173
a ₃₄	0'2782562	1	0'2782562	286'86	0'0001
a ₁₁	0'0505433	1	0'0505433	52'11	0'0020
a ₂₂	0'0977793	1	0'0977793	100'80	0'0006
a ₃₃	0'1865897	1	0'1865897	192'36	0'0002
a ₄₄	0'1457285	1	0'1457285	150'24	0'0003
Fallo de ajuste	0'0428457	10	0'0042846	4'42	0'0826
Error Puro	0'0038800	4	0'0009700		
Total	0'7152552	28			

Tabla n° I-5.- *Valoración del diseño: Ace - SDS - TINO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Coeficientes				
a ₁ = -20'4828				
a ₂ = 112'974				
a ₃ = 849'937				
a ₄ = -842'554				
a ₁₂ = -62'5				
a ₁₃ = 10125	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo		
a ₁₄ = -4062'2			[SDS] = 2'05·10 ⁻² M	A ₁ < 0
a ₂₃ = -1250			[TINO ₃] = 2'42·10 ⁻² M	A ₂ > 0
a ₂₄ = 5625			[Na ₂ SO ₃] = 4'46·10 ⁻³ M	A ₃ < 0
a ₃₄ = 1'31875·10 ⁶	[H ₂ SO ₄] = 1'42·10 ⁻³ M	A ₄ > 0		
a ₁₁ = -422'829		Es un máximo		
a ₂₂ = -2352'43				
a ₃₃ = -324965				
a ₄₄ = -1'79492·10 ⁶				
a = -0'889				

Figura n° I-7.- Variación de la intensidad de fosforescencia del acenafeno con la [SDS] (a), [TNO₃] (b), [Na₂SO₃] (c) y [H₂SO₄] (d). [Ace] 185 ng/ml, 0'005 % n-heptano y l-butanol, $\lambda_{exc/em}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V.



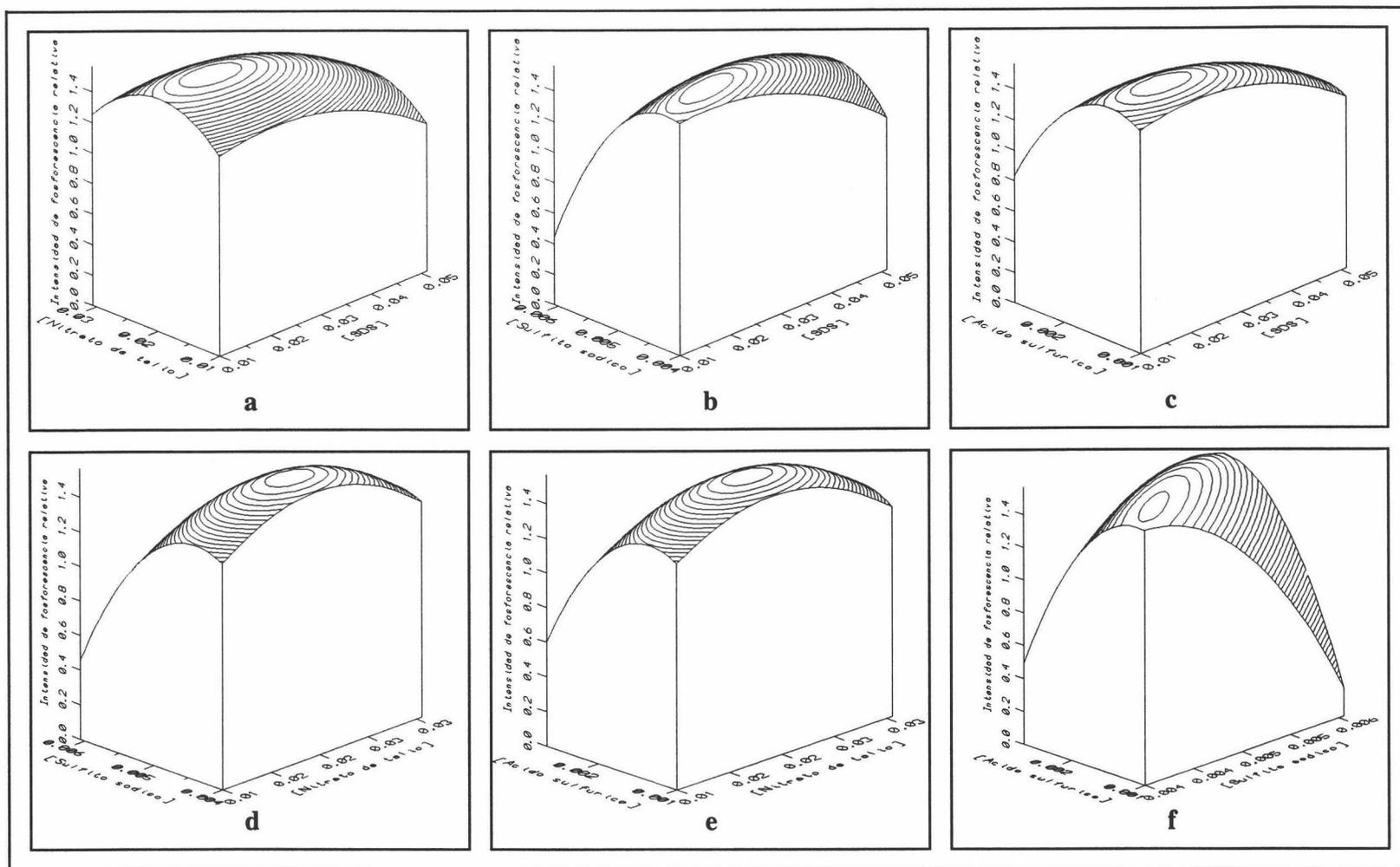


Figura n° I-8.- Variación de la intensidad de fosforescencia con $[SDS]$ y $[TlNO_3]$ (a), $[SDS]$ y $[Na_2SO_3]$ (b), $[SDS]$ y $[H_2SO_4]$ (c), $[TlNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TlNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). $[Ace]$ 185 ng/ml, 0'005 % n-heptano y 1-butanol, $\lambda_{exc/em}$ 294/488 nm, rendijas $_{exc/em}$ 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V.

Como se comentó en la parte de "Reactivos, instrumentación y metodología", la eliminación del O₂ contenido en el corazón micelar se produce al reaccionar éste en la superficie de la micela con grupos SO₃²⁻. Esta reacción está favorecida por la presencia de H₂SO₄ en el medio, tal y como se deducía de los equilibrios presentados.

Existe un intervalo de pH comprendido entre 6-7'5 para el cual se favorece el proceso de desoxigenación de las muestras, intervalo que es la resultante de los equilibrios que intervienen en este tipo de sistemas (Weijun y col., 1994). Al adicionar Na₂SO₃ y H₂SO₄ al medio aparece, in situ, una disolución tampón formada por SO₃²⁻ y HSO₃⁻, que ayuda al mantenimiento del valor del pH próximo a 7. El pH de esta disolución tampón viene definido por la expresión:

$$pH = pK_a + \log \frac{[SO_3^{2-}]}{[HSO_3^-]}$$

La dependencia entre la intensidad de fosforescencia y el pH se puede corroborar al observar el mapa de contorno de la superficie de respuesta de la intensidad de fosforescencia frente a las concentraciones de Na₂SO₃ y H₂SO₄ de la figura anterior. Dicho mapa de contorno se muestra en la Figura nº I-9.

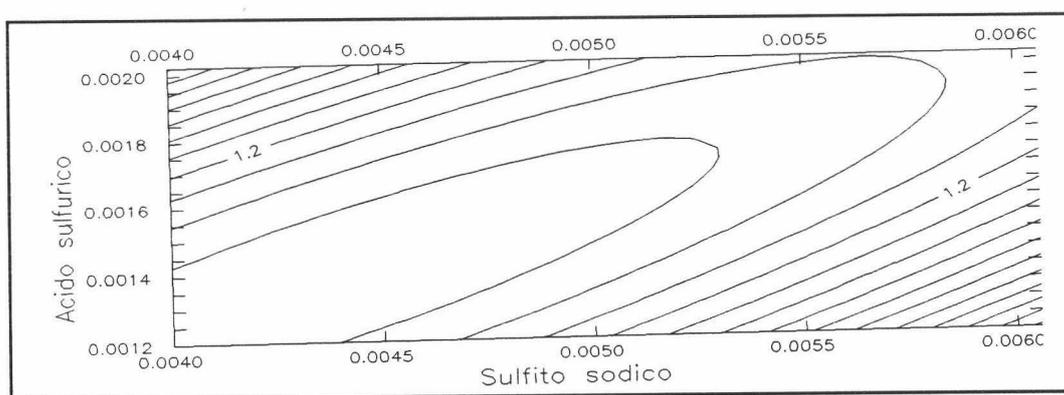


Figura nº I-9.- Mapa de contorno de la intensidad de fosforescencia frente a las concentraciones de Na₂SO₃ y H₂SO₄.

Se comprueba al observar esta figura que el pH, y por tanto la intensidad de fosforescencia depende de la relación entre la concentración de Na₂SO₃ y H₂SO₄, tal y como se deduce del paralelismo existente entre las curvas de nivel.

2.2. Selección del tipo de microemulsión.

Los HAP son muy solubles en disolventes apolares y muy poco solubles en agua. Los agentes micelares, como el SDS, aumentan la solubilidad de dichos compuestos en agua, sin embargo, este aumento es relativo, por lo que se recurre a la utilización de microemulsiones para mejorar la solubilidad y desarrollar métodos de trabajo más cómodos y rápidos. Conocidas las concentraciones óptimas de SDS, TINO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 , y admitiendo que éstas permanecen inalterables para cualquier tipo de agente emulsionante, se procedió a la selección de éste.

Para llevar a cabo esta experiencia se utilizó el siguiente procedimiento: Se prepararon una serie de disoluciones mezclando $100 \mu\text{l}$ de una disolución $2'4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ de Ace en hidrocarburo (*n*-pentano, *n*-hexano o *n*-heptano) con $100 \mu\text{l}$ de co-surfactante (*l*-butanol o *l*-pentanol) y enrasando hasta 10 ml con SDS $0'5 \text{ M}$. A una alícuota de $50 \mu\text{l}$ de estas disoluciones se le añadieron $410 \mu\text{l}$ de SDS $0'5 \text{ M}$, $968 \mu\text{l}$ de TINO_3 $0'25 \text{ M}$, $446 \mu\text{l}$ de Na_2SO_3 $0'1 \text{ M}$ y $710 \mu\text{l}$ de H_2SO_4 $0'02 \text{ M}$, enrasando con agua destilada hasta 10 ml , registrando la emisión fosforescente. Los resultados se reflejan en la Tabla nº I-6.

Tabla nº I-6.- Selección del tipo de microemulsión.

Agente emulsionante	$I_{\text{Fosf.}}^1$
N-pentano/ <i>l</i> -butanol	1'23
N-pentano/ <i>l</i> -pentanol	1'40
N-hexano/ <i>l</i> -butanol	1'29
N-hexano/ <i>l</i> -pentanol	1'39
N-heptano/ <i>l</i> -butanol	1'55
N-heptano/ <i>l</i> -pentanol	1'45

¹ [Ace] 185 ng/ml, $\lambda_{\text{exc/em}}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, t_{wg} 500/2000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V.

Se observa que los mejores resultados se obtienen empleando *n*-heptano como hidrocarburo y *l*-butanol como co-surfactante. Por ello, el agente emulsionante seleccionado para el resto del trabajo experimental fue:

Agente emulsionante: *n*-heptano/*l*-butanol

Elegida esta mezcla se procedió a determinar la proporción óptima de ambos constituyentes. Para ello, se prepararon disoluciones madre de Ace $2'4 \cdot 10^{-4}$ M con distinto contenido en *n*-heptano y 1-butanol; se tomaron 50 μ l de cada una de ellas, y se les añadió 410 μ l de SDS 0'5 M, 968 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 446 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 710 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml. Se midió la intensidad de fosforescencia en las mismas condiciones que la Tabla n° I-6 y los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla n° I-7, indicando las proporciones de *n*-heptano y 1-butanol que forman parte de las disoluciones madre estudiadas.

Tabla n° I-7.- Proporción de *n*-heptano y 1-butanol.

Microemulsión	% N-heptano	% 1-butanol	$I_{Fosf.}$
1	1	0	No estable
2	1	1	1'36
3	2	0	No estable
4	2	1	No estable
5	2	2	1'40
6	3	3	1'47
7	4	4	No estable
8	5	5	No estable
9	0	1	1'29
10	0	2	1'36
11	1	1	1'36
12	1	2	1'38
13	1	3	1'44
14	1	4	1'48
15	1	5	1'44
16	1	6	1'40

No existen diferencias significativas entre las distintas proporciones estudiadas, siendo inestables las microemulsiones en las cuales la proporción de *n*-heptano es mayor que la de 1-butanol y las que no contienen 1-butanol. Las microemulsiones formadas únicamente por 1-butanol presentan una intensidad de fosforescencia menor. La mayor intensidad se obtiene en las microemulsiones donde es mayor la proporción de 1-butanol que de *n*-heptano, produciéndose este aumento hasta proporciones de 1-butanol del 4%; a partir de este porcentaje la intensidad de fosforescencia comienza a disminuir.

Esta última conclusión obligaría a trabajar con microemulsiones cuya proporción de 1-butanol fuera del 4%. Sin embargo, la existencia de una cinética de desoxigenación, obliga a adquirir un compromiso entre conseguir mayores intensidades de fosforescencia o menores tiempos de estabilización. En la Figura nº I-10, se representan la intensidad de fosforescencia y los tiempos de desoxigenación de varias de las microemulsiones estudiadas.

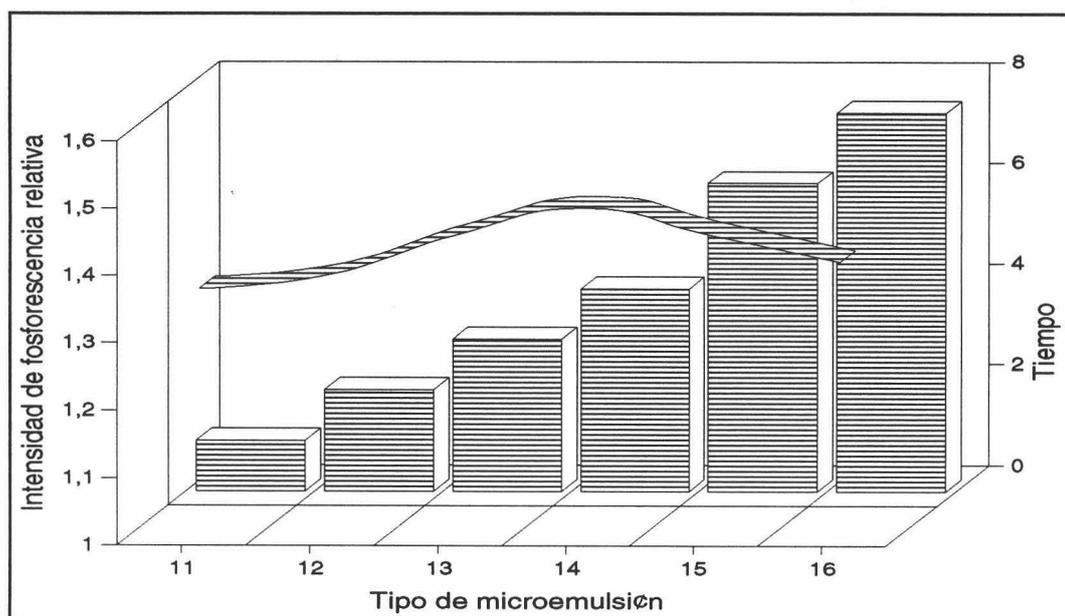


Figura nº I-10.- Intensidad de fosforescencia y tiempo de medida para distintas microemulsiones. [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $2'05 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'42 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'46 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'42 \cdot 10^{-3}$ M.

El hecho de que la intensidad de fosforescencia aumente a medida que lo hace el porcentaje de 1-butanol, puede deberse a la rigidez estructural que confiere al sistema los posibles enlaces de hidrógeno que se forman entre las moléculas de 1-butanol, que a su vez, produce un aumento del volumen del corazón micelar aumentando las desactivaciones no radiativas. El aumento de los tiempos de estabilización puede deberse al aumento de la rigidez del sistema que impide una fácil desoxigenación del corazón micelar. Por lo tanto, para el resto del trabajo experimental se eligieron las siguientes proporciones:

n-heptano/1-butanol: 1%/1%

2.3. Optimización del volumen de muestra.

El volumen de muestra fue la primera variable experimental que se estudió para disminuir el tiempo de estabilización de las señales fosforescentes. Este tiempo depende de la cantidad de luz que llegue a la disolución por unidad de volumen, por tanto, para una cierta fuente de luz, existe una relación entre el volumen de muestra y el tiempo de medida. Para llevar a cabo esta experiencia, se procedió de la siguiente forma: Se prepararon una serie de disoluciones adicionando a 50 μl de una disolución madre de Ace $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en *n*-heptano/1-butanol/SDS, 410 μl de SDS 0'5 M, 968 μl de TlNO_3 0'25 M, 446 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 710 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones se colocaron distintos volúmenes entre 1 y 4 ml en la cubeta de medida, registrando la variación de la intensidad de fosforescencia con el tiempo a las condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, t_{dlg} 500/2000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V. Este estudio se refleja en la Figura nº I-11.

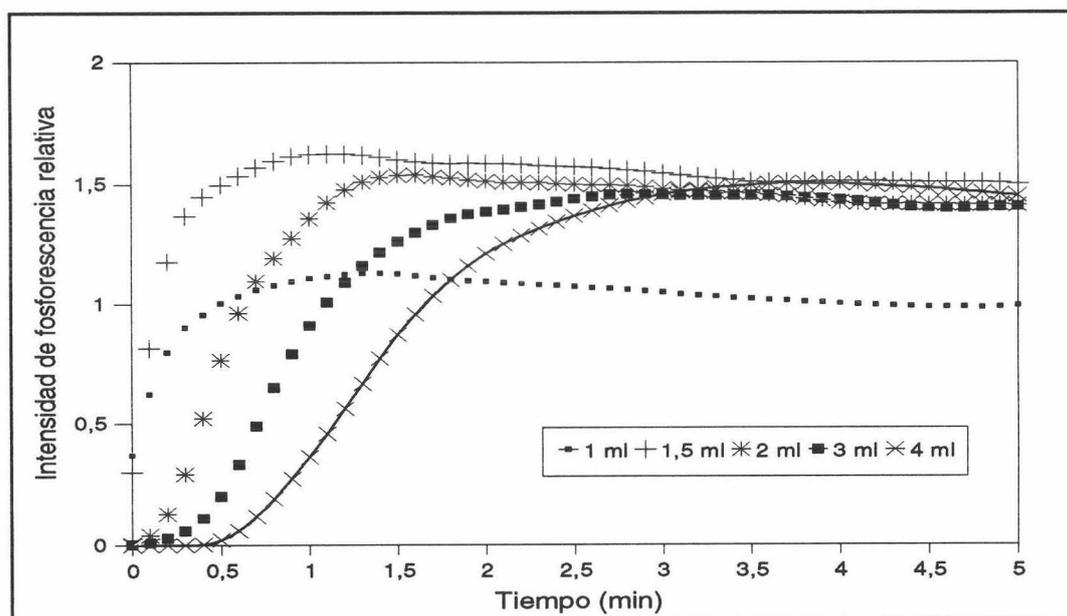


Figura nº I-11.- Optimización del volumen de muestra. [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $2'05 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y *n*-heptano, [TlNO_3] $2'42 \cdot 10^{-2}$ M, [Na_2SO_3] $4'46 \cdot 10^{-3}$ M y [H_2SO_4] $1'42 \cdot 10^{-3}$ M.

A medida que se disminuye el volumen de muestra desde 4 ml (volumen máximo de las cubetas de cuarzo de 1x1 cm) hasta 1'5 ml (volumen mínimo al cual incide el haz

de la lámpara con la disolución), el tiempo de medida va disminuyendo, permaneciendo constante la intensidad de fosforescencia. Por tanto, para el resto del trabajo experimental, se consideró óptimo el siguiente volumen de muestra:

Volumen muestra: 1'5 ml

2.4. Influencia del orden de adición.

Se han estudiado distintos órdenes de adición no observándose diferencias significativas entre ellos. Para llevar a cabo esta experiencia se prepararon una serie de disoluciones mezclando disolución Ace $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en *n*-heptano/1-butanol/SDS, SDS, TINO₃, Na₂SO₃ y H₂SO₄ en distintos órdenes, de forma que las concentraciones finales fueran: [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $1'92 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y *n*-heptano, [TINO₃] $2'42 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'34 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'37 \cdot 10^{-3}$ M. De estas disoluciones así preparadas se introdujeron 1'5 ml en la cubeta de medida y se midió la intensidad de fosforescencia. Los resultados se reflejan en la Tabla nº I-8.

Tabla nº I-8.- Influencia del orden de adición.

Orden de adición	I _{Fosf.} ¹
Ace + SDS + TINO ₃ + Na ₂ SO ₃ + H ₂ SO ₄ + H ₂ O	1'55
Ace + TINO ₃ + H ₂ SO ₄ + SDS + Na ₂ SO ₃ + H ₂ O	1'53
Ace + H ₂ SO ₄ + TINO ₃ + Na ₂ SO ₃ + SDS + H ₂ O	1'51
Ace + TINO ₃ + SDS + H ₂ SO ₄ + Na ₂ SO ₃ + H ₂ O	1'50
Ace + SDS + TINO ₃ + H ₂ SO ₄ + Na ₂ SO ₃ + H ₂ O	1'49
TINO ₃ + H ₂ SO ₄ + SDS + Na ₂ SO ₃ + Ace + H ₂ O	1'47
SDS + H ₂ SO ₄ + Na ₂ SO ₃ + Ace + TINO ₃ + H ₂ O	1'53
TINO ₃ + Ace + Na ₂ SO ₃ + SDS + H ₂ SO ₄ + H ₂ O	1'52
Na ₂ SO ₃ + SDS + Ace + H ₂ SO ₄ + TINO ₃ + H ₂ O	1'49

¹ $\lambda_{exc/em}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V.

No se observaron diferencias significativas entre los distintos órdenes de adición probados, por lo que se mantuvo el orden de adición hasta ahora utilizado y que fue:

Acenafteno + SDS + TINO₃ + Na₂SO₃ + H₂SO₄ + H₂O

2.5. Influencia de la temperatura.

El método espectrofosforimétrico propuesto se puede llevar a cabo a temperatura ambiente pero ésta puede sufrir variaciones, por lo que se procedió a observar el efecto de la influencia de la temperatura en la intensidad de fosforescencia del Ace. Para ello, se utilizó el siguiente procedimiento: Se prepara una disolución conteniendo 50 μl de una disolución madre de Ace $2'4 \cdot 10^4$ M en *n*-heptano/1-butanol/SDS, 410 μl de SDS 0'5 M, 968 μl de TlNO_3 0'25 M, 446 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 710 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml, se introducen 1'5 ml de la misma en una cubeta de medida y se mide la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V. La temperatura del baño que termostatiza la célula de medida se varió entre 10 y 45 °C a intervalos de 5 °C. La variación de la intensidad de fosforescencia con la temperatura se refleja en la Figura n° I-12.

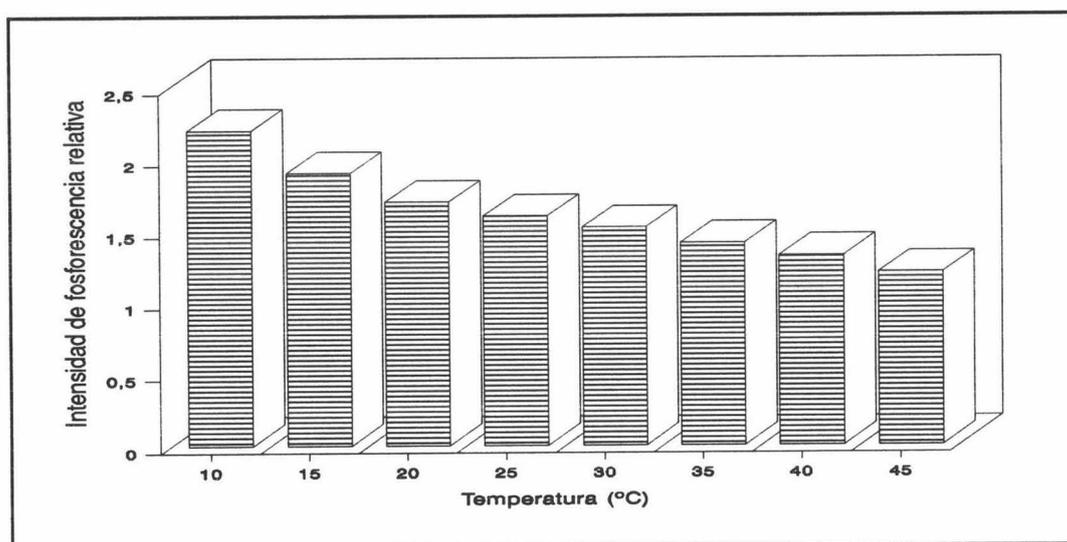


Figura n° I-12.- *Influencia de la temperatura.* [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $2'05 \cdot 10^2$ M, 0'005 % 1-butanol y *n*-heptano, [TlNO_3] $2'42 \cdot 10^2$ M, [Na_2SO_3] $4'46 \cdot 10^3$ M y [H_2SO_4] $1'42 \cdot 10^3$ M.

Se observa que la intensidad de fosforescencia aumenta conforme va disminuyendo la temperatura. Esto se debe a que la energía interna de las moléculas disminuye, y por tanto, las desactivaciones por choques intermoleculares son menores. A la vista de estos

resultados, para el resto del trabajo experimental se termostatarán las muestras a:

Temperatura: 25 °C

2.6. Estabilidad con el tiempo.

Como se ha visto anteriormente, existe una cierta cinética en la reacción de desoxigenación de las disoluciones, pero una vez transcurrida, se debe conocer durante cuanto tiempo la señal permanece estable. Para llevar a cabo esta experiencia se siguió el procedimiento operatorio del apartado anterior manteniendo constante la temperatura del baño a 25 °C. Este estudio es el que se muestra en la Figura nº I-13.

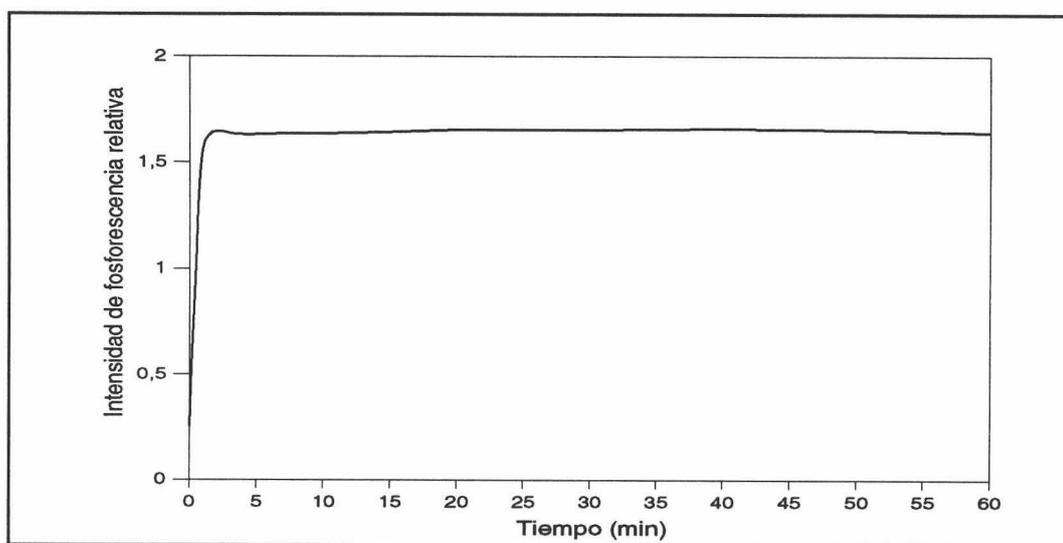


Figura nº I-13.- Estabilidad con el tiempo. [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $2'05 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y n-heptano, [TlNO₃] $2'42 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'46 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'42 \cdot 10^{-3}$ M.

Se observa que la señal analítica, tras un pequeño tiempo de 2 minutos, permanece estable al menos durante una hora, por lo que, para el resto del trabajo experimental las muestras se medirán, después de prepararlas, a un tiempo de 2 minutos.

2.7. Influencia de la concentración de analito.

El estudio de la influencia de la concentración de analito ayuda a determinar, de

forma precisa, el rango dinámico lineal donde se puede desarrollar el método, así como se obtiene información adicional sobre el comportamiento de este sistema en esas condiciones de trabajo. A distintas alícuotas de una disolución madre de Ace $2'4 \cdot 10^4$ M en n-heptano/1-butanol/SDS se le adicionan 410 μ l de SDS 0'5 M, 968 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 446 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 710 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml de forma que la concentración de Ace variara entre 0 a 400 ng/ml. De estas muestras, así preparadas, se introducen 1'5 ml en la cubeta de medida, y se mide la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 294/488 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V. La representación gráfica de este estudio se refleja en la Figura n° I-14.

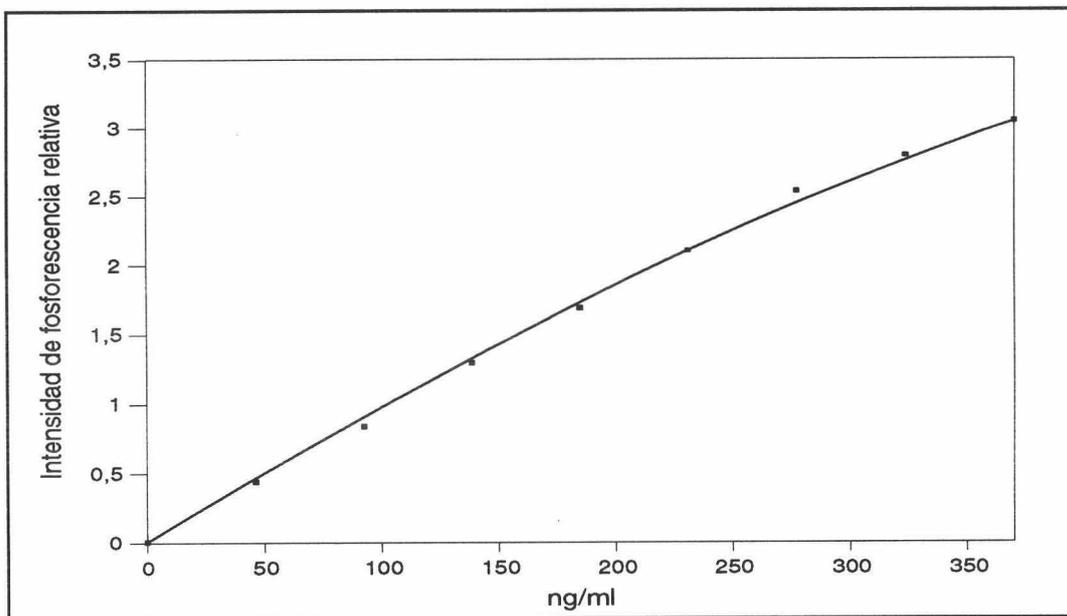


Figura n° I-14.- Influencia de la concentración. [SDS] $2'05 \cdot 10^2$ M, [TlNO₃] $2'42 \cdot 10^2$ M, [Na₂SO₃] $4'46 \cdot 10^3$ M y [H₂SO₄] $1'42 \cdot 10^3$ M.

Observando esta figura se comprueba que existe un amplio rango de linealidad para la señal analítica desde una concentración de 0 a 275 ng/ml; a partir de esta concentración se produce una ligera desviación de la linealidad, por lo que el rango de linealidad se considera comprendido entre:

Rango dinámico lineal: 0-275 ng/ml

3. Selección de parámetros instrumentales.

Optimizadas las distintas variables experimentales se procedió, siguiendo la misma metodología, a optimizar las variables instrumentales. Entre ellas destacan: mínimo período de flash de la lámpara de pulso, longitud de onda de excitación, incremento de longitud de onda de los espectros sincrónicos y las características espectroscópicas.

3.1. Optimización del mínimo período de flash.

Siempre que exista dependencia entre el tiempo de medida y la cantidad de luz que llegue a la cubeta es conveniente optimizar la velocidad de la lámpara de pulso. Para ello, se prepararon unas muestras adicionando a $50 \mu\text{l}$ de una disolución madre de Ace $2'4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ en *n*-heptano/*l*-butanol/SDS, $410 \mu\text{l}$ de SDS $0'5 \text{ M}$, $968 \mu\text{l}$ de TINO_3 $0'25 \text{ M}$, $446 \mu\text{l}$ de Na_2SO_3 $0'1 \text{ M}$ y $710 \mu\text{l}$ de H_2SO_4 $0'02 \text{ M}$ y enrasando con agua destilada hasta 10 ml . De estas disoluciones se introdujeron $1'5 \text{ ml}$ en la cubeta de medida, y se registró la evolución de la señal de fosforescencia con el tiempo a $\lambda_{\text{exc/em}} 294/488 \text{ nm}$, rendijas_{exc/em} $16/16 \text{ nm}$, $t_{\text{d/g}}$ $500/2000 \mu\text{s}$ y sensibilidad 750 V , manteniendo la cubeta irradiada a distintos m.p.f.. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura nº I-15.

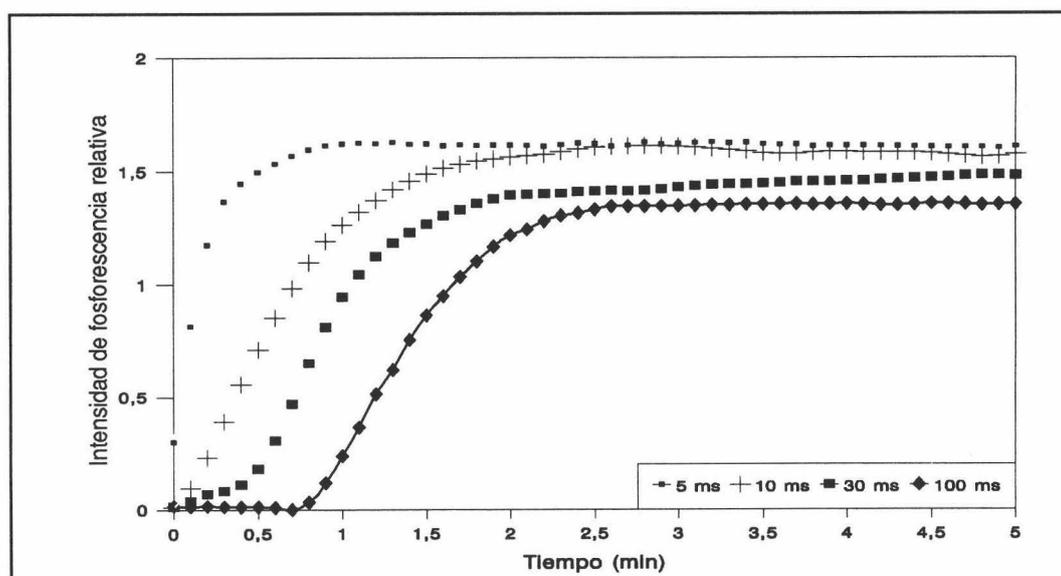


Figura nº I-15.- Optimización del m.p.f.. [Ace] 185 ng/ml , [SDS] $2'05 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $0'005 \%$ *l*-butanol y *n*-heptano, [TINO_3] $2'42 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, [Na_2SO_3] $4'46 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ y [H_2SO_4] $1'42 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

De esta figura se deduce que a medida que aumenta el m.p.f., el tiempo de medida pasa de ser 0'5 min con un m.p.f. de 5 ms a 2'5 min con un m.p.f. de 100 ms, por lo que convendrá utilizar la lámpara de pulso a la mayor velocidad posible, puesto que las medidas son más reproducibles y se obtiene la máxima intensidad en el menor tiempo posible. Luego el valor de este parámetro seleccionado para el resto del trabajo experimental es:

m.p.f.: 5 ms

3.2. Optimización de la longitud de onda de excitación.

Otra posibilidad de disminuir los tiempos de medida consiste en la utilización de otras longitudes de onda distintas a la del máximo de excitación del acenafteno. Sin embargo, este estudio presenta un primer inconveniente, y es que al utilizar longitudes de onda en las cuales no absorbe este analito, no se puede seguir el desarrollo de la cinética de la reacción de desoxigenación. Por este motivo, el campo de longitudes de onda estudiadas se reduce a la anchura del espectro de excitación.

La experiencia desarrollada es muy similar a la anterior, *se prepararon una serie de muestras al igual que en el apartado anterior, y se introducen 1'5 ml en la cubeta de medida, irradiándola con la lámpara de pulso a un m.p.f. de 5 ms y a distintas longitudes de onda de excitación.* Los resultados se reflejan en la Figura nº I-16.

A longitudes de onda menores o iguales a la de excitación, el tiempo de espera para realizar las medidas se minimiza, no siendo las diferencias muy significativas. Sin embargo, el uso de longitudes de onda menos energéticas provoca un retraso cada vez más importante en el tiempo de estabilización de la señal. Es importante destacar, que las intensidades relativas de fosforescencia en este caso no poseen importancia, puesto que las señales de fosforescencia son inherentes a cada pareja de longitudes de onda de excitación y emisión. Por tanto, la longitud de onda de excitación elegida para el resto del trabajo experimental es:

Longitud de onda de excitación: 294 nm
--

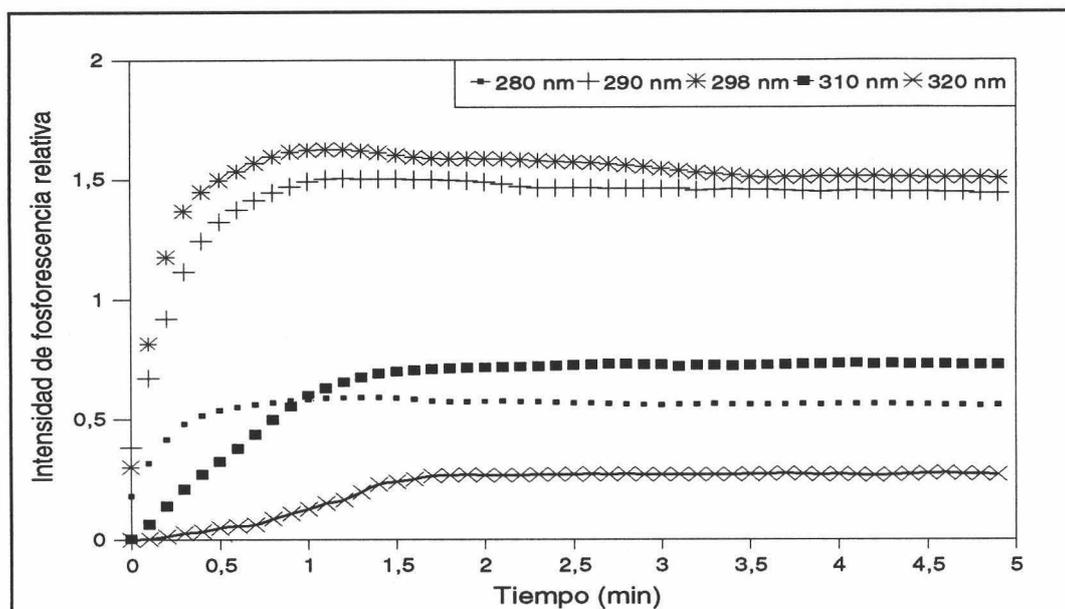


Figura nº I-16.- *Influencia de la longitud de onda de excitación en el tiempo de medida. [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $2'05 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y n-heptano, [TiNO₃] $2'42 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'46 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'42 \cdot 10^{-3}$ M.*

3.3. Optimización del incremento de longitud de onda.

La optimización del incremento de longitud de onda ($\Delta\lambda$) es necesario para el posterior desarrollo de métodos sincrónicos y sincrónico-derivados. Para llevar a cabo esta optimización se siguió el siguiente procedimiento operatorio: a 50 μ l de una disolución madre de Acenafteno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol se le añaden 410 μ l de SDS 0'5 M, 968 μ l de TiNO₃ 0'25 M, 446 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 710 μ l de H₂SO₄ 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones así preparadas se introducen 1'5 ml dentro de la cubeta de medida, iluminándola con una lámpara de pulso a las siguientes condiciones instrumentales: rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V. Se registraron los espectros sincrónicos utilizando distintos $\Delta\lambda$, entre 170 a 250 nm a intervalos de 10 nm, obteniendo los resultados de la Figura nº I-17.

Se observa que para valores de incremento de longitud de onda menores a 190 nm, el espectro sincrónico es ancho y de poca intensidad, mientras que para valores superiores vuelve a ser más ancho y aparecen dos máximos, además de disminuir la intensidad de

fosforescencia. Por ello, para obtener un espectro sincrónico centrado, simétrico y con la máxima intensidad de fosforescencia, el incremento de longitud de onda seleccionado, para el resto del trabajo experimental fue:

$$\Delta\lambda: 190 \text{ nm}$$

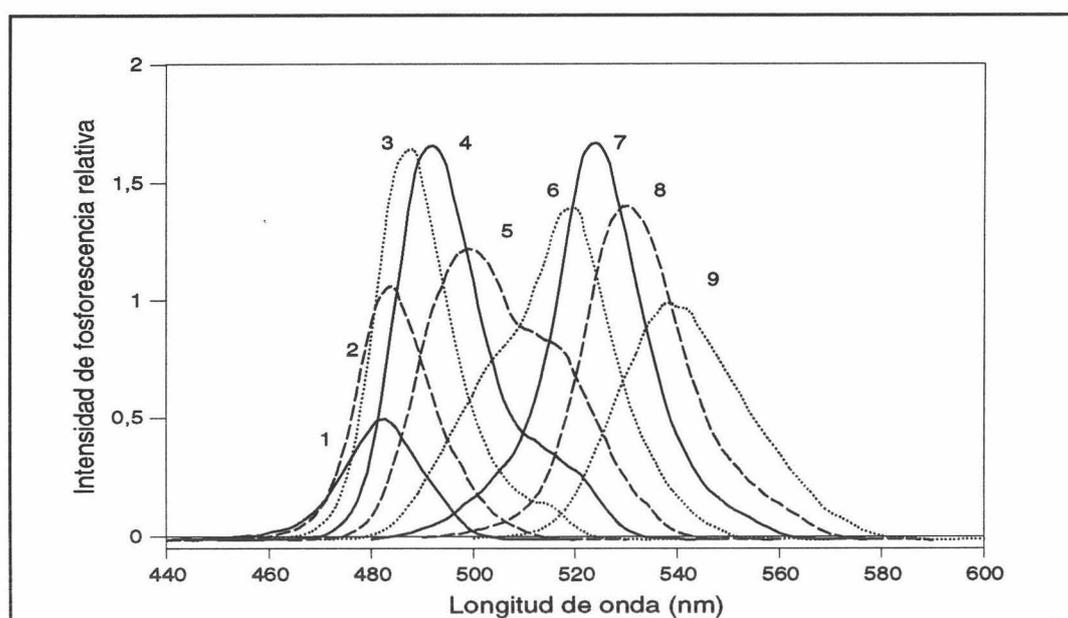


Figura n° I-17.- Optimización del incremento de longitud de onda . (1) 170, (2) 180, (3) 190, (4) 200, (5) 210, (6) 220, (7) 230, (8) 240 y (9) 250 nm. [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $2'05 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y n-heptano, [TlNO₃] $2'42 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'46 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'42 \cdot 10^{-3}$ M.

3.4. Características espectroscópicas.

Se registraron los distintos espectros de emisión, sincrónicos y sincrónico-derivados de una muestra de Ace junto a su blanco para un total conocimiento de sus características espectroscópicas. En la Figura n° I-18, se presentan dichos espectros indicando la longitud de onda de sus máximos. El procedimiento operatorio seguido fue: a 50 μ l de una disolución madre de Ace $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol se le añaden 410 μ l de SDS 0'5 M, 968 μ l de TlNO₃ 0'25 M, 446 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 710 μ l de H₂SO₄ 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones se introdujeron 1'5 ml

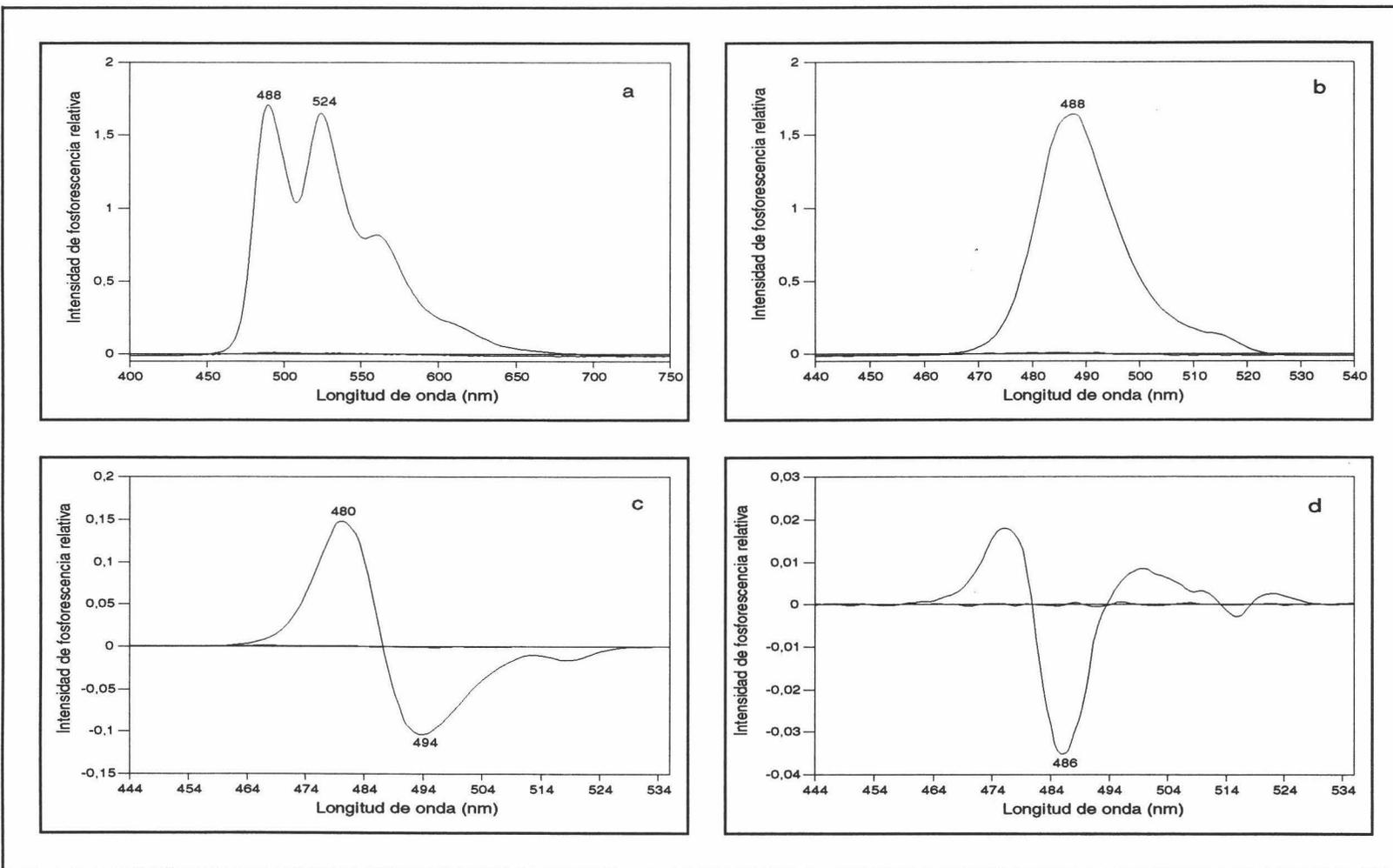


Figura nº I-18.- *Espectros de emisión (a), sincrónico (b), 1^a derivada sincrónica (c) y 2^a derivada sincrónica (d). [Ace] 185 ng/ml, [SDS] $2'05 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y n-heptano, [TiNO₃] $2'42 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'46 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'42 \cdot 10^{-3}$ M; rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V. Blancos, igual pero sin Ace.*

dentro de la cubeta de medida, registrando la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V. El procedimiento seguido para el blanco es igual pero sin añadir Ace.

3.5. Parámetros instrumentales establecidos.

Todos los parámetros instrumentales que han sido establecidos a lo largo de la optimización se resumen en la Tabla n° I-9. Algunos parámetros que no han sido recogidos de forma específica en algún apartado de los tratados (t_d , t_g , sensibilidad del detector, velocidad de barrido, rendijas), se deducen del trabajo experimental por las características espectroscópicas del acenafteno en este tipo de sistemas.

Tabla n° I-9.- Parámetros instrumentales establecidos.

Longitudes de onda de excitación/emisión	
Fluorescencia	294/323 nm
Fosforescencia	294/488 nm
Sincrónico	488 nm
1ª derivada (1ªD ¹ y 1ªD ²)	480 y 494 nm
2ª derivada (2ªD)	486 nm
Rendijas de excitación/emisión	16/16 nm
Mínimo período de pulso de la lámpara	5 ms
Velocidad de barrido de los espectros	2 nm/s
Incremento de longitud de onda	190 nm
Tiempo de decaimiento	500 μ s
Tiempo de integración	2000 μ s
Sensibilidad del detector	750 V

4. Establecimiento del método analítico.

Optimizadas las variables experimentales e instrumentales que intervienen en el sistema en estudio, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, las rectas de calibrado y los parámetros de fiabilidad de los diferentes métodos. El estudio de los parámetros de fiabilidad de los métodos analíticos propuestos se llevará a cabo mediante el protocolo de la IUPAC y el

Modelo de Regresión Lineal (Cuadros y col. 1993), comparando los resultados obtenidos. Para el resto de métodos propuestos en esta Memoria, el cálculo de los parámetros de fiabilidad se llevará a cabo utilizando esta última metodología.

4.1. Procedimiento operatorio.

En un matraz de 10 ml se colocan alícuotas de una disolución $2'4 \cdot 10^{-4}$ M de Ace, tal que la concentración variara entre 0 y 276 ng/ml, se adicionan 410 μ l de SDS 0'5 M, 968 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 446 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 710 μ l de H_2SO_4 0'02 M y se enrasa con agua destilada. De esta disolución se adicionan 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso con un período de 5 ms a la longitud de onda de 294 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide a los 2 minutos después de empezar a irradiar con una λ_{exc} de 294 nm a 488 nm de longitud de onda de emisión con un m.p.f. de 5ms, rendijas 16/16 nm, t_d 500 μ s, t_g 2000 μ s y un voltaje en el detector de 750 V.

4.2. Rectas de calibrado y cálculo de los parámetros de fiabilidad.

Establecidos los parámetros experimentales e instrumentales se procedió al establecimiento de las distintas rectas de calibrado. En conjunto se propusieron cinco métodos espectrofosforimétricos: un método de emisión directa, otro sincrónico, dos métodos utilizando los dos posibles valores extremos que posee la primera derivada del espectro sincrónico y otro mediante la segunda derivada de dicho espectro sincrónico. Para ello, se prepararon, siguiendo el procedimiento operatorio, distintas de muestras con concentraciones dentro del rango dinámico lineal y de un blanco, registrando los espectros. Los espectros correspondientes a cada una de estos calibrados, se reflejan en conjunto en la Figura nº I-19.

4.2.1. Según la IUPAC.

En primer lugar, se obtuvieron las rectas de calibrado correspondientes a los cinco métodos propuestos, cuyos datos se exponen en la Tabla nº I-10 y como resumen de este estudio de las rectas de calibrado para cada uno de los métodos propuestos, los parámetros más característicos de cada una de estas rectas se presentan en la Tabla nº I-11.

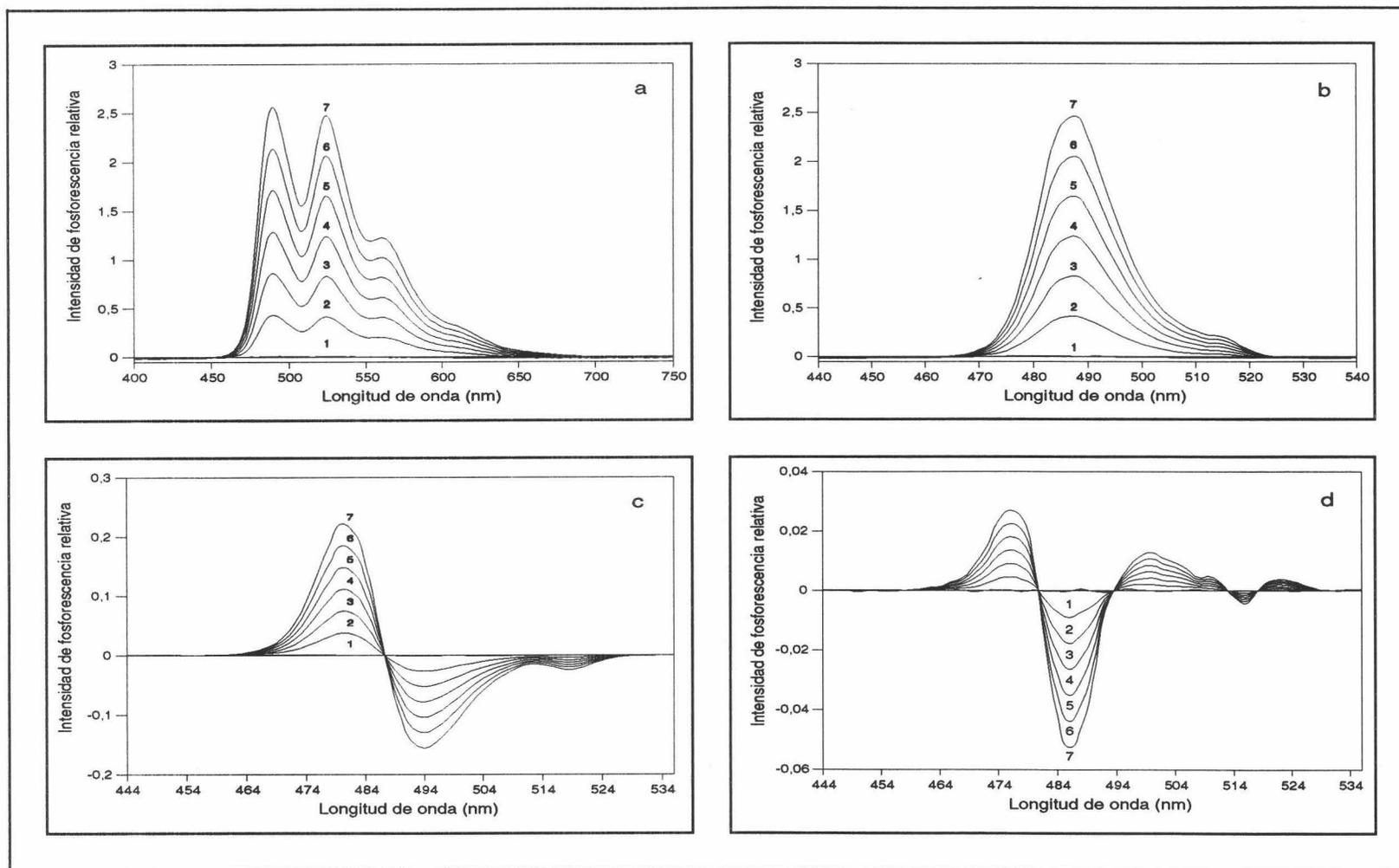


Figura nº I-19.- *Calibrados de emisión (a), sincrónico (b), 1ª derivada sincrónica (c) y 2ª derivada sincrónica (d). (1) Blanco, (2) 46, (3) 92, (4) 139, (5) 185, (6) 231 y (7) 277 ng/ml. [SDS] $2'05 \cdot 10^{-2}$ M, 0'005 % 1-butanol y *n*-heptano, [TlNO₃] $2'42 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'46 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'42 \cdot 10^{-3}$ M; rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 500/2000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 750 V.*

Tabla n° I-10.- *Datos de las rectas de calibrado.*

ng/ml	Directo	Sincrónico	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
0	7'32·10 ⁻³	4'67·10 ⁻³	2'65·10 ⁻⁴	8'72·10 ⁻⁴	2'32·10 ⁻⁴
46	0'444	0'405	3'70·10 ⁻²	2'62·10 ⁻²	9'49·10 ⁻²
92	0'841	0'821	7'13·10 ⁻²	5'11·10 ⁻²	1'85·10 ⁻²
138	1'299	1'223	0'107	8'07·10 ⁻²	2'57·10 ⁻²
185	1'692	1'641	0'148	0'104	3'51·10 ⁻²
230	2'108	2'020	0'177	0'128	4'35·10 ⁻²
276	2'540	2'412	0'216	0'154	5'40·10 ⁻²

Tabla n° I-11.- *Características de las rectas de calibrado.*

Parámetro	Directo	Sincrónico	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
a	1'407·10 ⁻²	1'407·10 ⁻²	1'407·10 ⁻²	1'407·10 ⁻²	1'407·10 ⁻²
b	9'094·10 ⁻³	8'700·10 ⁻³	7'751·10 ⁻⁴	5'516·10 ⁻⁴	1'894·10 ⁻⁴
r	0'999	0'999	0'999	0'999	0'998
r ²	0'999	0'999	0'998	0'999	0'996

Para llevar a cabo el cálculo de los límites de detección y determinación y de la precisión, según la metodología de la IUPAC, se requieren ensayos de repetitividad del blanco y de una concentración intermedia de la recta de calibrado, 185 ng/ml. En las Tablas n° I-12 y n° I-13 se reflejan los correspondientes resultados obtenidos en estos dos estudios.

Tabla n° I-12.- *Réplicas del blanco.*

Réplica	Directo	Sincrónico	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
1	8'85·10 ⁻²	6'41·10 ⁻²	4'43·10 ⁻⁴	-8'69·10 ⁻⁴	2'28·10 ⁻⁴
2	7'93·10 ⁻²	4'58·10 ⁻²	4'58·10 ⁻⁴	-10'68·10 ⁻⁴	-2'94·10 ⁻⁴
3	8'24·10 ⁻²	1'83·10 ⁻²	1'53·10 ⁻⁴	-12'21·10 ⁻⁴	-4'69·10 ⁻⁴
4	9'77·10 ⁻²	4'58·10 ⁻²	4'12·10 ⁻⁴	-5'34·10 ⁻⁴	-1'53·10 ⁻⁴
5	4'27·10 ⁻²	4'27·10 ⁻²	3'05·10 ⁻⁴	-10'70·10 ⁻⁴	-3'05·10 ⁻⁴
6	7'32·10 ⁻²	3'05·10 ⁻²	1'98·10 ⁻⁴	-12'66·10 ⁻⁴	-3'71·10 ⁻⁴
7	7'63·10 ⁻²	5'80·10 ⁻²	2'44·10 ⁻⁴	-6'87·10 ⁻⁴	-1'42·10 ⁻⁴
8	6'10·10 ⁻²	6'71·10 ⁻²	1'98·10 ⁻⁴	-5'34·10 ⁻⁴	-2'72·10 ⁻⁴
9	5'80·10 ⁻²	4'88·10 ⁻²	3'66·10 ⁻⁴	-5'95·10 ⁻⁴	-2'94·10 ⁻⁴

Tabla n° I-13.- Réplicas para una concentración de Ace de 185 ng/ml.

Réplica	Directo	Sincrónico	1ª D ¹	1ª D ²	2ª D
1	1'652	1'534	0'138	-9'640·10 ⁻²	3'365·10 ⁻²
2	1'622	1'595	0'146	-1'040·10 ⁻¹	3'533·10 ⁻²
3	1'769	1'731	0'157	-1'072·10 ⁻¹	3'657·10 ⁻²
4	1'689	1'654	0'148	-1'006·10 ⁻¹	3'576·10 ⁻²
5	1'772	1'742	0'157	-1'126·10 ⁻¹	3'383·10 ⁻²
6	1'655	1'593	0'148	-1'028·10 ⁻¹	3'911·10 ⁻²
7	1'630	1'555	0'140	-9'853·10 ⁻²	3'424·10 ⁻²
8	1'742	1'725	0'150	-1'110·10 ⁻¹	3'717·10 ⁻²
9	1'692	1'641	0'148	-1'039·10 ⁻¹	3'515·10 ⁻²

Los cálculos conducentes a la obtención de los parámetros de fiabilidad, a partir de estos datos de repetitividad del blanco y de la concentración 185 ng/ml, siguiendo el protocolo de la IUPAC, se muestran en la Tabla n° I-14.

Tabla n° I-14.- Parámetros de fiabilidad de los métodos propuestos.

Parámetro	Directo	Sincrónico	1ª D ¹	1ª D ²	2ª D
Linealidad (r)	0'999	0'999	0'998	0'999	0'998
Sensibilidad analítica (ng/ml)	9'1·10 ⁻³	8'7·10 ⁻³	7'8·10 ⁻⁴	5'5·10 ⁻⁴	1'9·10 ⁻⁴
Límite de detección (ng/ml)	5'6	5'4	0'5	1'6	1'6
Límite de cuantificación (ng/ml)	18'7	18'0	1'5	5'3	5'3
Rango dinámico lineal (ng/ml)	<276	<276	<276	<276	<276
Precisión (DER%) a 185 ng/ml	3'4	4'9	4'5	5'3	5'0

4.2.2. Según el método de regresión lineal.

Para el establecimiento de los parámetros de fiabilidad siguiendo esta metodología, es necesario obtener la recta de calibrado a partir de una serie de réplicas de distintos patrones (se recomiendan tres réplicas para 5 valores de concentración, que deben encontrarse homogéneamente distribuidos a lo largo del rango establecido). Estos patrones deben incluir al blanco como otro valor más, ya que su señal instrumental está sujeta al mismo tipo de errores que las demás medidas. Los datos de las rectas de calibrado de los cinco métodos en estudio se reflejan en las Tablas n° I-15, 16, 17, 18 y 19.

Tabla nº I-15.- Réplicas del calibrado del método directo.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	7'32·10 ⁻³	8'85·10 ⁻³	6'10·10 ⁻³
46	0'444	0'421	0'487
92	0'841	0'873	0'800
138	1'229	1'177	1'254
185	1'692	1'652	1'772
230	2'108	2'154	2'074
276	2'542	2'641	2'478

Tabla nº I-16.- Réplicas del calibrado del método sincrónico.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	4'67·10 ⁻³	5'80·10 ⁻³	6'10·10 ⁻³
46	0'405	0'387	0'457
92	0'821	0'773	0'870
138	1'223	1'177	1'254
185	1'641	1'585	1'734
230	2'021	2'104	2'014
276	2'412	2'521	2'379

Tabla nº I-17.- Réplicas del calibrado del método 1ªD¹.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	4'43·10 ⁻⁴	1'98·10 ⁻⁴	3'05·10 ⁻⁴
46	0'037	0'042	0'035
92	0'071	0'073	0'067
138	0'107	0'112	0'104
185	0'148	0'157	0'138
230	0'177	0'187	0'162
276	0'216	0'224	0'207

Tabla nº I-18.- Réplicas del calibrado del método 1ªD².

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	5'34·10 ⁻⁴	8'69·10 ⁻⁴	6'87·10 ⁻⁴
46	0'026	0'024	0'032
92	0'051	0'047	0'057
138	0'081	0'077	0'095
185	0'104	0'107	0'097
230	0'128	0'135	0'122
276	0'154	0'159	0'147

Tabla n° I-19- Réplicas del calibrado del método 2ªD.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	3'05·10 ⁻⁴	1'53·10 ⁻⁴	2'28·10 ⁻⁴
46	9'50·10 ⁻³	8'75·10 ⁻³	9'79·10 ⁻³
92	1'85·10 ⁻²	1'94·10 ⁻²	1'74·10 ⁻²
138	2'57·10 ⁻²	2'35·10 ⁻²	2'67·10 ⁻²
185	3'58·10 ⁻²	3'91·10 ⁻²	3'36·10 ⁻²
230	4'34·10 ⁻²	4'45·10 ⁻²	4'15·10 ⁻²
276	5'40·10 ⁻²	5'13·10 ⁻²	5'67·10 ⁻²

Los datos estadísticos obtenidos para las cinco rectas en estudio, se resumen en la Tabla n° I-20.

Tabla n° I-20.- Datos estadísticos de las rectas de calibrado.

Dato estadístico	D	S	1ªD ¹	1ªD ²	2ªD
Ordenada en el origen (a)	0'0022	0'0082	0'0009	0'0013	0'0002
Desviación estándar (s _a)	0'0188	0'0179	0'0026	0'0022	0'0007
Pendiente (b)	0'0092	0'0088	0'0008	0'0006	0'0002
Desviación estándar (s _b)	0'0001	0'0001	0'00001	0'00001	0'00001
Desv. estándar relativa (DER(b)) (%)	1'23	1'22	2'03	2'44	2'15
Desv. estándar de regresión (S _{R,c})	0'0477	0'0456	0'0066	0'0057	0'0017
Coefficiente de correlación (r)	0'9986	0'9986	0'9961	0'9944	0'9956
Coef. de determinación (r ²) (%)	99'71	99'72	99'22	98'89	99'13
g	0'0007	0'0007	0'0018	0'0026	0'0020

Los parámetros de fiabilidad del método: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido determinados mediante el modelo de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado. La sensibilidad analítica, así como la linealidad son establecidas mediante el uso de los datos derivados del calibrado, reflejados en las Tablas n° I-12, I-13, I-14, I-15 y I-16.

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar tanto de los blancos, como de los patrones usados para el establecimiento de las rectas de calibrado respectivas. Los datos de las desviaciones estándar se muestran en la Tabla n° I-21.

Tabla n° I-21.- *Desviaciones estándar en función del calibrado.*

ng/ml	D	S	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
0	3'62	3'61	5'99	7'19	6'33
46	3'39	3'38	5'59	6'72	5'92
92	3'26	3'23	5'37	6'46	5'66
138	3'21	3'18	5'28	6'34	5'59
185	3'26	3'24	5'38	6'42	5'69
230	3'40	3'38	5'57	6'71	5'89
276	3'64	3'60	5'99	7'15	6'38

La estimación de todos los parámetros característicos del método, calculados a partir del modelo de análisis de la regresión se reflejan en la Tabla n° I-22.

Tabla n° I-22.- *Parámetros de fiabilidad.*

Parámetro	D	S	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
Linealidad (1-DER(b)%)	98'77	98'78	97'97	97'56	97'85
Sensibilidad analítica (ng/ml)	5'20	5'16	8'56	10'26	9'06
Límite de detección (ng/ml)	10'88	10'82	17'96	21'55	18'99
Límite de cuantificación (ng/ml)	36'30	36'06	59'85	71'85	63'31
Rango dinámico lineal (ng/ml)	<276	<276	<276	<276	<276
Precisión (DER%) 46 ng/ml	6'95	7'31	11'68	14'32	12'44
92 ng/ml	3'58	3'52	6'00	7'63	5'96
138 ng/ml	2'42	2'33	3'83	4'24	4'27
185 ng/ml	1'76	1'74	2'84	3'52	3'03
230 ng/ml	1'48	1'47	2'47	2'93	2'63
276 ng/ml	1'31	1'31	2'16	2'61	2'27

Mediante la representación gráfica de los valores de precisión para cada uno de los valores de concentración del calibrado, es posible por interpolación, estimar la DER (%) para cualquier valor de concentración dentro del rango lineal.

4.2.3. Estudio comparativo de ambas metodologías .

Como se ha podido comprobar, los parámetros de calidad del método calculados según las expresiones recomendadas por la IUPAC no son coincidentes con los obtenidos utilizando los datos del calibrado mediante el modelo de regresión lineal.

En primer lugar, cabe destacar que la sensibilidad de calibrado no es un parámetro que pueda ser usado para la comparación de dos metodologías de medida, ya que, depende de las condiciones instrumentales usadas y no proporciona información acerca de la mejora de una metodología con respecto a otra. En el caso de la sensibilidad analítica calculada utilizando la desviación estándar de regresión ($s_{R,c}/b$), si es posible su uso como parámetro comparativo ya que indica la menor concentración que el método es capaz de discernir en todo el rango lineal, independientemente del instrumento utilizado y de las transformaciones matemáticas realizadas para obtener la señal analítica, como puede ser la diferenciación numérica. Así, se concluye que en la determinación de acenafteno en medio micelar, la sensibilidad analítica se empeora al aumentar el orden de derivación.

Los límites de detección y determinación muestran valores más elevados al obtenerlos utilizando la desviación estándar del blanco a partir de los datos del calibrado, calculada como se indicó en la parte de "Reactivos, instrumentación y metodología", que mediante la aproximación de la IUPAC. Esto es consecuencia de que en esta aproximación se asume que la pendiente es un parámetro constante en el calibrado mientras que al utilizar las expresiones para los límites de detección y cuantificación que propone el modelo de regresión lineal, la imprecisión de este valor es tomada en cuenta mediante la desviación estándar de regresión, $s_{R,c}$, afectando considerablemente el resultado en el caso de técnicas de derivadas, donde la dispersión aumenta al aumentar el orden de derivación.

En el cálculo de la precisión utilizando los datos del calibrado, no sólo se tiene en cuenta la imprecisión asociada a un valor de concentración replicado (como en la metodología IUPAC), sino que se consideran los errores asociados a la pendiente y a la ordenada en el origen, obteniéndose así una estimación más real de la precisión, a lo largo de todo el rango de aplicación del método

La utilización de las expresiones derivadas de la aplicación del Modelo de Regresión Lineal para el establecimiento de los parámetros de fiabilidad de un método analítico, conducen a una estimación más correcta de dichos parámetros, aunque el valor numérico se empeora, en ocasiones, respecto a los obtenidos utilizando las expresiones de la IUPAC. Esto es lógico si se tiene en cuenta que mediante las réplicas para cada nivel de concentración utilizado, se consigue evaluar la variabilidad real de los datos

experimentales en todo el intervalo lineal, considerando además, los errores asociados a la pendiente y a la ordenada en el origen.

Por todo ello, para el cálculo de los parámetros de fiabilidad de los sistemas analíticos de la presente memoria, se utilizarán las expresiones derivadas de la aplicación del Modelo de Regresión Lineal.

4.3. Estudio de interferencias.

Con el fin de comprobar la aplicabilidad del método propuesto para la determinación de acenafteno en agua de mar, donde es interesante su cuantificación, se ha estudiado el efecto que la presencia de hidrocarburos policíclicos extraños, comúnmente encontrados en esta matriz, ejercen en su determinación espectrofotométrica.

Para llevar a cabo este estudio se ha preparado una muestra para cada interferente que contenía 185 ng/ml de Ace, $1'92 \cdot 10^{-2}$ M en SDS, 0'005 % en 1-butanol y n-heptano, $2'42 \cdot 10^{-2}$ M en $TlNO_3$, $4'34 \cdot 10^{-3}$ M en Na_2SO_3 y $1'37 \cdot 10^{-3}$ M en H_2SO_4 . De esta disolución se adicionan 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso con un período de 5 ms a la longitud de onda de 294 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide a los 2 minutos después de empezar a irradiar con una λ_{exc} de 294 nm a 488 nm de longitud de onda de emisión, m.p.f. 5ms, t_d de 500 μs , t_g 2000 μs y un voltaje en el detector de 750 V. La tolerancia de las distintas sustancias ensayadas se resumen en la Tabla nº I-23, cuyo nivel se ha calculado aplicando el procedimiento explicado en la parte de "Reactivos, instrumentación y metodología".

Tabla nº I-23.- Nivel de tolerancia de sustancias extrañas.

Interferente	Nivel de tolerancia (ng/ml)				
	D	S	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
Fluoreno	500	500	400	400	600
Pireno	800	800	600	600	1000
Naftaleno	400	400	350	300	500
Benzo[a]pireno	1000	1000	800	800	1000
Benzo[e]pireno	1000	1000	950	800	1100

El método que ofrece los mejores niveles de tolerancia es la segunda derivada del espectro sincrónico. Los niveles de tolerancia para el método directo y el sincrónico son muy semejantes, mientras que la primera derivada sincrónica no mejora los resultados obtenidos.

5. Aplicaciones.

El método propuesto se ha aplicado a la determinación de acenafteno en agua de mar.

a) Método analítico y resultados.

Como método analítico se ha empleado el de la curva de calibrado con adición de patrón. Para ello, a una muestra de agua de mar de la zona de Almuñecar (Granada), es filtrada para eliminar todas las impurezas que posee en suspensión siendo ésta la disolución de muestra. Para la obtención de las curvas de calibrado, se preparó una serie de 5 muestras en matraces de 10 ml, para ello a 200 μl de disolución problema se le adicionan la cantidad suficiente de una disolución patrón de Ace $2'4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ para que los valores de la concentración de analito se sitúen dentro del rango lineal del método propuesto. Las condiciones instrumentales a las cuales se efectúan las medidas son las indicadas en el procedimiento operatorio. El contenido de las cinco muestras preparadas se detalla en la Tabla nº I-24.

Tabla nº I-24.- Curva de adición de patrón

μl muestra	μl patrón	ng/ml de Ace
200	13'5	50
200	27'0	100
200	40'5	150
200	64'8	200
200	81'0	250

Una vez seguido el procedimiento anteriormente descrito, de la medida de las intensidades de fosforescencia correspondientes se obtuvieron las rectas de calibrado que se muestran en la Tabla nº I-25. Los resultados obtenidos indican que las concentraciones de los analitos en la muestra problema están por debajo del límite de detección del método propuesto, así como la ausencia de efecto matriz.

Tabla n° I-25.- *Funciones de calibrado para los métodos propuestos*

Método	a	b	R
Directo	0'0018	0'0089	0'999
Sincrónico	0'0071	0'0086	0'999
1 ^a D ¹	0'0007	0'0009	0'996
1 ^a D ²	0'0010	0'0005	0'994
2 ^a D	0'0002	0'0007	0'996

b) *Estudio de recuperación.*

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. El estudio de recuperación se llevó a cabo para cuatro niveles de concentración, 50, 100, 150 y 200 ng/ml. Para ello, a una muestra de 10 ml de agua de mar previamente filtrada se le adicionan distintas cantidades de Ace de forma que su concentración entre dentro del rango lineal del método propuesto. A la muestra de esta forma preparada se le adicionan 10 ml de n-heptano agitando durante 10 minutos. Se separa la fase orgánica y a 200 µl de esta disolución se le evapora el n-heptano mediante el paso de N₂, después se le añaden 50 µl de microemulsión n-heptano/1-butanol/SDS, 410 µl de SDS 0'5 M, 968 µl de TiNO₃ 0'25 M, 446 µl de Na₂SO₃ 0'1 M y 710 µl de H₂SO₄ 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Las condiciones instrumentales a las cuales se han llevado a cabo las medidas de fosforescencia son las indicadas en el Procedimiento operatorio. Los valores correspondientes a la intensidad de fosforescencia se interpolan en las correspondientes funciones de calibrado obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla n° I-26.

Tabla n° I-26.- *Estudio de recuperación en muestras de agua de mar.*

P	Directo		Sincrónico		1 ^a D ¹		1 ^a D ²		2 ^a D	
	E	%R	E	%R	E	%R	E	%R	E	%R
50	48	96'0	47	94'0	45	90'0	46	92'0	46	92'0
100	96	96'0	97	97'0	93	93'0	94	94'0	96	96'0
150	142	94'7	144	96'0	135	90'0	136	91'7	141	94'0
200	190	95'0	189	94'5	168	89'0	174	92'0	173	91'5

P, concentración de Ace puesta
E, concentración de Ace encontrada
%R, porcentaje de recuperación

Para los cinco métodos propuestos y a los cuatro niveles de concentración probados los porcentajes de recuperación obtenidos están entre 90-100 %. Los mejores resultados se obtienen para el método directo y sincrónico, no mejorando los porcentajes de recuperación la utilización de derivadas.

Basándose en los resultados obtenidos hasta este momento, el método más aconsejable para la determinación de acenafteno en agua de mar es el método directo, ya que presenta unas buenas características analíticas, altos niveles de tolerancia y recuperaciones aceptables.



Capítulo II

Determinación fosforimétrica conjunta de Fenantreno, Fluoranteno y Benz[a]antraceno



1. Características espectroscópicas.

Se seleccionaron tres hidrocarburos aromáticos policíclicos, Fenantreno (Fen), Fluoranteno (Flt) y Benz[a]antraceno (BaA), sobre los cuales se ha propuesto un método conjunto de análisis fosforimétrico empleando, como técnica resolutive, el barrido sincrónico de ángulo variable.

1.1. Características fluorescentes.

En primer lugar, se registraron los espectros de fluorescencia total de los tres HAP indicados anteriormente. Para ello, se prepararon una serie de muestras conteniendo distintas cantidades de HAP, de forma que fueran isofluorescentes, siguiendo el siguiente procedimiento: *Se prepararon disoluciones madre añadiendo a 100 μl de una disolución $2'4 \cdot 10^{-2}$ M de cada uno de los HAP estudiados en n-heptano, 100 μl de 1-butanol y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A distintas alícuotas de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M (200 μl de Fen, 100 μl de Flt y 80 μl de BaA) se les añadió 600 μl de SDS 0'5 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada.* De esta forma la concentración final para cada HAP era 855 ng/ml para Fen, 485 ng/ml para Flt y 438 ng/ml para BaA. A dichas muestras se les registró el espectro en las siguientes condiciones instrumentales: *Excitación 250-325 nm para Fen, 250-400 nm para Flt y BaA, emisión 300-450, 400-600 y 350-500 nm para Fen, Flt y BaA respectivamente, velocidad de barrido 6 nm/s, paso de monocromador 2 y 5 nm para el de emisión y excitación, rendijas de excitación y emisión 4/4 nm y sensibilidad 525 V.* Los máximos espectrales fluorescentes para Fen, Flt y BaA se sitúan, respectivamente, a 295/348, 360/455 y 290/390 nm.

1.2. Características fosforescentes.

Se procedió al registro de los espectros de fosforescencia total de los tres compuestos de forma que las muestra finales fuesen isofosforescentes. Para llevar a cabo este estudio se siguió el siguiente procedimiento: *A distintas alícuotas de disolución madre de Fen, Flt y BaA $2'4 \cdot 10^{-4}$ M (60 μl de Fen, 100 μl de Flt y 48 μl de BaA) se les añadió 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada.* De esta forma la concentración final para cada HAP era 257 ng/ml para Fen, 485 ng/ml para Flt y 263 ng/ml para BaA.

A las muestras preparadas se les registró el espectro en las siguientes condiciones instrumentales: *Excitación 260-320, 250-425 y 250-400 nm, emisión 400-700, 500-700 y 500-800 nm para Fen, Flt y BaA respectivamente, velocidad de barrido 6 nm/s, paso de monocromador 2 y 5 nm, para el de emisión y excitación respectivamente, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm, sensibilidad de 1000 V, tiempo de decaimiento de 200 μ s y tiempo de integración de 2000 μ s.* Los máximos espectrales fosforescentes para Fen, Flt y BaA se sitúan, respectivamente, a 296/478, 358/552 y 292/610 nm.

1.2.1. Curvas de decaimiento.

Se llevó a cabo el registro de las curvas de decaimiento de los tres HAP en estudio, procediendo experimentalmente de forma similar a la parte anteriormente descrita. A estas muestras se les registró la curva de decaimiento fosforescente a las siguientes condiciones instrumentales: *Longitud de onda máxima de cada HAP (296/478 nm para Fen, 358/552 nm para Flt y 292/610 nm para BaA), barrido desde 0 ms hasta 5 ms para el Fen y Flt y hasta 15 ms para el BaA, resolución 50 μ s, repeticiones 100, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.* A partir de las curvas de decaimiento se calcularon los parámetros vida media mediante el ajuste a una exponencial de dichas curvas. Los parámetros vida media calculados para los tres HAP en estas condiciones experimentales han sido: 585 μ s para Fen, 1097 μ s para Flt y 3017 μ s para BaA.

Estas tres características luminiscentes: Espectro de fluorescencia total, espectro de fosforescencia total y curva de decaimiento fosforescente se muestran para el Fen, Flt y BaA en las Figuras nº II-1, II-2 y II-3 respectivamente. De estos espectros se deducen la longitudes de onda de fluorescencia y fosforescencia y el parámetro vida media.

De igual forma, se procedió al registro del espectro de fosforescencia total, en las mismas condiciones instrumentales, de una muestra conteniendo a los tres compuestos en estudio. Para ello, *a una alícuota de 40 μ l de disolución madre $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en Fen y BaA y $3'6 \cdot 10^{-4}$ M en Flt en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada.* El espectro de fosforescencia total junto con el correspondiente mapa de contorno se muestra en la Figura nº II-4.

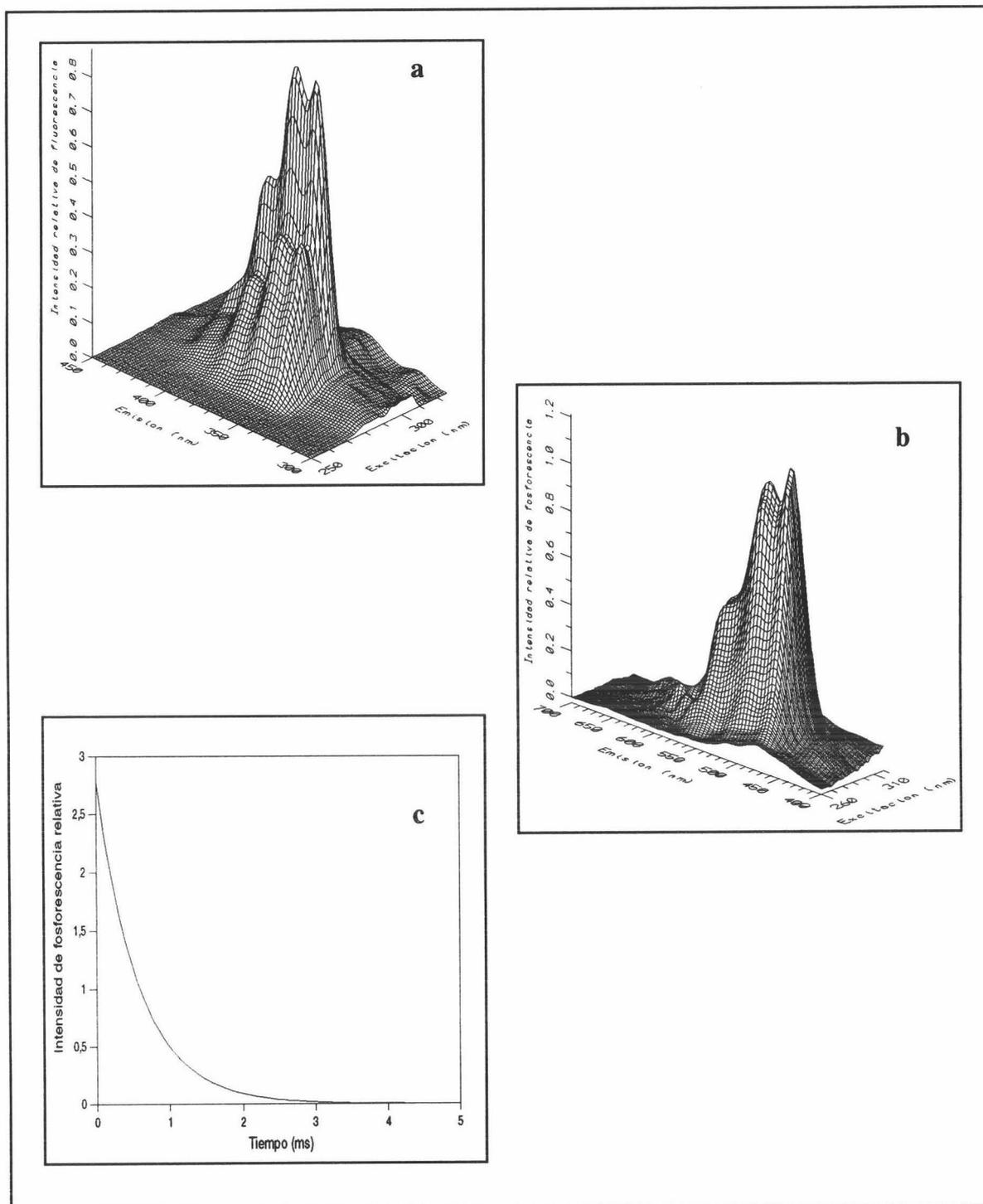


Figura nº II-1.- *Espectros de fluorescencia total (a), fosforescencia total (b) y curva de decaimiento fosforescente (c) del Fen. (a) [Fen] 855 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M; (b) y (c) [Fen] 257 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

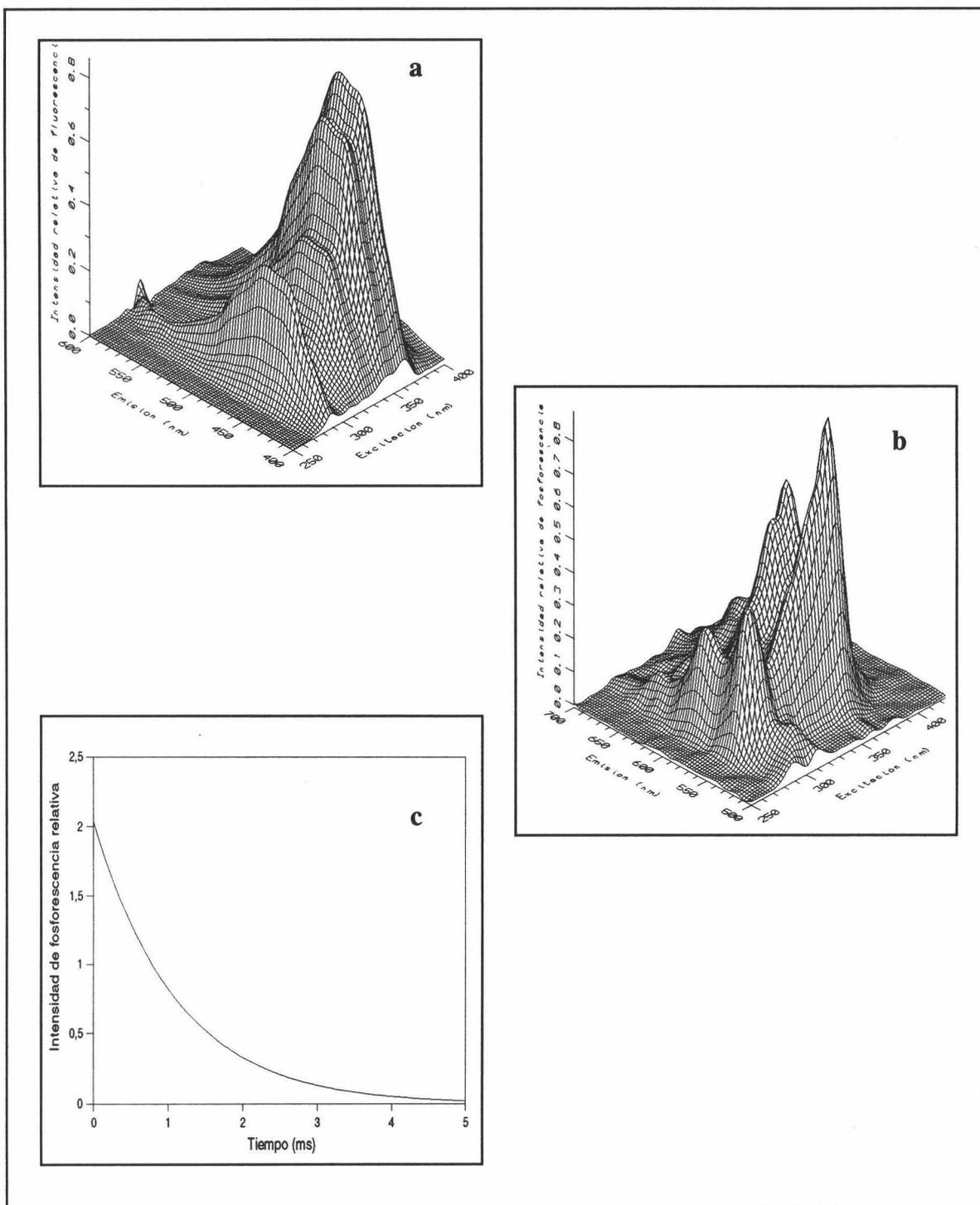


Figura nº II-2.- *Espectros de fluorescencia total (a), fosforescencia total (b) y curva de decaimiento fosforescente (c) del Flt. (a) [Flt] 485 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M; (b) y (c) [Flt] 485 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

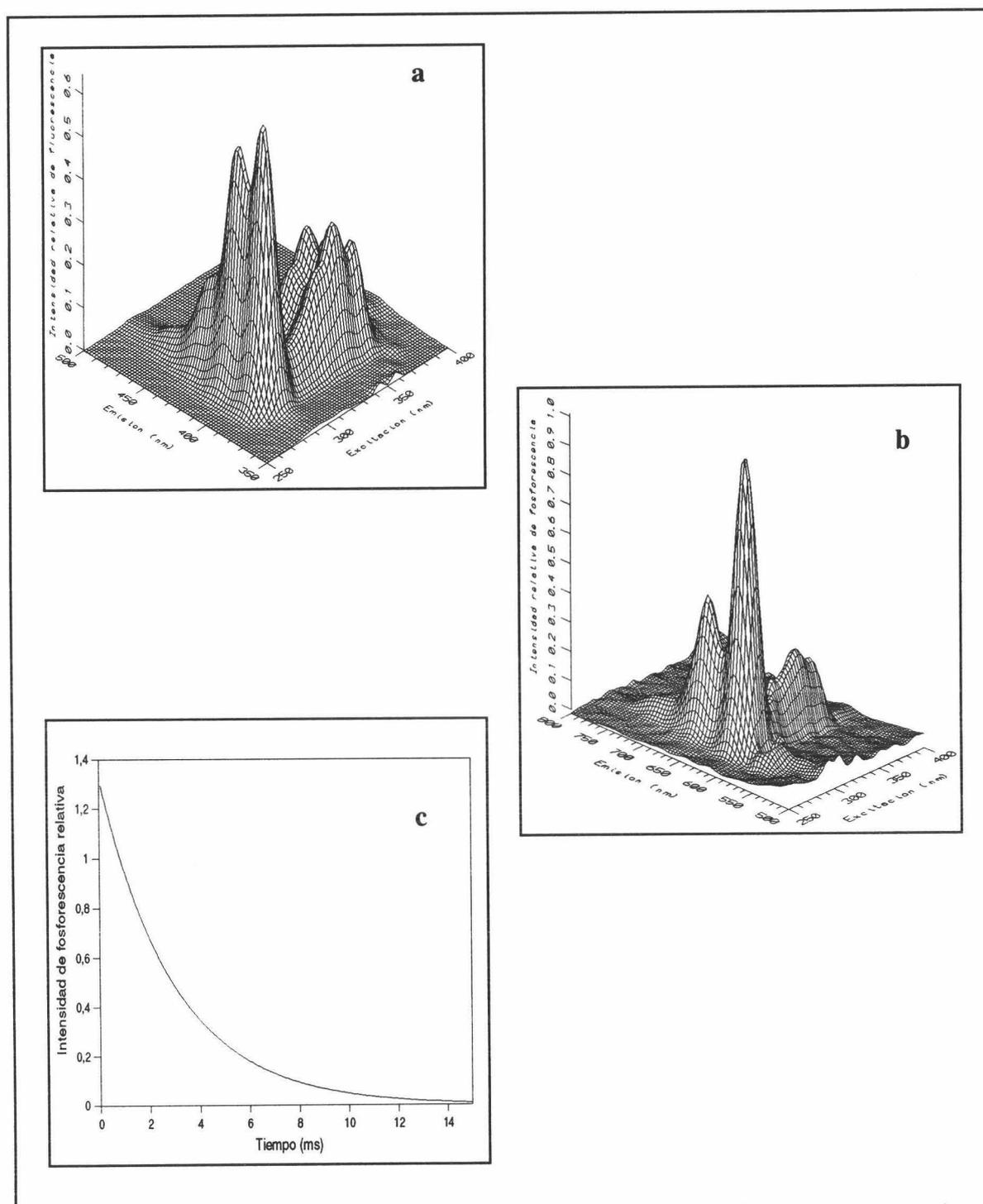


Figura nº II-3.- Espectros de fluorescencia total (a), fosforescencia total (b) y curva de decaimiento fosforescente (c) del BaA. (a) [BaA] 438 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M; (b) y (c) [BaA] 263 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

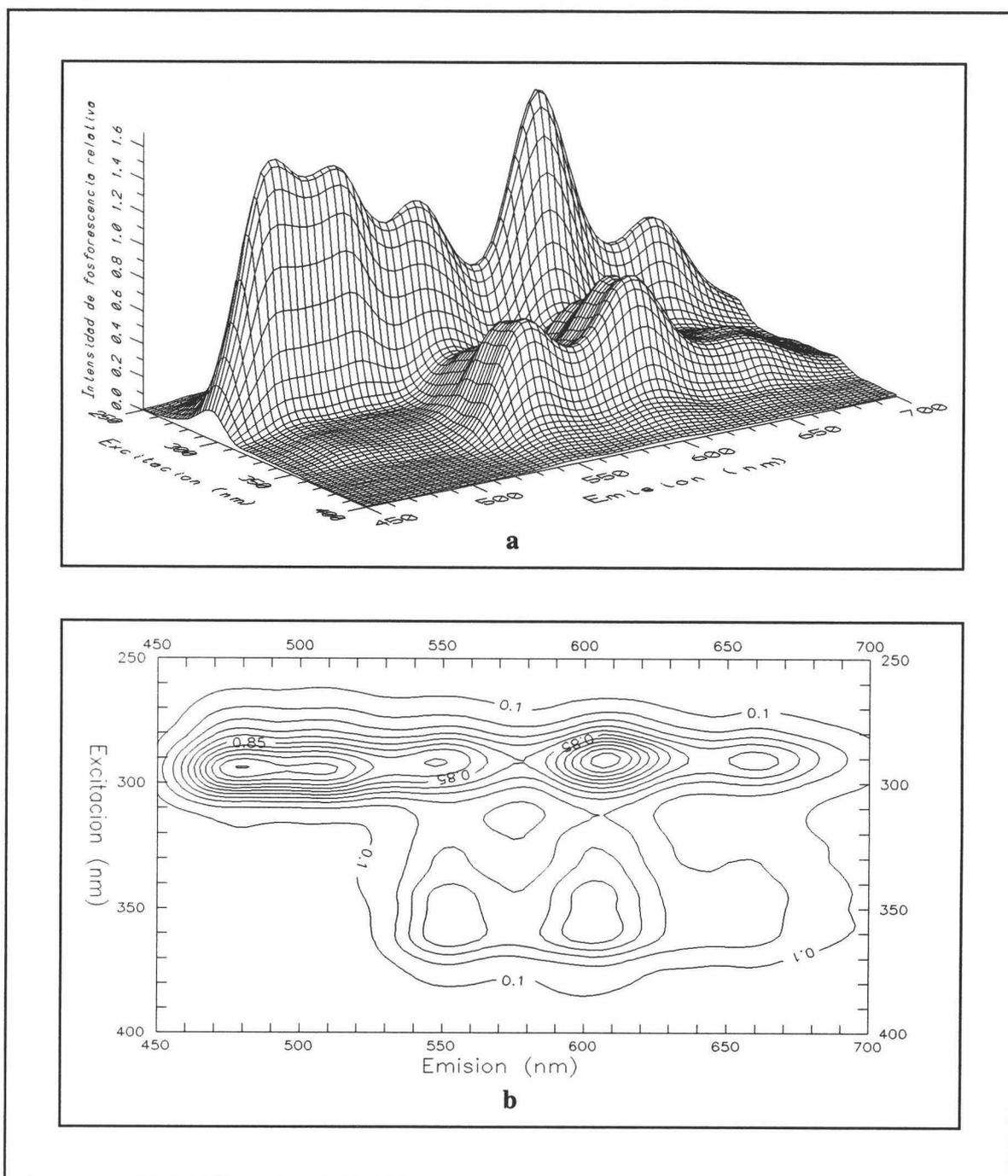


Figura n° II-4.- *Espectro de luminiscencia total (a) y mapa de contorno (b) de la mezcla de Fen, Flt y BaA. [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml, [BaA] 220 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.*

1.3. Comparación entre fluorescencia y fosforescencia.

1.3.1. Contornos fluorescentes.

Se llevó a cabo la representación bidimensional en mapas de contorno de los espectros de fluorescencia total de los tres hidrocarburos aromáticos policíclicos (véase Figura nº II-5). De dichos mapas se observa que no es posible la identificación y cuantificación de estos compuestos, a través de medidas de fluorescencia, debido al gran solapamiento espectral que existe entre ellos. Se comprueba que es posible la identificación y cuantificación del Fenantreno midiendo la intensidad de fluorescencia a su máximo espectral de 295/348 nm; igual ocurre con el Fluoranteno cuyo máximo espectral está situado a 360/455 nm; sin embargo la cuantificación e identificación del Benz[a]antraceno no es posible puesto que existe un gran solapamiento espectral entre su espectro y el del Fenantreno y Fluoranteno, por lo que la determinación por espectrofluorimetría directa no sería posible.

1.3.2. Contornos fosforescentes.

Se llevó a cabo la representación bidimensional en mapas de contorno de los espectros de fosforescencia total de los tres HAP (véase Figura nº II-6). Comparando dichos espectros y los valores de vida media anteriormente descritos se comprueba que es posible la identificación y cuantificación del Fenantreno midiendo la intensidad de fosforescencia a su máximo espectral de 296/478 nm, con un tiempo de decaimiento de 200 μ s y un tiempo de integración de 2000 μ s; del mismo modo, el Fluoranteno se puede cuantificar en su máximo espectral situado a 358/552 nm, midiendo a un tiempo de decaimiento de 200 μ s y un tiempo de integración de 2000 μ s. Sin embargo, la cuantificación e identificación del Benz[a]antraceno no es posible a estos tiempos de decaimiento e integración ya que existe un gran solapamiento espectral con el Fluoranteno. No obstante, al existir diferencias significativas entre las vidas medias de ambos analitos (1097 μ s para el Fluoranteno y 3017 μ s para el Benz[a]antraceno), es posible su determinación espectrofotométrica midiendo en el máximo espectral del Benz[a]antraceno, 292/610 nm, a un tiempo de decaimiento del orden de 3000 μ s con un tiempo de integración de 2000 μ s.

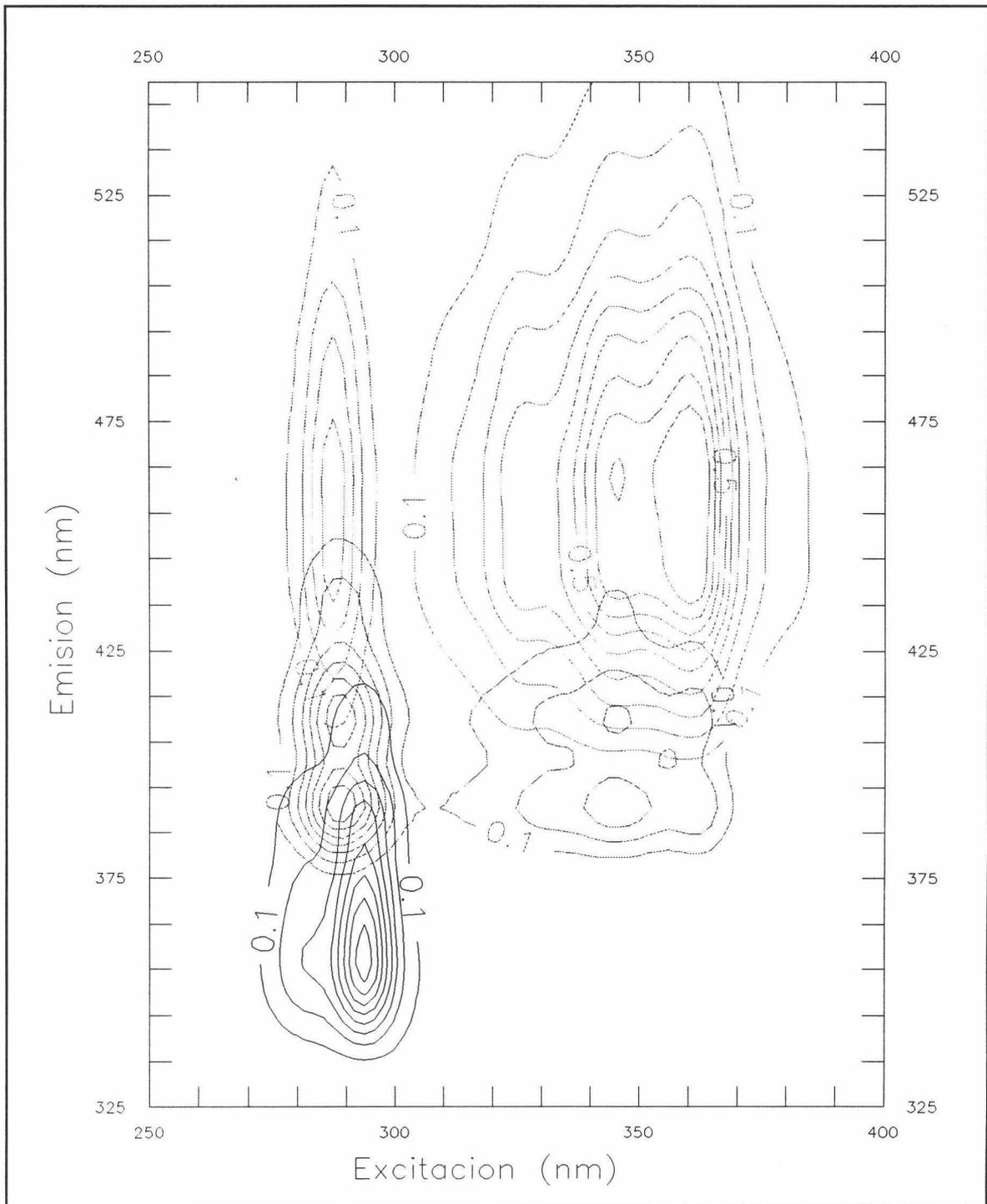


Figura n° II-5.- Contornos de los espectros de fluorescencia del Fen (—), Flt (---) y BaA (—). [Fen] 855 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [BaA] 438 ng/ml y [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M.

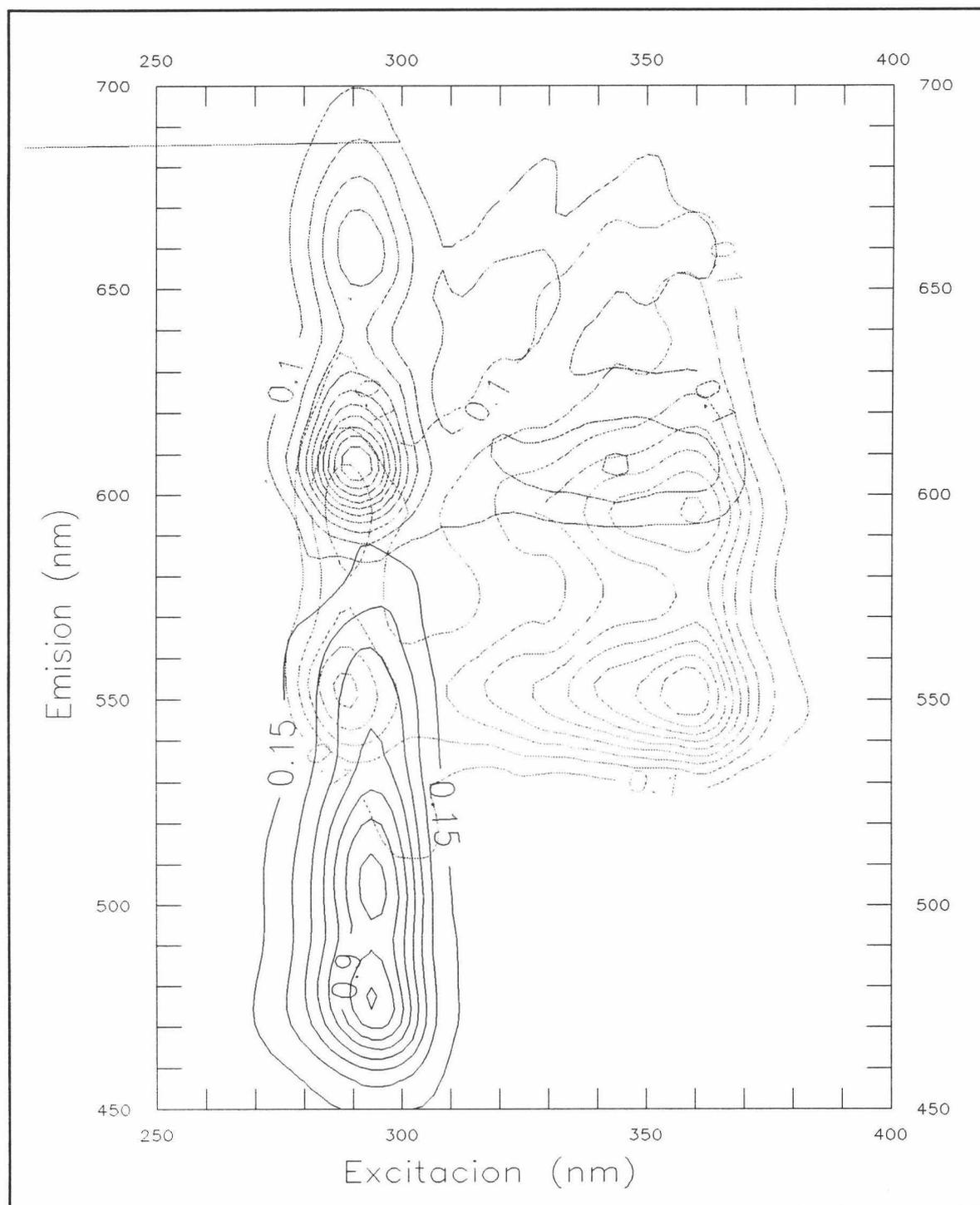


Figura nº II-6.- Contornos de los espectros de fosforescencia del Fen (—), Flt (---) y BaA (-·-). [Fen] 257 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [BaA] 263 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

2. Selección de las condiciones de la medida y de la ruta.

Para llevar a cabo la optimización de los distintos parámetros instrumentales se prepararon cuatro muestras siguiendo los siguientes procedimientos operatorios:

- Muestra de Fen: A una alícuota de 40 μl de disolución madre de Fenantreno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de Fen es de 170 ng/ml.

- Muestra de Flt: A una alícuota de 60 μl de disolución madre de Fluoranteno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de Flt es de 290 ng/ml.

- Muestra de BaA: A una alícuota de 40 μl de disolución madre de Benz[a]antraceno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de BaA es de 220 ng/ml.

- Muestra Mezcla: A una alícuota de 40 μl de disolución madre $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en Fenantreno y Benz[a]antraceno y $3'6 \cdot 10^{-4}$ M en Fluoranteno en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de Fen, Flt y BaA es de 170, 290 y 220 ng/ml respectivamente.

2.1. Optimización individualizada de los parámetros instrumentales.

En primer lugar, se va a proceder a la optimización de las condiciones instrumentales para cada uno de los tres analitos en estudio de forma individualizada, para tratar de conseguir las condiciones óptimas en cada caso.

a) *Fenantreno.*

Al observar los espectros de fosforescencia total presentados en la Figura nº II-6, se comprueba que existe un solapamiento parcial del espectro del Fen con el del Flt. Para resolver dicho solapamiento y dado que ambos presentan vidas medias parecidas, será necesario medir lo más alejado posible de éste. Fijando la longitud de onda de excitación en 296 nm, se registra la intensidad de fosforescencia a distintas longitudes de onda de emisión de las cuatro muestras preparadas anteriormente, a las condiciones instrumentales del Fen: $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V. Los resultados se presentan en la Tabla nº II-1.

Tabla nº II-1.- Optimización de la λ_{em} para el Fenantreno.

λ_{em} (nm)	$I_{Fosf.}^{Fen}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^M$
478	1'23	0'05	0'02	1'21
470	1'10	0'03	0'02	1'08
464	0'68	0'02	0'01	0'66
460	0'50	0'01	0'01	0'50
455	0'24	0'01	0'01	0'23

Se observa que, al variar la longitud de onda de emisión hacia valores más bajos, disminuyen las intensidades de fosforescencia de las cuatro muestras, pero aumenta la relación entre la intensidad emitida por el Fen con respecto a la del Flt, principal interferente espectral, hasta longitudes de emisión de 464 nm.

b) *Fluoranteno.*

En el caso del Flt no existe solapamiento espectral con los otros dos compuestos a su máximo fosforescente (358/552 nm) en estas condiciones experimentales, por lo que las medidas se llevarán a cabo a ese máximo espectral. La intensidad de emisión registrada para esas cuatro muestras a las condiciones instrumentales del Flt, se muestra en la Tabla nº II-2.

Tabla nº II-2.- $I_{Fosf.}$ a las condiciones de medida del Flt.

$I_{Fosf.}^{Fen}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^M$
0'01	0'49	0'01	0'50

$\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V

c) *Benz[a]antraceno.*

El solapamiento espectral del Benz[a]antraceno con el Fluoranteno es prácticamente total, por lo que las medidas fosforescentes en el máximo espectral serían inviables sin algún parámetro discriminatorio entre ambos analitos. El parámetro vida media es suficientemente diferente como para utilizarlo a la hora de resolver mezclas de ambos analitos (1097 μ s para el Flt y 3017 μ s para el BaA). Para elegir el tiempo de decaimiento más adecuado (t_d) se procedió a registrar la intensidad de fosforescencia de las muestras anteriormente preparadas a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 296/610 nm, t_g 2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V, variando el t_d entre 200 y 5000 μ s. Los resultados se resumen en la Tabla n° II-3.

Tabla n° II-3.- *Optimización del t_d para el Benz[a]antraceno.*

t_d (μ s)	$I_{Fosf.}^{Fen}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^M$
200	0'10	0'09	1'06	1'17
1000	0'04	0'04	0'90	0'90
2000	0'02	0'02	0'70	0'71
3000	0'01	0'01	0'55	0'53
4000	0'01	0'01	0'40	0'37
5000	0'01	0'01	0'23	0'21

Se observa que a medida que se aumenta el tiempo de decaimiento las señales van disminuyendo significativamente, pero la proporción entre la señal generada por el BaA frente a cualquiera de los otros dos analitos va aumentando hasta t_d de 4000 μ s.

Las condiciones instrumentales finales para los tres analitos se resumen en la Tabla n° II-4.

Tabla n° II-4.- *Condiciones instrumentales finales.*

Parámetros instrumentales	Fen	Flt	BaA
$\lambda_{exc/em}$ (nm)	296/464	358/552	292/610
$t_{d/g}$ (μ s)	200/2000	200/2000	3000/2000
m.p.f. (ms)	5	5	5
Rendijas (nm)	16	16	16
Sensibilidad (V)	1000	1000	1000

En la Figura nº II-7, se muestran las coordenadas de excitación y emisión para cada uno de los analitos, así como el tiempo de decaimiento y el tiempo de integración durante el cual se van a registrar las medidas en sus respectivas curvas de decaimiento.

2.2. Optimización de la ruta.

Para la selección de la ruta a seguir en la determinación simultánea de los tres HAP mediante técnica fosforescente, se procedió a la observación minuciosa de sus topogramas, buscando siempre una resolución máxima así como la mayor sensibilidad posible. De entre las rutas ensayadas, se seleccionó la determinada por los siguientes pares de $\lambda_{exc/em}$:

250/440 nm, 400/535 nm, 230/604 nm y 400/620 nm

Dicha ruta representada sobre el topograma correspondiente a la mezcla de los tres analitos se muestra en la Figura nº II-8.

2.3. Representación de los espectros asincrónicos de ángulo variable.

Existen dos tipos distintos de representación de los espectros asincrónicos de ángulo variable: representación tridimensional y representación bidimensional.

a) Representación tridimensional.

En la Figura nº II-9 se muestra el espectro en tres dimensiones correspondiente a la mezcla de los tres HAP, ilustrándose así la utilidad potencial de esta técnica para el análisis de mezclas.

b) Representación bidimensional.

En este tipo de representación espectral se ha eliminado el eje correspondiente a la λ_{exc} ; la línea vertical indica el cambio de dirección en la ruta. La Figura nº II-10 muestra el espectro bidimensional correspondiente a la mezcla de los tres HAP. Los valores máximos de intensidad de fosforescencia de cada uno de los HAP corresponden a los valores de $\lambda_{exc/em}$ en el espectro asincrónico: 296/464 nm, 358/552 nm y 292/610 nm para el Fen, Flt y BaA, respectivamente.

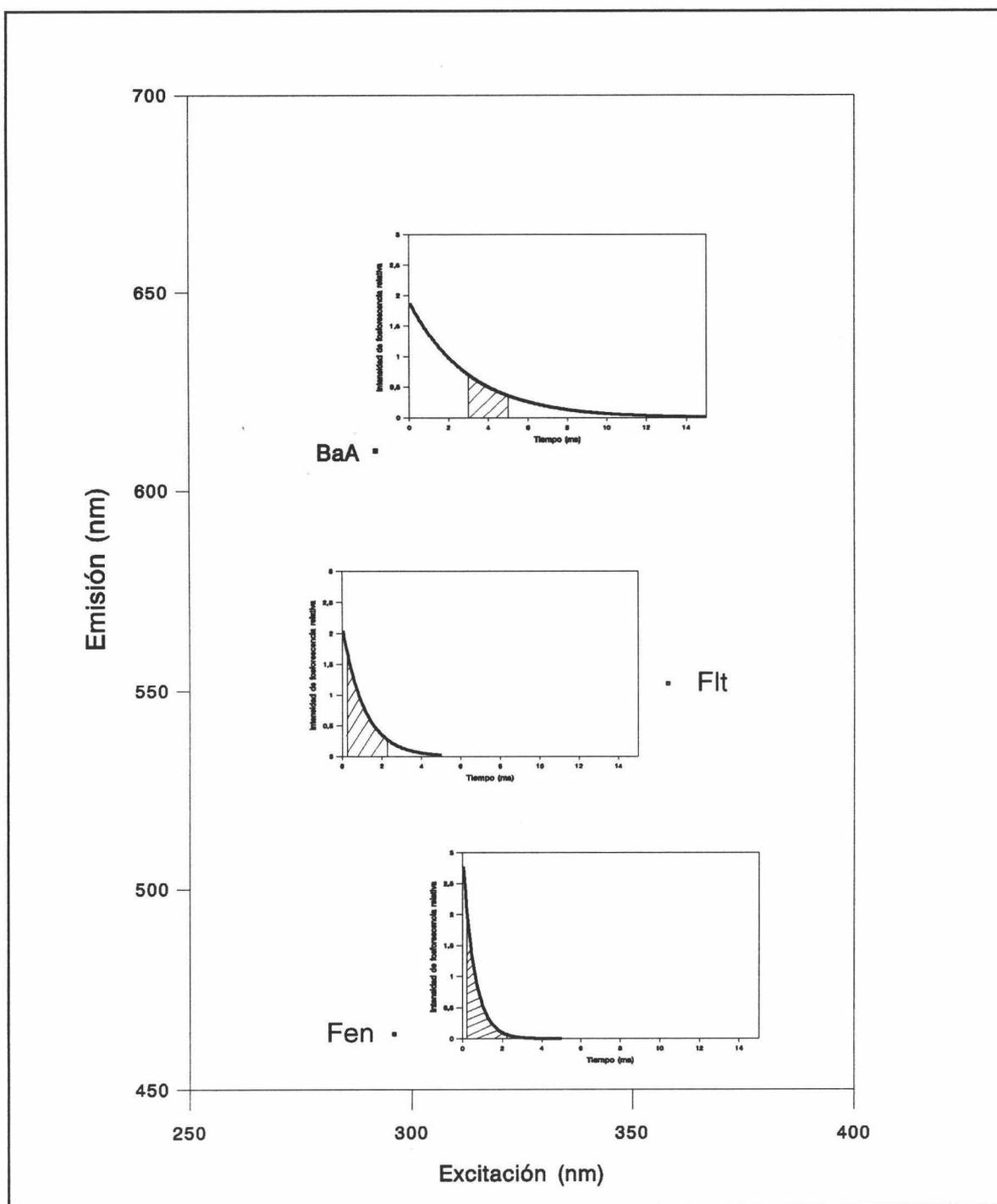


Figura n° II-7.- *Coordenadas de excitación y emisión y curvas de decaimiento del Fen, Flt y BaA. [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml, [BaA] 220 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

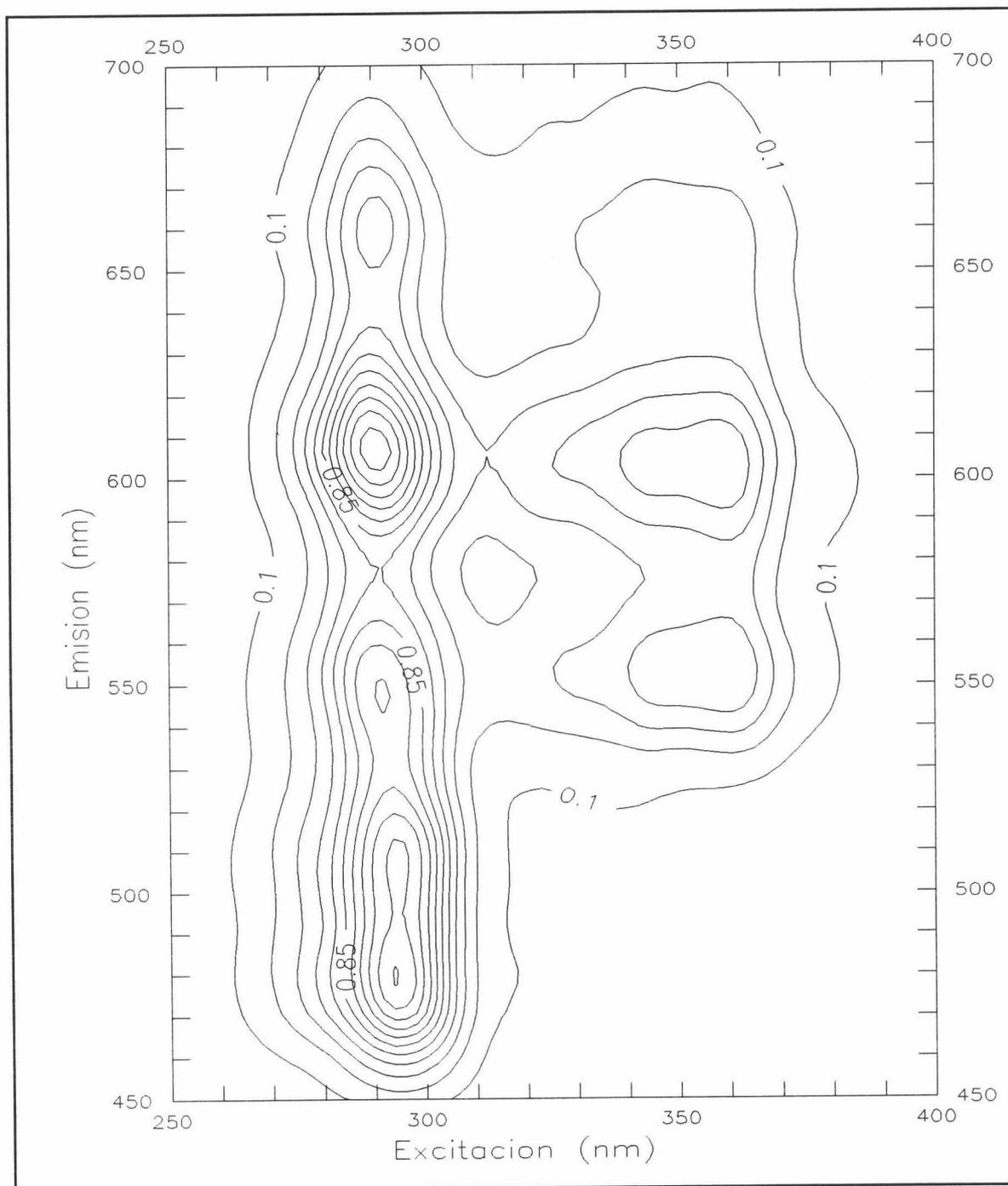


Figura nº II-8.- *Ruta de trabajo representada sobre el topograma de la mezcla de Fen, Flt y BaA. [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml, [BaA] 220 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.*

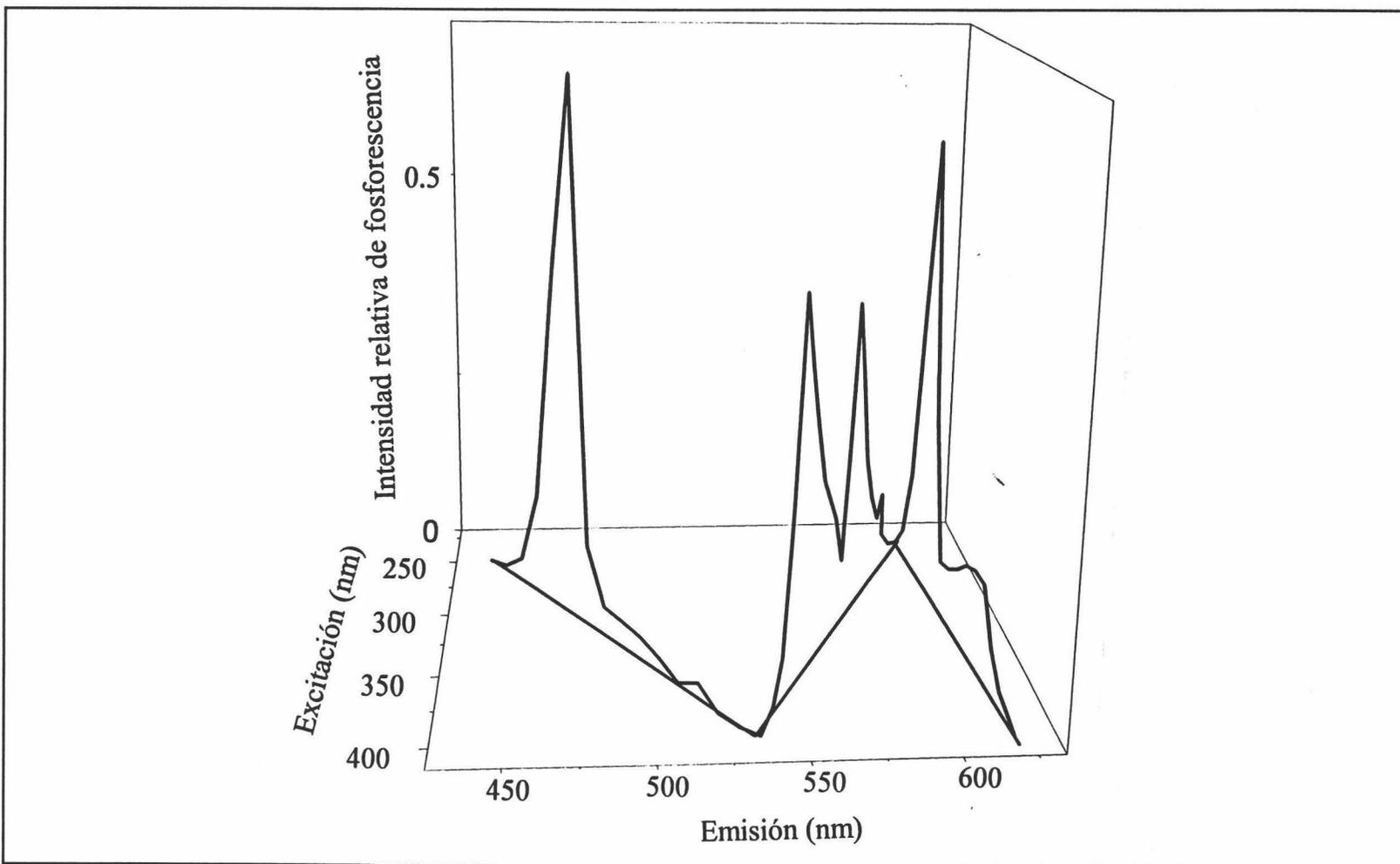


Figura n° II-9.- Representación tridimensional de la ruta seleccionada para la resolución de la mezcla de Fen, Flt y BaA. [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml, [BaA] 220 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. $t_{d/g}$ 200/2000 μ s para los dos primeros tramos y 3000/2000 μ s para el tercero, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

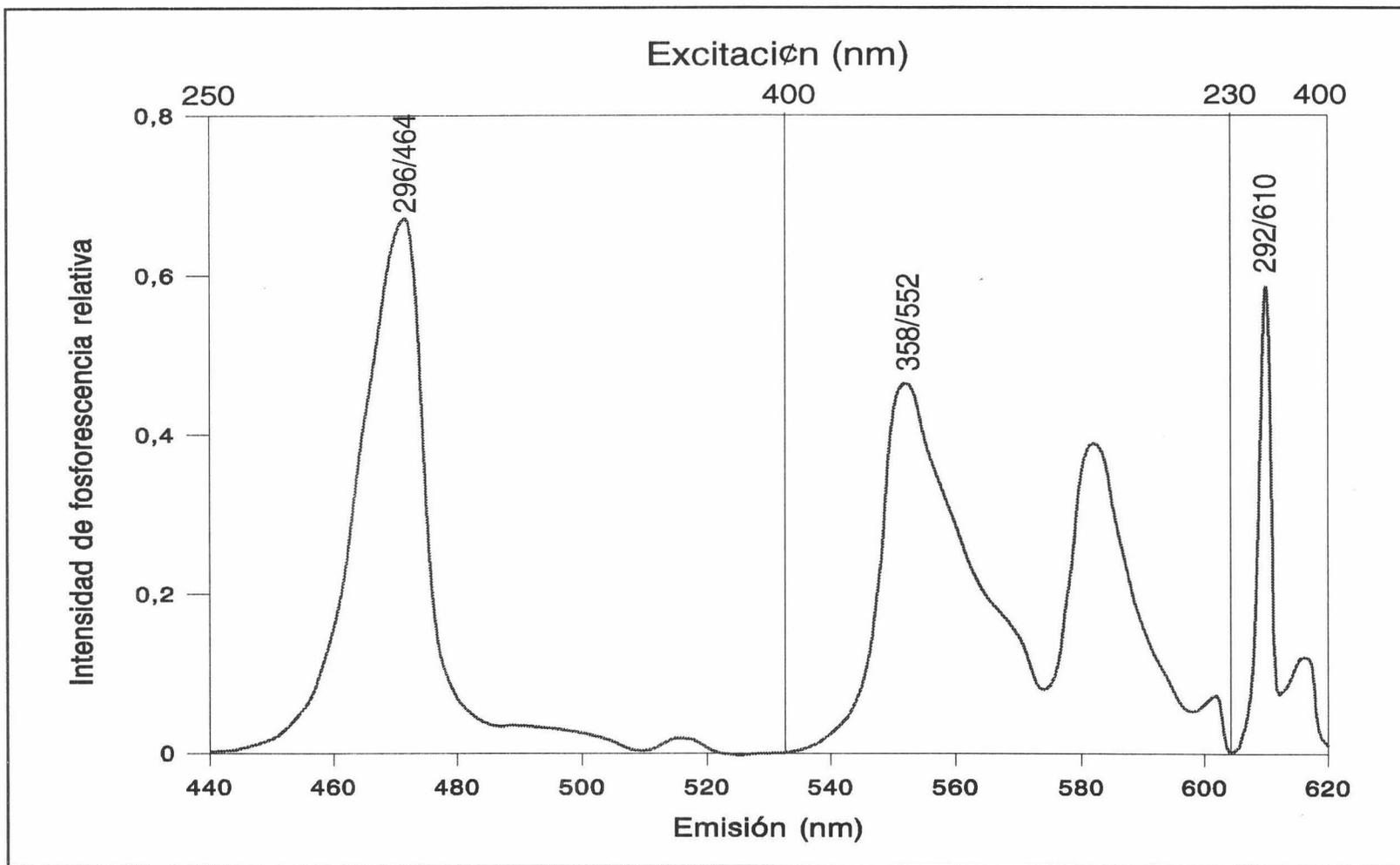


Figura n° II-10.- Representación bidimensional del espectro de ángulo variable de la mezcla de Fen, Flt y BaA. [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml, [BaA] 220 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. $t_{d/g}$ 200/2000 μ s para los dos primeros tramos y 3000/2000 μ s para el tercero, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

3. Selección de variables experimentales.

3.1. Optimización conjunta de agente micelar, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 .

Conocidos los óptimos experimentales de los reactivos SDS, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 , para el acenafeno y suponiendo que no serán muy distintos para otros HAP, se procedió a la optimización de las concentraciones de estos cuatro reactivos para el Fen, Flt y BaA en el caso en los que los tres se encuentren juntos en una misma matriz.

Para ello se utilizó un diseño hipercúbico estrellado, desarrollando el siguiente procedimiento: se preparó una disolución madre adicionando a 100 μ l de una disolución de *n*-heptano $2'4 \cdot 10^{-2}$ M en Fen y BaA y $3'6 \cdot 10^{-2}$ M en Flt, 100 μ l de 1-butanol, y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A 40 μ l de esta disolución madre se le añaden cantidades variables de SDS 0'5 M, de $TiNO_3$ 0'25 M, de Na_2SO_3 0'1 M y de H_2SO_4 0'02 M, tal y como indica el diseño experimental, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. A estas muestras así preparadas se le midió la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales establecidas.

Los resultados de este estudio se recogen en las Tablas nº II-5 y II-6. Aunque en un principio la idea era utilizar un solo diseño para los tres analitos, la concentración óptima de Na_2SO_3 para BaA, se situaba fuera de la región experimental del diseño presentado en la Tabla nº II-5, por lo que fue necesario desarrollar un nuevo diseño análogo al primero, pero en otro intervalo de concentraciones de Na_2SO_3 .

Los resultados del análisis de la varianza para Fen, Flt y BaA se muestran en las Tablas nº II-7, II-8 y II-9, respectivamente. Los coeficientes de regresión, junto con los datos del óptimo calculado y los correspondientes signos del hessiano se muestran para Fen, Flt y BaA en las Tablas nº II-10, II-11 y II-12, respectivamente.

A partir del análisis de la varianza se puede conocer, para cada analito, la relación de las concentraciones de los reactivos optimizados con la intensidad de fosforescencia. Tanto para Fen, Flt y BaA, la intensidad de fosforescencia emitida se relacionan de forma cuadrática con las concentraciones de SDS, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 , siendo todos los coeficientes lineales no significativos, excepto el que relaciona la concentración de $TiNO_3$

con la intensidad de fosforescencia del Fen. El único término cruzado que es significativo para los tres analitos es el que relaciona las concentraciones de Na_2SO_3 y H_2SO_4 ; otro término significativo es el que relaciona las concentraciones de TINO_3 y Na_2SO_3 aunque sólo para el Fen.

Para los tres analitos estudiados se ajusta bien el modelo de segundo orden propuesto. El nivel de significación del fallo de ajuste, para Fen, Flt y BaA, vale 12'17, 11'50 y 9'30 %, respectivamente, mientras que los coeficientes de determinación que corresponden son 0'8871, 0'8899 y 0'8591.

A partir de la función polinómica de segundo orden se puede conocer la relación gráfica de la intensidad de fosforescencia con cualquiera de los reactivos optimizados a las concentraciones óptimas de los otros tres. La variación de la intensidad de fosforescencia con cada una de las variables optimizadas mediante el diseño experimental para cada uno de los analitos en estudio se representa en la Figura nº II-11.

De igual modo se puede conocer la variación de forma gráfica de la intensidad de fosforescencia con cada dos variables experimentales para cada uno de los analitos en estudio, a los óptimos de los otros dos variables. Esta experiencia se refleja en las Figuras nº II-12, II-13 y II-14, para el Fenantreno, Fluoranteno y Benz[a]antraceno, respectivamente. En dichas figuras se muestran superficies de respuesta de la intensidad de fosforescencia de cada uno de los analitos en estudio a sus condiciones instrumentales óptimas frente a las concentraciones de SDS y TINO_3 o SDS y Na_2SO_3 o SDS y H_2SO_4 o TINO_3 y Na_2SO_3 o TINO_3 y H_2SO_4 o Na_2SO_3 y H_2SO_4 .

Para el resto del trabajo experimental, se ha elegido el resultado del cálculo de la media aritmética de los valores óptimos conseguidos de estos cuatro reactivos experimentales para los tres analitos en estudio, como concentración de trabajo.

$$[\text{SDS}] = 3'35 \cdot 10^{-2} \text{ M}$$

$$[\text{TINO}_3] = 2'50 \cdot 10^{-2} \text{ M}$$

$$[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 5'27 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1'61 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Tabla n° II-5.- *Diseño experimental para los sistemas: (a) Fen - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄; (b) Flt - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Punto	Variables experimentales				pH	I _{Fosf.} ^{Fen}	I _{Fosf.} ^{Flt}
	[SDS]	[TlNO ₃]	[Na ₂ SO ₃]	[H ₂ SO ₄]			
	(·10 ⁻²)	(·10 ⁻²)	(·10 ⁻³)	(·10 ⁻³)			
1	3'00(0)	2'50(0)	5'00(0)	1'60(0)	6'64	0'66	0'49
2	2'00(-1)	2'00(-1)	4'50(-1)	1'80(1)	6'44	0'55	0'40
3	2'00	3'00(1)	4'50	1'80	6'27	0'52	0'38
4	2'00	2'00	4'50	1'40(-1)	6'67	0'65	0'45
5	4'00(1)	3'00	4'50	1'40	6'70	0'64	0'44
6	2'00	2'00	5'50(1)	1'40	6'88	0'53	0'39
7	4'00	2'00	5'50	1'40	6'93	0'48	0'37
8	4'00	3'00	4'50	1'80	6'51	0'55	0'40
9	4'00	2'00	4'50	1'40	6'75	0'66	0'49
10	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'70	0'50
11	4'00	2'00	5'50	1'80	6'93	0'62	0'48
12	2'00	3'00	5'50	1'40	6'84	0'59	0'42
13	4'00	3'00	5'50	1'40	6'90	0'61	0'44
14	4'00	2'00	4'50	1'80	6'57	0'54	0'40
15	2'00	3'00	4'50	1'40	6'62	0'61	0'48
16	2'00	3'00	5'50	1'80	6'59	0'61	0'45
17	4'00	3'00	5'50	1'80	6'68	0'67	0'45
18	2'00	2'00	5'50	1'80	6'70	0'64	0'42
19	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'69	0'51
20	0'94(-2'058)	2'50	5'00	1'60	6'60	0'65	0'45
21	3'00(2'058)	3'52(2'058)	5'00	1'60	6'61	0'63	0'43
22	5'06	2'50	5'00	1'60	6'66	0'58	0'42
23	3'00	1'47(-2'058)	5'00	1'60	6'75	0'54	0'42
24	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'68	0'50
25	3'00	2'50	5'00	1'19(-2'058)	6'90	0'50	0'37
26	3'00	2'50	5'00	2'01(2'058)	6'40	0'52	0'39
27	3'00	2'50	3'97(-2'058)	1'60	6'44	0'53	0'39
28	3'00	2'50	6'03(2'058)	1'60	6'84	0'56	0'40
29	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'66	0'52

Fen $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 Flt $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

Tabla n° II-6.- *Diseño experimental para el sistema: BaA - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Punto	Variables experimentales				pH	I _{Fosf.} ^{BaA}
	[SDS] (·10 ⁻²)	[TlNO ₃] (·10 ⁻²)	[Na ₂ SO ₃] (·10 ⁻³)	[H ₂ SO ₄] (·10 ⁻³)		
1	3'00(0)	2'50(0)	5'50(0)	1'60(0)	6'95	0'57
2	4'00(1)	3'00(1)	6'00(1)	1'80(1)	6'65	0'50
3	2'00(-1)	2'00(-1)	5'00(-1)	1'80	5'90	0'39
4	4'00	3'00	5'00	1'40(-1)	6'95	0'40
5	2'00	3'00	5'00	1'80	5'90	0'38
6	4'00	3'00	6'00	1'40	6'50	0'37
7	2'00	3'00	6'00	1'80	6'57	0'45
8	4'00	2'00	5'00	1'80	6'20	0'41
9	4'00	2'00	6'00	1'80	6'35	0'53
10	3'00	2'50	5'50	1'60	6'95	0'54
11	4'00	2'00	6'00	1'40	7'25	0'47
12	4'00	3'00	5'00	1'80	6'05	0'39
13	4'00	2'00	5'00	1'40	6'55	0'52
14	2'00	3'00	6'00	1'40	6'87	0'38
15	2'00	2'00	6'00	1'40	7'05	0'39
16	2'00	2'00	5'00	1'40	6'60	0'50
17	2'00	2'00	6'00	1'80	6'42	0'49
18	2'00	3'00	5'00	1'40	6'45	0'47
19	3'00	2'50	5'50	1'60	6'95	0'56
20	0'94(-2'058)	2'50	5'50	1'60	6'25	0'50
21	5'06(2'058)	2'50	5'50	1'60	6'27	0'52
22	3'00	2'50	5'50	2'01(2'058)	6'00	0'39
23	3'00	3'53(2'058)	5'50	1'60	6'00	0'53
24	3'00	2'50	5'50	1'60	6'45	0'55
25	3'00	2'50	5'50	1'19(-2'058)	6'79	0'39
26	3'00	2'50	4'47(-2'058)	1'60	5'85	0'45
27	3'00	2'50	6'53(2'058)	1'60	6'70	0'40
28	3'00	1'47(-2'058)	5'50	1'60	6'40	0'47
29	3'00	2'50	5'50	1'60	6'95	0'52

^{BaA} λ_{exc/em} 290/610 nm, t_{d/g} 3000/2000 μs, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

Figura n° II-13.- Variación de la intensidad de fosforescencia del FtI con [SDS] y [TNO₃] (a), [SDS] y [Na₂SO₃] (b), [SDS] y [H₂SO₄] (c), [TNO₃] y [Na₂SO₃] (d), [TNO₃] y [H₂SO₄] (e) y con [Na₂SO₃] y [H₂SO₄] (f). [FtI] 290 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, t_{dig} 200/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, $rendidas_{exc/em}$ 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

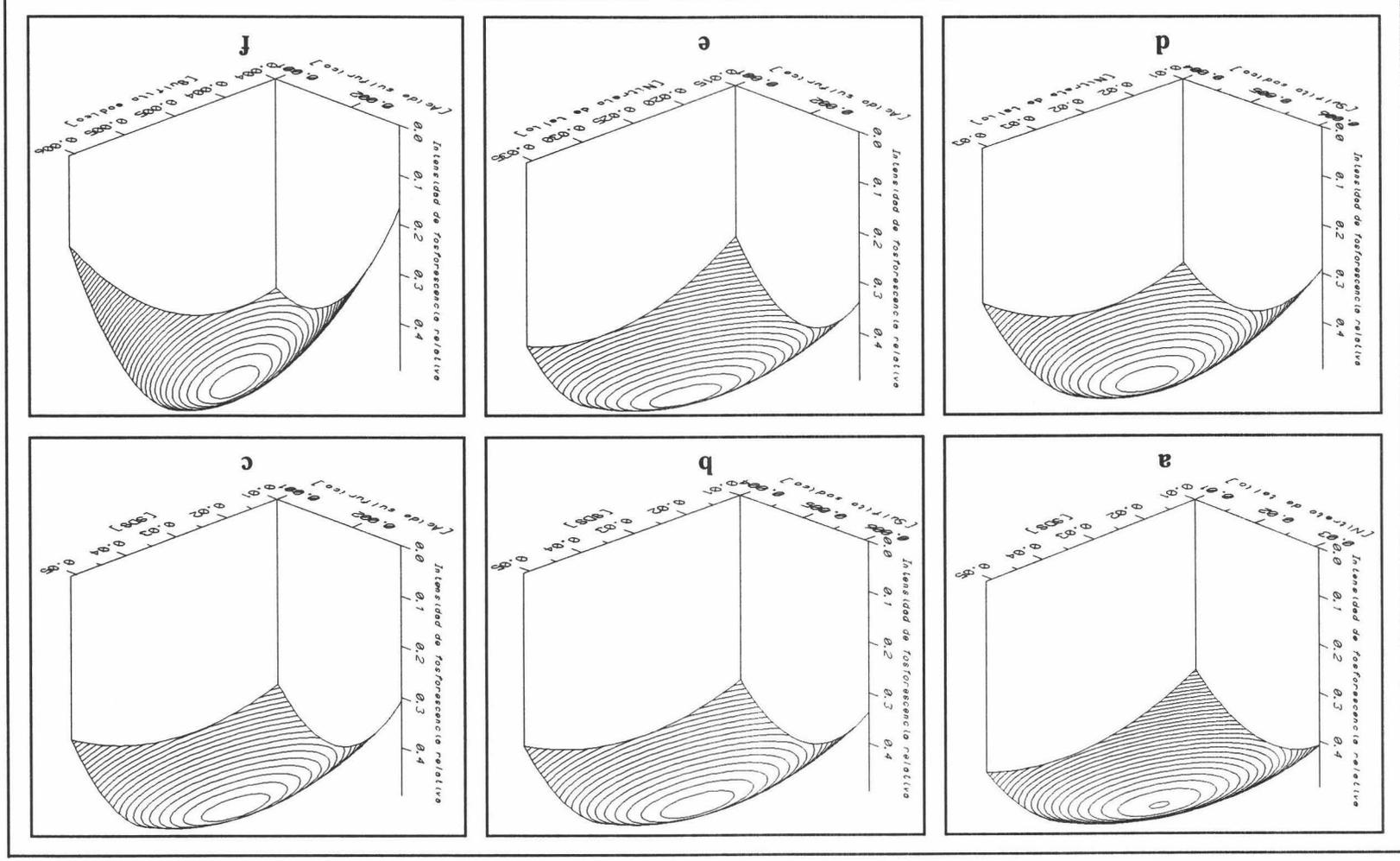


Tabla n° II-7.- *Análisis de la varianza del Fen.*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0002063	1	0'0002063	0'64	0'4750
a ₂	0'0042428	1	0'0042428	13'26	0'0219
a ₃	0'0002934	1	0'0002934	0'92	0'4021
a ₄	0'0000195	1	0'0000195	0'06	0'8197
a ₁₂	0'0026781	1	0'0026781	8'37	0'0444
a ₁₃	0'0001381	1	0'0001381	0'43	0'5538
a ₁₄	0'0001381	1	0'0001381	0'43	0'5538
a ₂₃	0'0047956	1	0'0047956	14'99	0'0180
a ₂₄	0'0008556	1	0'0008556	2'67	0'1774
a ₃₄	0'0321306	1	0'0321306	100'41	0'0006
a ₁₁	0'0038095	1	0'0038095	11'90	0'0260
a ₂₂	0'0098770	1	0'0098770	30'87	0'0051
a ₃₃	0'0223800	1	0'0223800	69'94	0'0011
a ₄₄	0'0374572	1	0'0374572	117'05	0'0004
Fallo de ajuste	0'0110580	10	0'0011058	3'46	0'1217
Error Puro	0'0012800	4	0'0003200		
Total	0'1093290	28			

Tabla n° II-8.- *Análisis de la varianza del Flt.*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0000136	1	0'0000136	0'08	0'7940
a ₂	0'0002653	1	0'0002653	1'56	0'2797
a ₃	0'0000000	1	0'0000000	0'00	0'9933
a ₄	0'0001415	1	0'0001415	0'83	0'4274
a ₁₂	0'0004000	1	0'0004000	2'35	0'1998
a ₁₃	0'0001000	1	0'0001000	0'59	0'4936
a ₁₄	0'0004000	1	0'0004000	2'35	0'1998
a ₂₃	0'0012250	1	0'0012250	7'21	0'0550
a ₂₄	0'0006250	1	0'0006250	3'68	0'1277
a ₃₄	0'0132250	1	0'0132250	77'79	0'0009
a ₁₁	0'0073443	1	0'0073443	43'20	0'0028
a ₂₂	0'0096536	1	0'0096536	56'79	0'0017
a ₃₃	0'0184729	1	0'0184729	108'66	0'0005
a ₄₄	0'0239464	1	0'0239464	140'86	0'0003
Fallo de ajuste	0'0060947	10	0'0006095	3'59	0'1150
Error Puro	0'0006800	4	0'0001700		
Total	0'06153103	28			

Tabla nº II-9.- *Análisis de la varianza del BaA*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0013412	1	0'0013412	3'62	0'1297
a ₂	0'0022861	1	0'0022861	6'18	0'0678
a ₃	0'0000120	1	0'0000120	0'03	0'8679
a ₄	0'0000654	1	0'0000654	0'18	0'7000
a ₁₂	0'0020250	1	0'0020250	5'47	0'0794
a ₁₃	0'0020250	1	0'0020250	5'47	0'0794
a ₁₄	0'0006250	1	0'0006250	1'69	0'2635
a ₂₃	0'0000000	1	0'0000000	0'00	0'0000
a ₂₄	0'0016000	1	0'0016000	4'32	0'1061
a ₃₄	0'0289000	1	0'0289000	78'11	0'0009
a ₁₁	0'0041112	1	0'0041112	11'11	0'0290
a ₂₂	0'0058788	1	0'0058788	15'89	0'0163
a ₃₃	0'0291824	1	0'0291824	78'87	0'0009
a ₄₄	0'0461251	1	0'0461251	124'66	0'0004
Fallo de ajuste	0'0151805	10	0'0015180	4'10	0'0930
Error Puro	0'0014800	4	0'0003700		
Total	0'11822069	28			

Tabla nº II-10.- *Valoración del diseño experimental para el sistema Fen - SDS - TINO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Coeficientes		
a ₁ = 0'793312		
a ₂ = 9'32917		
a ₃ = 259'867		
a ₄ = 805'655		
a ₁₂ = 258'75		
a ₁₃ = -587'5	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
a ₁₄ = 1468'75	[SDS] = 3'15·10 ⁻² M	A ₁ < 0
a ₂₃ = 6925	[TINO ₃] = 2'76·10 ⁻² M	A ₂ > 0
a ₂₄ = -7312'5	[Na ₂ SO ₃] = 5'17·10 ⁻³ M	A ₃ < 0
a ₃₄ = 448125	[H ₂ SO ₄] = 1'63·10 ⁻³ M	A ₄ > 0
a ₁₁ = -116'082		Es un máximo
a ₂₂ = -747'663		
a ₃₃ = -112544		
a ₄₄ = -909998		
a = -0'786		

Tabla nº II-11.- Valoración del diseño experimental para el sistema Flt - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

Coeficientes		Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
$a_1 = 5'74534$			
$a_2 = 33'1165$			
$a_3 = 460'04$			
$a_4 = 960'046$			
$a_{12} = -100$			
$a_{13} = 500$			
$a_{14} = 2500$		$[SDS] = 3'01 \cdot 10^{-2} M$	$A_1 < 0$
$a_{23} = 3500$		$[TiNO_3] = 2'55 \cdot 10^{-2} M$	$A_2 > 0$
$a_{24} = -6250$		$[Na_2SO_3] = 4'99 \cdot 10^{-3} M$	$A_3 < 0$
$a_{34} = 287500$		$[H_2SO_4] = 1'59 \cdot 10^{-3} M$	$A_4 > 0$
$a_{11} = -161'179$			Es un máximo
$a_{22} = -739'159$			
$a_{33} = -102249$			
$a_{44} = -727600$			
$a = -1'905$			

Tabla nº II-12.- Valoración del diseño experimental para el sistema BaA - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

Coeficientes		Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
$a_1 = -3'77415$			
$a_2 = 17'6576$			
$a_3 = 667'559$			
$a_4 = 558'327$			
$a_{12} = -225$			
$a_{13} = 2250$			
$a_{14} = 3125$		$[SDS] = 3'86 \cdot 10^{-2} M$	$A_1 < 0$
$a_{23} = -8'5682 \cdot 10^{-8}$		$[TiNO_3] = 2'19 \cdot 10^{-2} M$	$A_2 > 0$
$a_{24} = 10000$		$[Na_2SO_3] = 5'66 \cdot 10^{-3} M$	$A_3 < 0$
$a_{34} = 425000$		$[H_2SO_4] = 1'62 \cdot 10^{-3} M$	$A_4 > 0$
$a_{11} = -120'592$			Es un máximo
$a_{22} = -576'813$			
$a_{33} = -128515$			
$a_{44} = -1'0098 \cdot 10^6$			
$a = -1'897$			

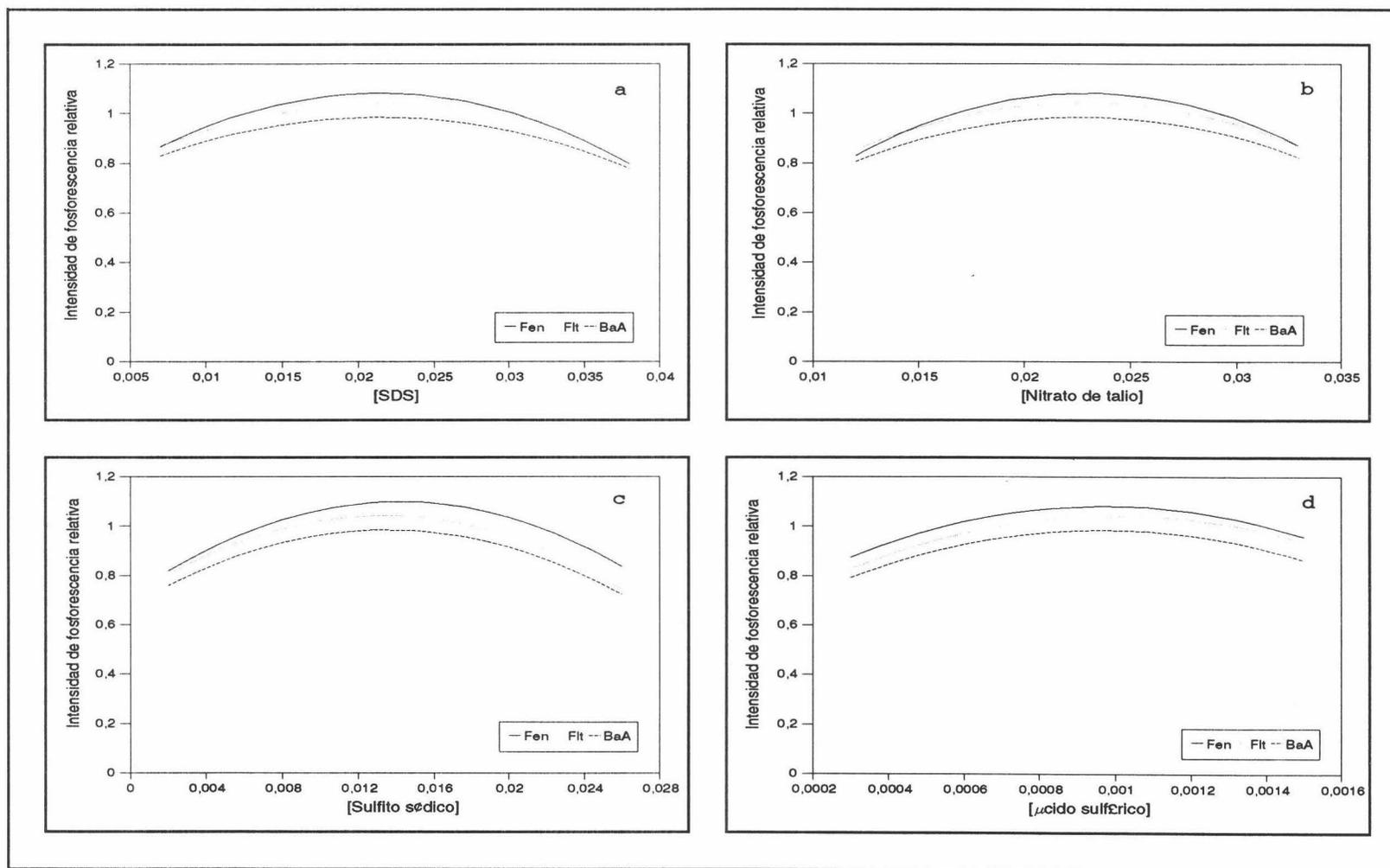


Figura nº II-11.- Variación de la intensidad de fosforescencia del Fen, Flt y BaA con la [SDS] (a), [TlNO₃] (b), [Na₂SO₃] (c) y con [H₂SO₄] (c). [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml, [BaA] 220 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 296/464, 358/552 y 292/610 nm respectivamente, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s para Fen y Flt y 3000/2000 μ s para BaA, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

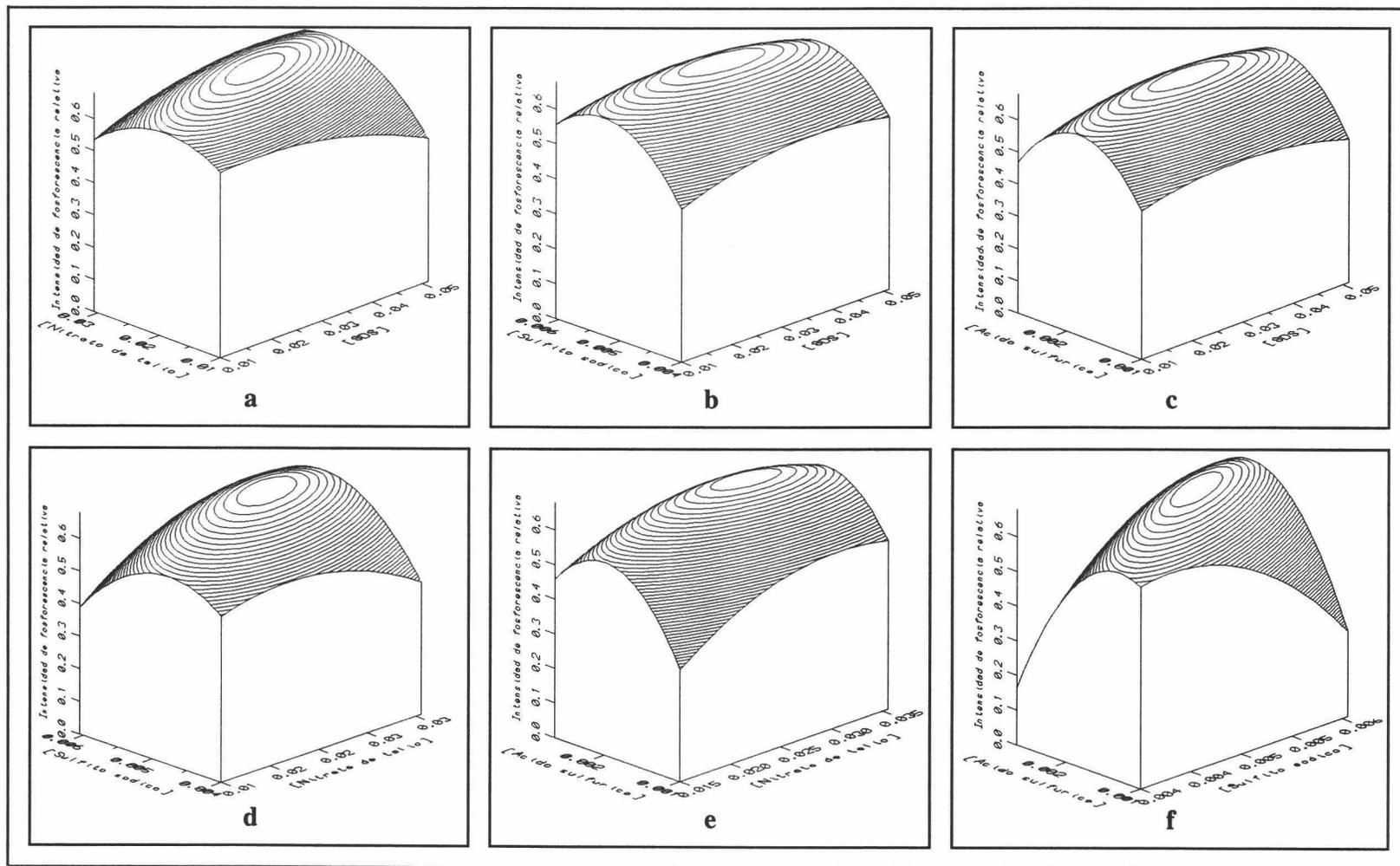


Figura n° II-12.- Variación de la intensidad de fosforescencia del Fen con $[SDS]$ y $[TiNO_3]$ (a), $[SDS]$ y $[Na_2SO_3]$ (b), $[SDS]$ y $[H_2SO_4]$ (c), $[TiNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TiNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y con $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). $[Fen]$ 170 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μs , m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

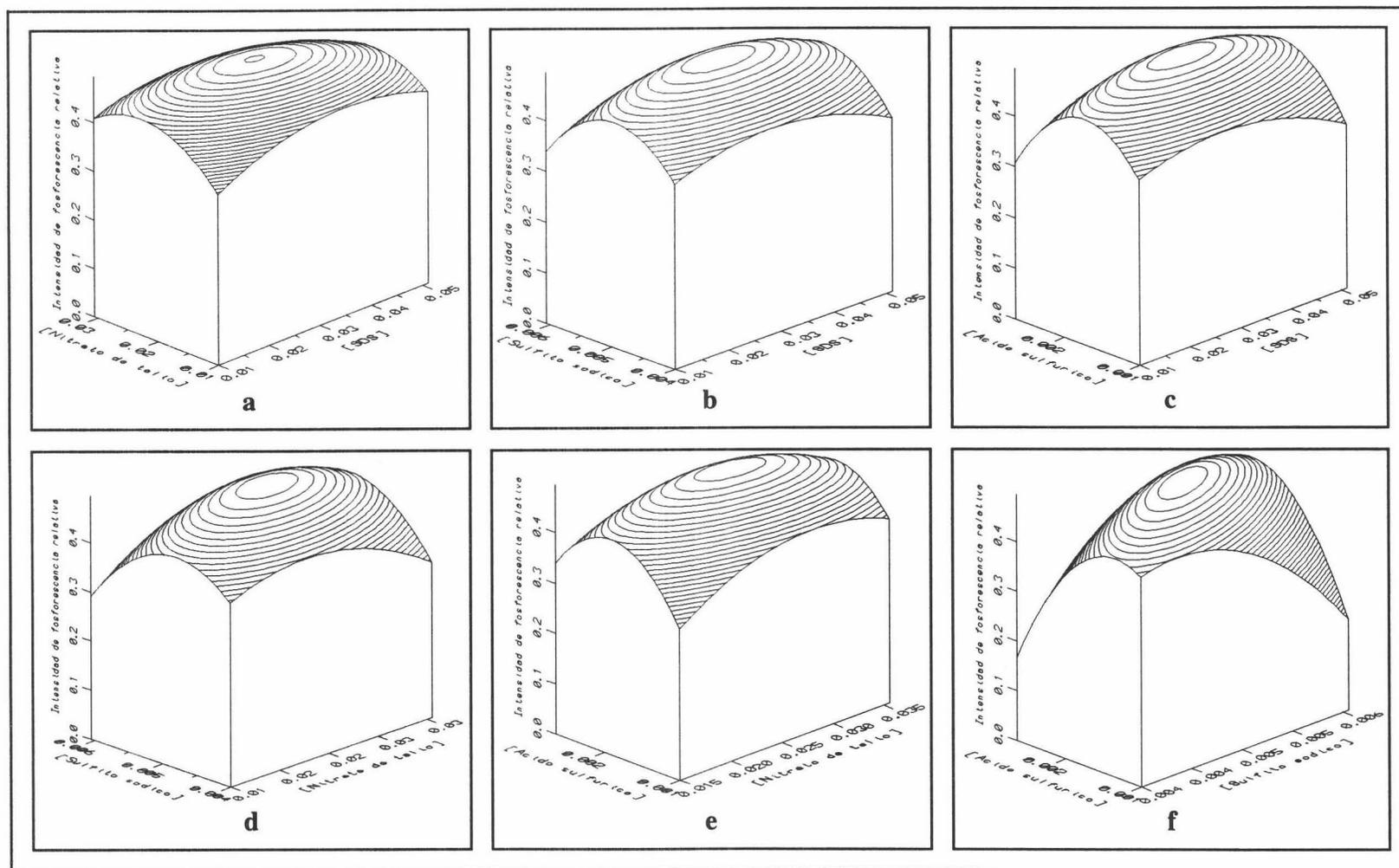


Figura n° II-13.- Variación de la intensidad de fosforescencia del Flt con $[SDS]$ y $[TiNO_3]$ (a), $[SDS]$ y $[Na_2SO_3]$ (b), $[SDS]$ y $[H_2SO_4]$ (c), $[TiNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TiNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y con $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). $[Flt]$ 290 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μs , m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

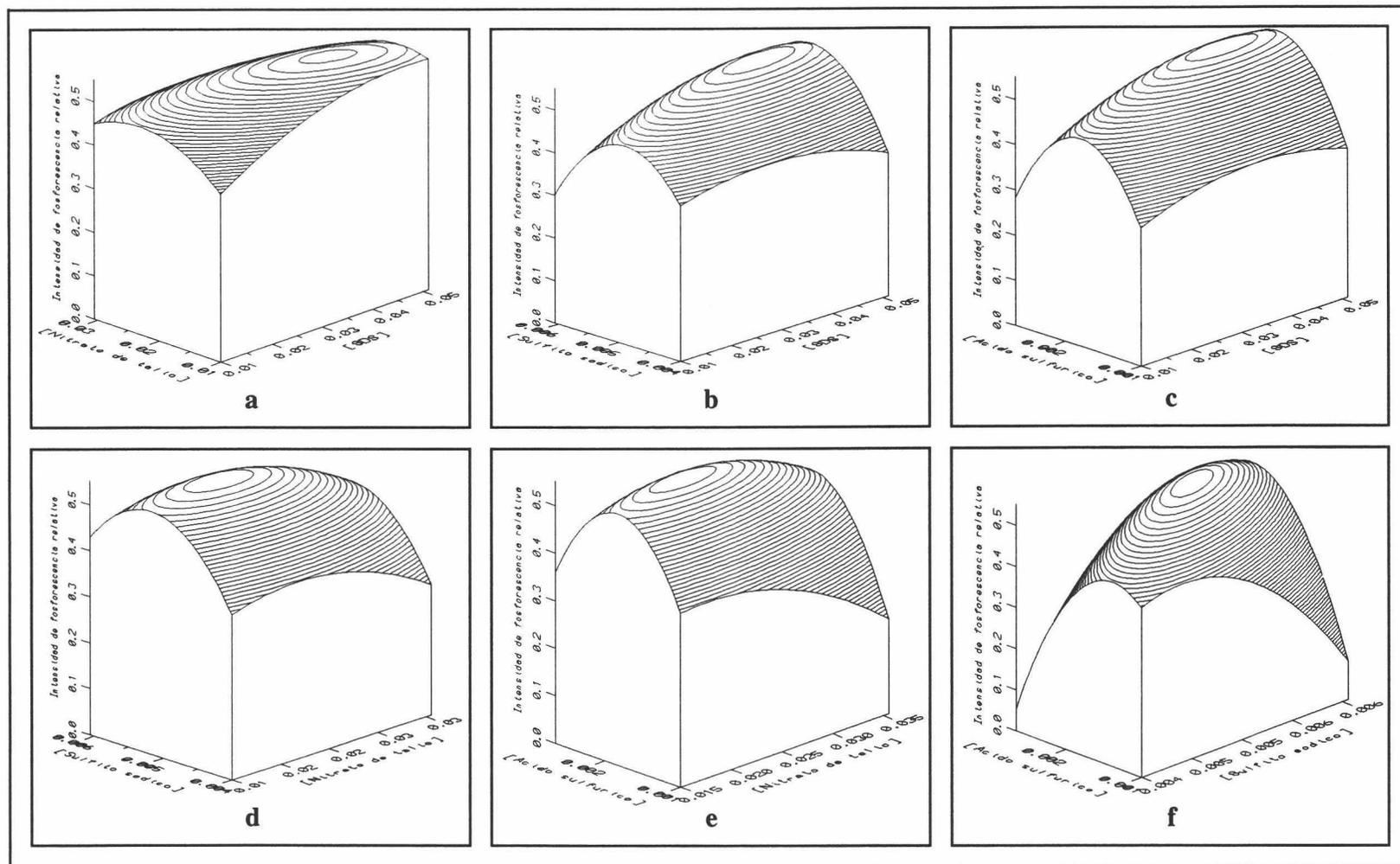


Figura n° II-14.- Variación de la intensidad de fosforescencia del BaA con [SDS] y [TlNO₃] (a), [SDS] y [Na₂SO₃] (b), [SDS] y [H₂SO₄] (c), [TlNO₃] y [Na₂SO₃] (d), [TlNO₃] y [H₂SO₄] (e) y con [Na₂SO₃] y [H₂SO₄] (f). [BaA] 220 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm, $t_{d/g}$ 3000/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

3.2. Selección del tipo de microemulsión.

Para la selección del tipo de microemulsión se siguió el siguiente procedimiento: Se prepararon disoluciones madre añadiendo a 100 μl de una disolución $2'4 \cdot 10^{-2}$ M de cada uno de los HAP estudiados en n-pentano o n-hexano o n-heptano, 100 μl de 1-butanol o 1-pentanol enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A distintas alícuotas de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M (40 μl de Fen, 60 μl de Flt y 40 μl de BaA) se les añadió 670 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TlNO_3 0'25 M, 526 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Las concentraciones finales de Fen, Flt y BaA son 170, 290 y 220 ng/ml. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla n° II-13.

Tabla n° II-13.- Selección del agente emulsionante.

Agente emulsionante	$I_{\text{Fosf.}}$		
	Fen	Flt	BaA
N-pentano/1-butanol	0'66	0'47	0'54
N-pentano/1-pentanol	0'68	0'46	0'52
N-hexano/1-butanol	0'68	0'47	0'55
N-hexano/1-pentanol	0'67	0'48	0'56
N-heptano/1-butanol	0'69	0'49	0'56
N-heptano/1-pentanol	0'68	0'47	0'55

Fen $\lambda_{\text{exc/em}}$ 296/464 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 Flt $\lambda_{\text{exc/em}}$ 358/552 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 BaA $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/610 nm, $t_{\text{d/g}}$ 3000/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

En esta Tabla se observa que no existen diferencias significativas entre los distintos agentes emulsionantes estudiados, debido a la escasa diferencia estructural que existe entre ellos, pudiendo considerar que el agente emulsionante actúa como agente solubilizador no afectando excesivamente la intensidad de fosforescencia. Se eligió el n-heptano/1-butanol como agente emulsionante para el resto del trabajo experimental.

Seleccionado el agente emulsionante, se procedió a establecer la proporción óptima de 1-butanol y n-heptano. Los proporciones estudiadas se exponen en la Tabla n° II-14. Se observa que no existen diferencias significativas en la intensidad de fosforescencia de los tres compuestos cuando se modifican las proporciones de n-heptano y 1-butanol, pero

debido a que, como se indica en el Capítulo I, en la selección del tipo de microemulsión hay que tener en cuenta el tiempo de medida, se optó por emplear para el resto del trabajo experimental las siguientes proporciones:

1 % N-heptano y 1 % 1-butanol

Tabla nº II-14.- Estudio de la proporción de n-heptano/1-butanol.

Microemulsión	% N-heptano	% 1-butanol	I _{Fosf.}		
			Fen	Flt	BaA
1	1	1	0'68	0'49	0'56
2	2	2	0'65	0'45	0'54
3	3	3	0'66	0'46	0'53
4	0	1	0'64	0'46	0'53
5	0	2	0'66	0'48	0'54
8	1	2	0'69	0'49	0'55
9	1	3	0'70	0'50	0'56
10	1	4	0'70	0'50	0'57
11	1	5	0'69	0'49	0'58
12	1	6	0'68	0'47	0'57

Fen $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 Flt $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 BaA $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm, $t_{d/g}$ 3000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

3.3. Optimización del volumen de muestra.

Una variable experimental que influye sobre el tiempo de medida es el volumen introducido en la cubeta debido a la existencia de una cinética en la reacción de desoxigenación de la disolución que contiene al analito. Para llevar a cabo esta experiencia, se procedió de la siguiente forma: *Se prepararon una serie de disoluciones adicionando a 40 μ l de una disolución madre $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en Fenantreno y Benz[a]antraceno y $3'6 \cdot 10^{-4}$ M en Fluoranteno en n-heptano/1-butanol/SDS, 670 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 526 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones se tomaron distintos volúmenes, comprendidos entre 1'5 y 4 ml, en la cubeta de medida, registrando la variación de la intensidad de fosforescencia con el tiempo a los máximos de emisión de*

cada uno de los analitos (Fen, 296/464 nm; Flt, 358/552 nm; BaA, 292/610 nm) y a las condiciones instrumentales propias de cada analito e indicadas en la Tabla n° II-14. La representación gráfica del tiempo de estabilización de las medidas frente al volumen introducido en la cubeta y el tipo de analito se refleja en la Figura n° II-15.

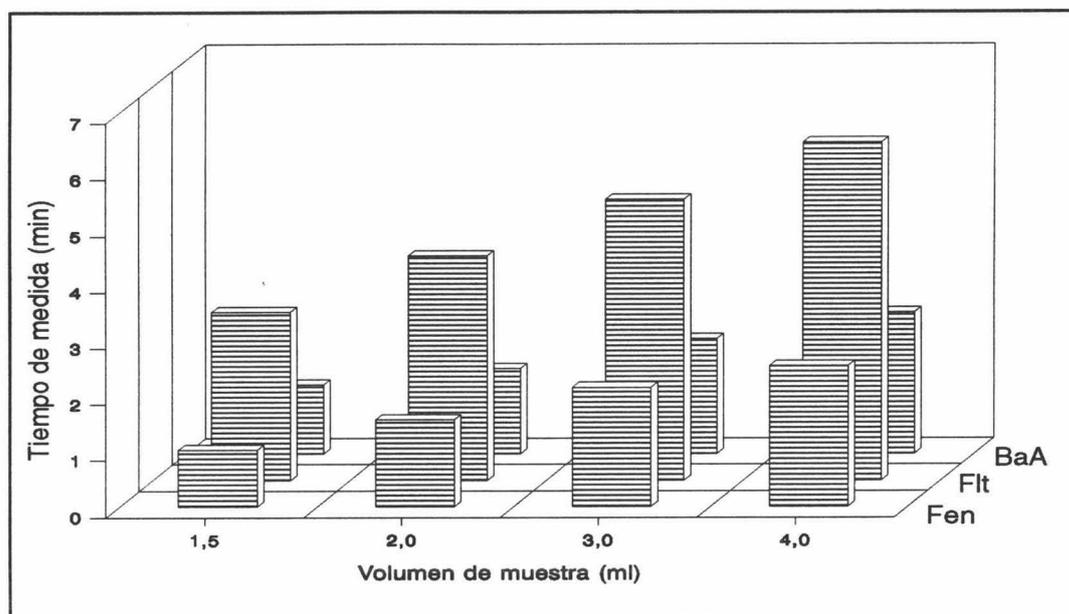


Figura n° II-15.- *Influencia del volumen de muestra en el tiempo de medida.*

Se observa que los tiempos de estabilización de la señal dependen del volumen introducido en la cubeta, aumentando conforme aumenta éste, siendo una tendencia general para los tres analitos. Se observa que los mayores tiempos de desoxigenación se obtienen para el Flt debido a que se excita a una longitud de onda menos energética que en los otros dos casos. Por tanto, para el resto del trabajo experimental, se eligió 1'5 ml como volumen óptimo para introducir en la cubeta de medida.

Volumen de muestra 1'5 ml

3.4. *Influencia del orden de adición.*

Se han estudiado distintos órdenes de adición para la preparación de las muestras, no observándose diferencias significativas entre ellos. Para llevar a cabo esta experiencia se prepararon una serie de disoluciones mezclando 50 μ l de una disolución madre $2'4 \cdot 10^{-4}$

M en Fenantreno y Benz[a]antraceno y $3'6 \cdot 10^4$ M en Fluoranteno en n-heptano/1-butanol/SDS, 670 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TiNO_3$ 0'25 M, 526 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μ l de H_2SO_4 0'02 M en distintos órdenes enrasando con agua hasta 10 ml. De estas disoluciones, así preparadas, se introdujeron 1'5 ml en la cubeta de medida y se registró la intensidad de fosforescencia a los máximos de emisión fosforescente de los tres analitos. Los resultados se reflejan en la Tabla n° II-15.

Tabla n° II-15.- Influencia del orden de adición.

Orden de adición	$I_{Fosf.}$		
	Fen	Flt	BaA
M + SDS + $TiNO_3$ + Na_2SO_3 + H_2SO_4 + H_2O	0'69	0'49	0'56
M + $TiNO_3$ + H_2SO_4 + SDS + Na_2SO_3 + H_2O	0'67	0'48	0'54
M + H_2SO_4 + $TiNO_3$ + Na_2SO_3 + SDS + H_2O	0'70	0'49	0'55
M + $TiNO_3$ + SDS + H_2SO_4 + Na_2SO_3 + H_2O	0'68	0'49	0'54
M + H_2SO_4 + SDS + $TiNO_3$ + Na_2SO_3 + H_2O	0'69	0'50	0'53
$TiNO_3$ + SDS + Na_2SO_3 + M + H_2SO_4 + H_2O	0'68	0'51	0'57
SDS + Na_2SO_3 + M + $TiNO_3$ + H_2SO_4 + H_2O	0'68	0'50	0'55
$TiNO_3$ + M + H_2SO_4 + Na_2SO_3 + SDS + H_2O	0'69	0'49	0'55
Na_2SO_3 + H_2SO_4 + SDS + M + $TiNO_3$ + H_2O	0'67	0'48	0'56

^{Fen} $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
^{Flt} $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
^{BaA} $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm, $t_{d/g}$ 3000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

No se observaron diferencias significativas entre los distintos órdenes de adición probados, por lo que se mantuvo el orden de adición hasta ahora utilizado y que fue:



3.5. Influencia de la temperatura.

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la intensidad de fosforescencia emitida por los tres analitos; la experiencia desarrollada se refleja en la Figura n° II-16. Para ello, se llevó a cabo el siguiente procedimiento operatorio: Se prepara una disolución conteniendo 40 μ l de una disolución madre $2'4 \cdot 10^4$ M en Fenantreno y Benz[a]antraceno y $3'6 \cdot 10^4$ M en Fluoranteno en n-heptano/1-butanol/SDS, 670 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TiNO_3$ 0'25 M, 526 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua

destilada hasta 10 ml; se introducen 1'5 ml de la misma en una cubeta de medida, variando la temperatura del baño termostático desde 10 a 45 °C a intervalos de 5 °C midiendo la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm y $t_{d/g}$ 200/2000 μs para el Fen, $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm y $t_{d/g}$ 200/2000 μs para el Flt, $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm y $t_{d/g}$ 3000/2000 μs para el BaA con rendijas $_{exc/em}$ 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V en los tres casos.

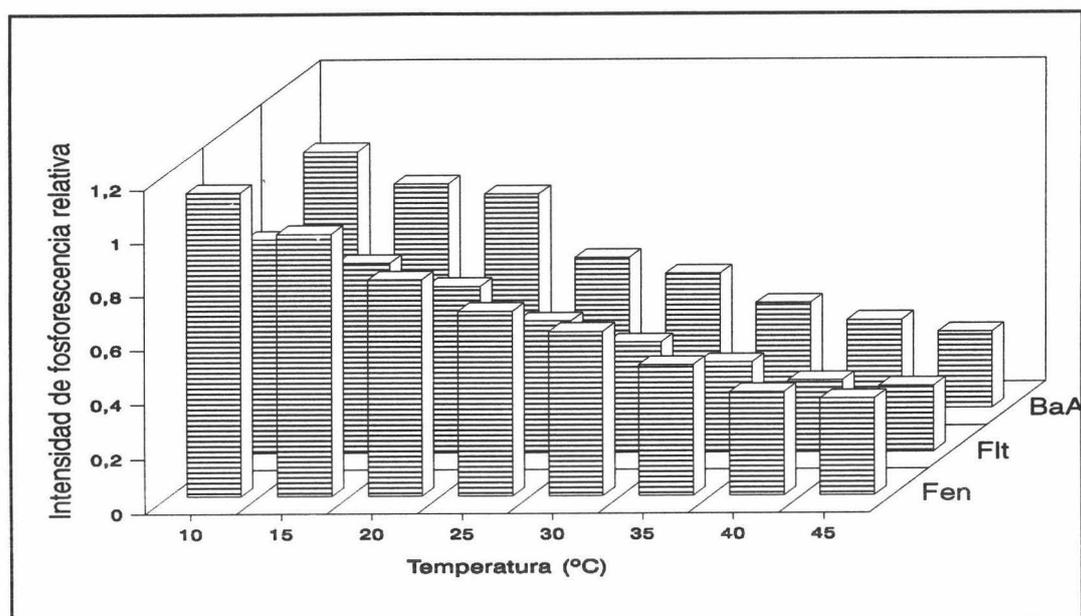


Figura n° II-16.- *Influencia de la temperatura.* [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml y [BaA] 220 ng/ml, [SDS] $3'35 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'27 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'61 \cdot 10^{-3}$ M.

Para los tres analitos se observa una disminución en la intensidad de fosforescencia al aumentar la temperatura, ya que se incrementa la energía interna de las moléculas favoreciendo las desactivaciones por choques intermoleculares. Siendo conveniente la termostatación de la célula de medida. Se optó por termostatar a una temperatura cercana a la temperatura ambiente (25 °C).

Temperatura 25 °C

3.6. Estabilidad con el tiempo.

Para llevar a cabo esta experiencia se siguió el procedimiento operatorio del apartado anterior fijando la temperatura a 25°C. Este estudio es el que se muestra en la Figura n° II-17, donde se observa que, tras un pequeño tiempo de aproximadamente 2 minutos para el Fen y del BaA y de 6 minutos para el Flt, la señal permanece estable al menos durante una hora, tiempo suficiente para realizar la medidas analíticas.

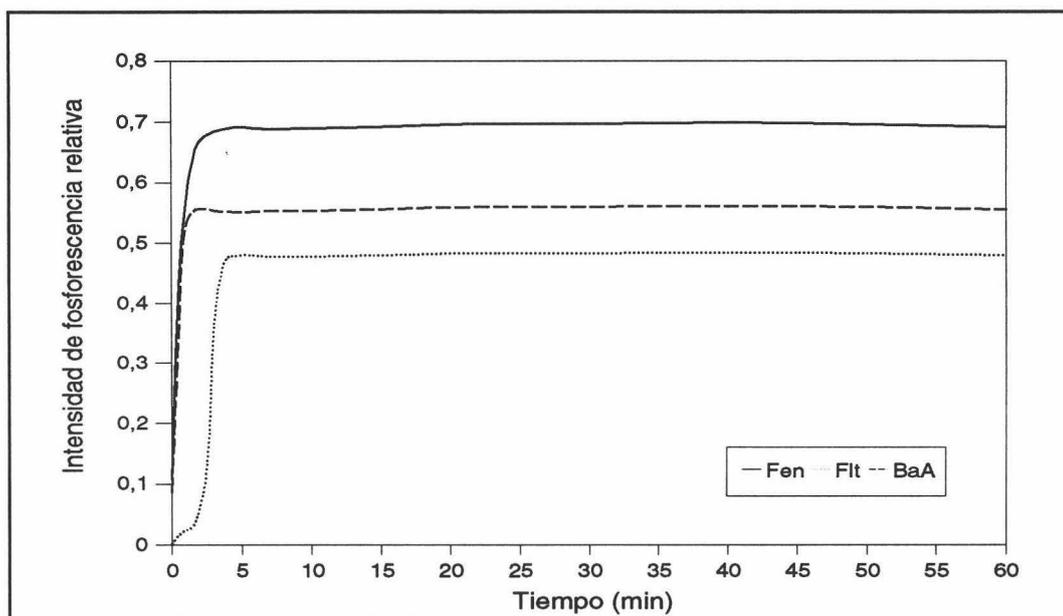


Figura n° II-17.- *Estabilidad con el tiempo.* [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml y [BaA] 220 ng/ml, [SDS] $3'35 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'27 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'61 \cdot 10^{-3}$ M.

3.7. Influencia de la concentración de analito.

Para determinar de una forma precisa cual es el rango dinámico lineal donde se puede desarrollar el método es necesario el estudio de la influencia de la concentración de analito sobre el sistema en esas condiciones de trabajo.

Se llevó a cabo la siguiente metodología: *a distintas alícuotas de una disolución madre de Fen, Flt o BaA $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se les añaden 670 µl de SDS 0'5 M, 1000 µl de TlNO₃ 0'25 M, 526 µl de Na₂SO₃ 0'1 M y 806 µl de H₂SO₄ 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml de forma que la concentración de*

analito variara entre 0 a 510 ng/ml para el Fen, entre 0 a 870 ng/ml para el Flt y entre 0 a 660 ng/ml para el BaA. De estas muestras se introducen 1'5 ml en la cubeta de medida, y se mide la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales propias de cada analito: $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm y $t_{d/g}$ 200/2000 μs para el Fen, $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm y $t_{d/g}$ 200/2000 μs para el Flt, $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm y $t_{d/g}$ 3000/2000 μs para el BaA con rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V en los tres casos.

La representación gráfica de este estudio se refleja en la Figura II-18. Existen, para los tres analitos, un amplio rango de concentración donde la respuesta varía linealmente con la concentración, este rango comprende de 0 a 340 ng/ml para el Fen, entre 0 a 680 ng/ml para el Flt y entre 0 a 440 ng/ml para el BaA, observándose la mayor variación de la intensidad de fosforescencia con la concentración para el Fen y la menor para el Flt.

Rango dinámico lineal

Fen: 0-340 ng/ml

Flt: 0-680 ng/ml

BaA: 0-440 ng/ml

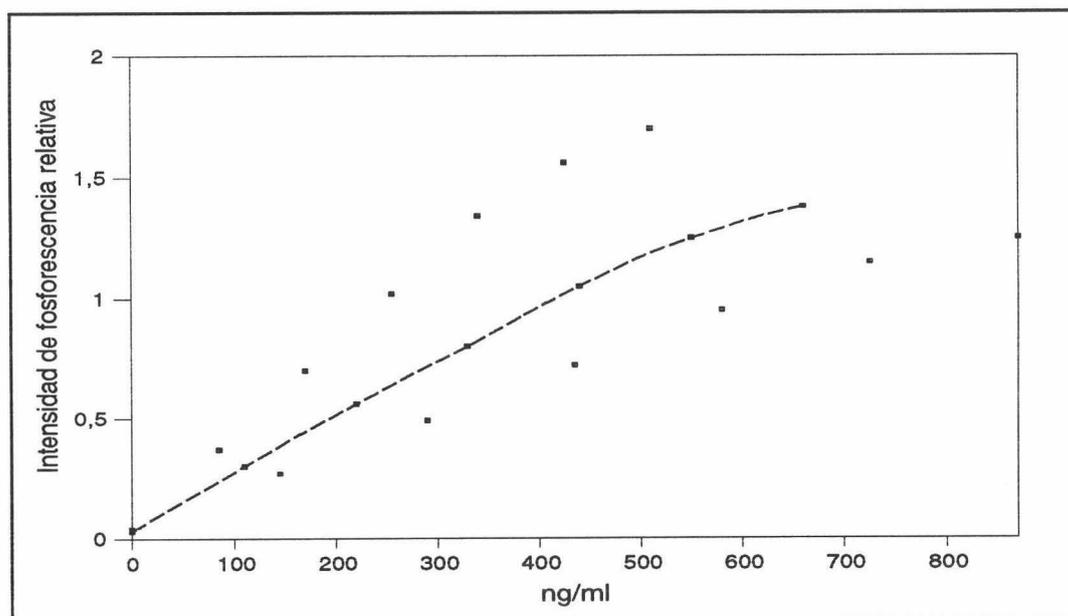


Figura nº II-18.- Estudio de la influencia de la concentración de Fen (—), Flt (---) y BaA (· · ·). [SDS] $3'35 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'27 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'61 \cdot 10^{-3}$ M.

4. Selección de otros parámetros instrumentales.

4.1. Optimización del mínimo período de flash.

La existencia de una cinética en la obtención de señal fosforescente, influenciada por la luz, convierte al pulso de la lámpara en una variable instrumental a optimizar. Se siguió el siguiente procedimiento: *Se prepararon tres disoluciones adicionando a 50 μl de una disolución madre $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en Fen y BaA y $3'6 \cdot 10^{-4}$ M en Flt en n-heptano/1-butanol/SDS, 670 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 526 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml. A estas muestras se les registraron las curvas de desarrollo de la fosforescencia en función del tiempo variando el pulso de la lámpara entre 5 ms (velocidad máxima de pulso) y 30 ms, estableciendo el tiempo al cual se producía la estabilización de la señal.*

Los resultados se muestran en la Tabla n° II-16, en la cual se ofrecen los tiempos de estabilización de la señal para cada uno de los tres analitos, en función de la velocidad del pulso de la lámpara.

Tabla n° II-16.- Optimización del m.p.f..

m.p.f. (ms)	Tiempo de estabilización (min)		
	Fen	Flt	BaA
5	1	3	1
10	2	5	2
20	3	7	4
30	4	9	5

^{Fen} $\lambda_{\text{exc/em}}$ 296/464 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.
^{Flt} $\lambda_{\text{exc/em}}$ 358/552 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.
^{BaA} $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/610 nm, $t_{\text{d/g}}$ 3000/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

El tiempo de estabilización de las medidas aumenta conforme disminuye la velocidad de pulso (es decir, cuando el m.p.f. aumenta) manteniéndose constante la intensidad de fosforescencia. Se puede concluir que la velocidad de pulso óptima será, por tanto, la más rápida posible.

m.p.f. 5 ms

4.2. Optimización de la longitud de onda de excitación.

La longitud de onda de excitación influye sobre el tiempo de estabilización de las medidas. Tres muestras de los HAP en estudio preparadas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, permiten registrar la variación de la intensidad de fosforescencia con el tiempo, y comparar los tiempos de estabilización para distintas longitudes de onda de excitación. Los resultados obtenidos de tiempo de estabilización en función de la longitud de excitación empleada, se resumen en la Tabla nº II-17.

El Fluoranteno posee dos máximos de excitación a 290 y 352 nm, absorbiendo en una amplia zona del espectro, lo que permite el estudio de la influencia de la λ_{exc} desde 280 nm hasta 360 nm. Para los otros dos analitos (Fenantreno y Benz[a]antraceno) la zona de estudio es mucho más reducida.

Tabla nº II-17.- Optimización de la λ_{exc} .

λ_{exc} (nm)	Tiempo de estabilización (min)		
	Fen	Flt	BaA
280	1'5	1'5	1'5
290	2'0	2'0	2'0
300	3'0	3'0	3'0
310	5'0	4'5	4'0
320	-	5'0	-
330	-	6'0	-
340	-	7'0	-
350	-	8'0	-
360	-	9'0	-

^{Fen} $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.
^{Flt} $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.
^{BaA} $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm, $t_{d/g}$ 3000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

De esta tabla se deduce que a medida que aumenta la longitud de onda de excitación, y por tanto, se trata de longitudes de onda menos energéticas, se requiere un tiempo mayor para llevar a cabo la cinética de desoxigenación, por lo que conviene emplear longitudes de onda mas cortas.

λ_{exc} 290 nm

5. Estudio de los parámetros analíticos.

Antes de establecer las distintas rectas de calibrado para los tres analitos en estudio, es necesario determinar la interdependencia de las señales analíticas generadas por los tres compuestos independientemente y como composición de una mezcla. A partir de este estudio se determina la posibilidad de realizar una cuantificación directa de los analitos, a partir de su espectro asincrónico, o bien, la necesidad de derivar para conseguir señales analíticas independientes, si la influencia de uno en otro es significativa.

5.1. Estudio de la interdependencia de las señales analíticas.

En primer lugar, se prepararon cuatro muestras conteniendo la primera 170 ng/ml de Fen, la segunda 290 ng/ml de Flt, la tercera 220 ng/ml de BaA y la cuarta la suma de las tres; a las cuales se les añadió 670 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de TINO₃ 0'25 M, 526 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 806 μ l de H₂SO₄ 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Posteriormente se registraron los espectros correspondientes siguiendo la ruta ya optimizada anteriormente y cuyas coordenadas son: 250/440 nm, 400/535 nm, 230/604 nm y 400/620 nm, con rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm, m.p.f. de 5 ms, sensibilidad 1000 V y $t_{d/g}$ 200/2000 μ s para los dos primeros tramos de la ruta y 3000/2000 μ s para el tercer tramo de la ruta.

En la Figura II-19 se muestran dichos espectros en los que puede observarse el máximo de emisión de cada uno de los analitos a los siguientes valores:

$\lambda_{exc/em}$: 294/464 nm para Fen, 358/552 nm para Flt y 292/610 nm para BaA

así como el espectro de la mezcla, comprobando que éste es prácticamente la suma de los espectros individuales.

La ruta utilizada permite la determinación directa de cada uno de los analitos sin necesidad de derivar. En la Tabla nº II-18 se muestran las medidas de intensidad de fosforescencia correspondientes a cada uno de los analitos, tanto en sus espectros individuales como en el correspondiente a la mezcla, así como los errores relativos de unas medidas respecto a otras.

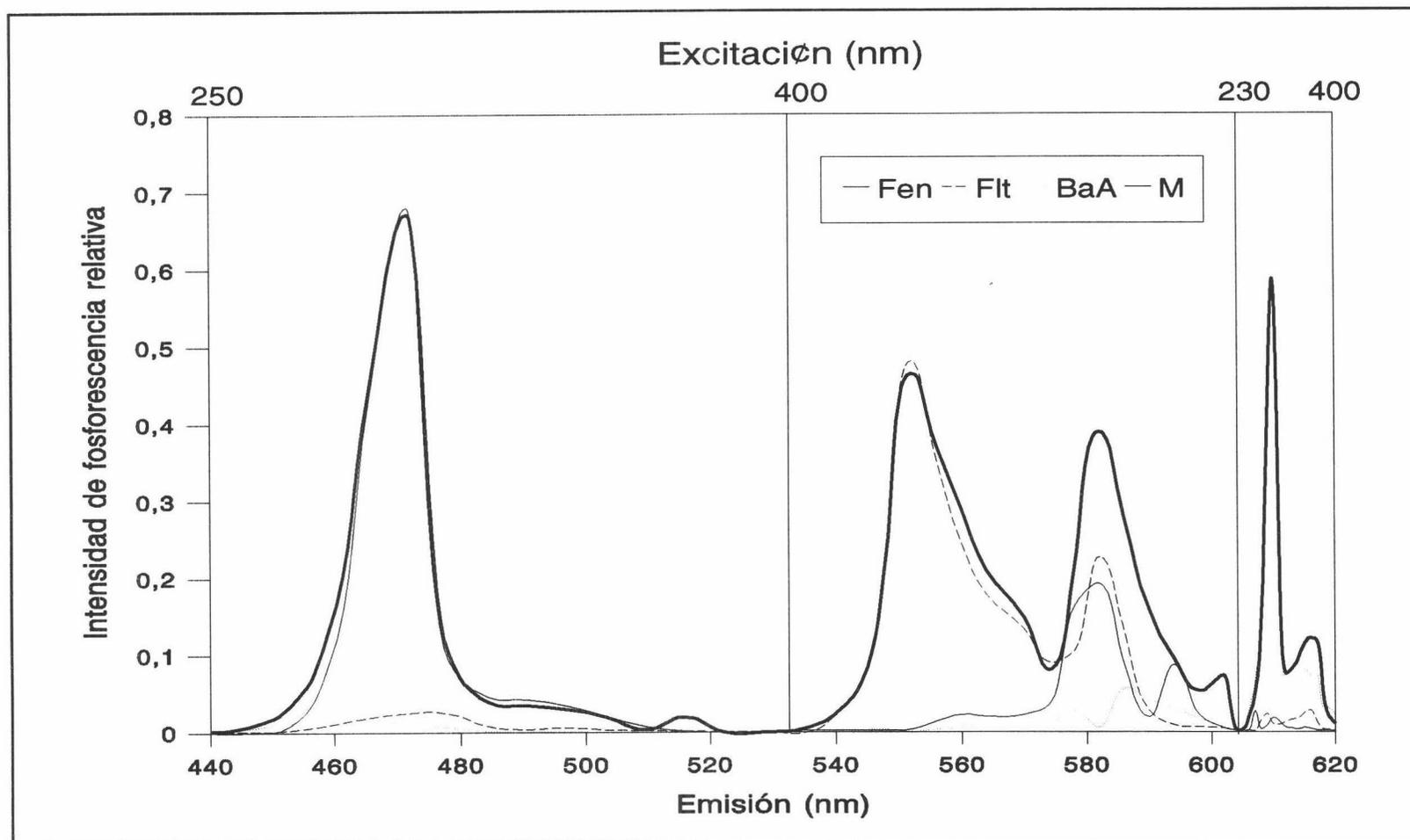


Figura n° II-19.- *Interdependencia de las señales correspondientes a los espectros de los componentes por separado y de la mezcla de Fen, Flt y BaA. [Fen] 170 ng/ml, [Flt] 290 ng/ml, [BaA] 220 ng/ml, [SDS] $3'35 \cdot 10^{-2}$ M, $[TiNO_3]$ $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $5'27 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'61 \cdot 10^{-3}$ M. $t_{d/g}$ 200/2000 μs para los dos primeros tramos y 3000/2000 μs para el tercero, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.*

Tabla n° II-18.- *Interdependencia de las señales analíticas.*

	Fenantreno	Fluoranteno	Benz[a]antraceno
$I_{\text{Fosf.}}$ individual	0'680	0'482	0'561
$I_{\text{Fosf.}}$ mezcla	0'672	0'464	0'586
% de error relativo	-1'2	-1'8	2'5

Los errores obtenidos son admisibles por lo que no se intentó la mejora de los resultados por derivación. Para derivar se debe registrar el espectro en cada caso, lo que dificulta el método, por lo que se optó por el registro de la intensidad de fosforescencia a las longitudes de onda de medida.

5.2. Procedimiento operatorio.

En un matraz de 10 ml se colocan alícuotas de una disolución $2'4 \cdot 10^4$ M en Fenantreno, Fluoranteno o Benz[a]antraceno en *n*-heptano/1-butanol/SDS de forma que la concentración de éstos variase entre 0 y 255 ng/ml, entre 0 y 580 ng/ml y entre 0 y 440 ng/ml, respectivamente para cada analito. Se adicionan 670 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de TiNO_3 0'25 M, 526 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μ l de H_2SO_4 0'02 M y se enrasa con agua destilada. De esta disolución así preparada se adicionan 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso con un período de 5 ms a la longitud de onda de excitación 296 nm, 358 nm y 292 nm para cada uno de los analitos respectivamente y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide a los 2 minutos (6 minutos para el Fluoranteno) después de empezar a irradiar a una longitud de onda de emisión de 464 nm, 552 nm y 610 nm para el Fen, Flt y BaA respectivamente con un m.p.f. de 5 ms, t_d de 200 μ s (excepto para el BaA que es de 3000 μ s), t_g de 2000 μ s y un voltaje en el detector de 1000 V.

5.3. Rectas de calibrado.

Se han establecido dos rectas de calibrado para cada analito, con objeto de comprobar la independencia entre las señales analíticas de los tres HAP, de muestras que contenían cantidades crecientes de uno de los HAP, en ausencia y presencia de concentraciones intermedias de los otros dos.

a) Rectas de calibrado individuales.

Se prepararon tres series de cinco disoluciones cada una de ellas, en cada una de las cuales se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de Fen, Flt y BaA $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en *n*-heptano/1-butanol/SDS de forma que las concentraciones variaran entre 0 y 255 ng/ml, entre 0 y 580 ng/ml y entre 0 y 440 ng/ml, respectivamente para cada analito. Seguidamente, se les añadió 670 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TiNO_3$ 0'25 M, 526 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml.

Las condiciones operatorias fueron: *Coordenadas de la ruta* 250/440 nm, 400/535 nm, 230/604 nm y 400/620 nm, *rendijas de excitación y emisión* 16/16 nm, *m.p.f.* 5 ms, *sensibilidad* 1000 V y *t_{d/g}* 200/2000 μ s para los dos primeros tramos de la ruta y 3000/2000 μ s para el tercer tramo de la ruta. En las Figuras n° II-20, II-21 y II-22, se recogen los espectros obtenidos.

Se comprueba observando las figuras correspondientes a los calibrados de los tres analitos en estudio, que a las condiciones instrumentales elegidas, ninguno posee interferencia espectral sobre los otros dos, por lo que se concluye que es posible la resolución de esta mezcla a concentraciones dentro de los rangos lineales establecidos.

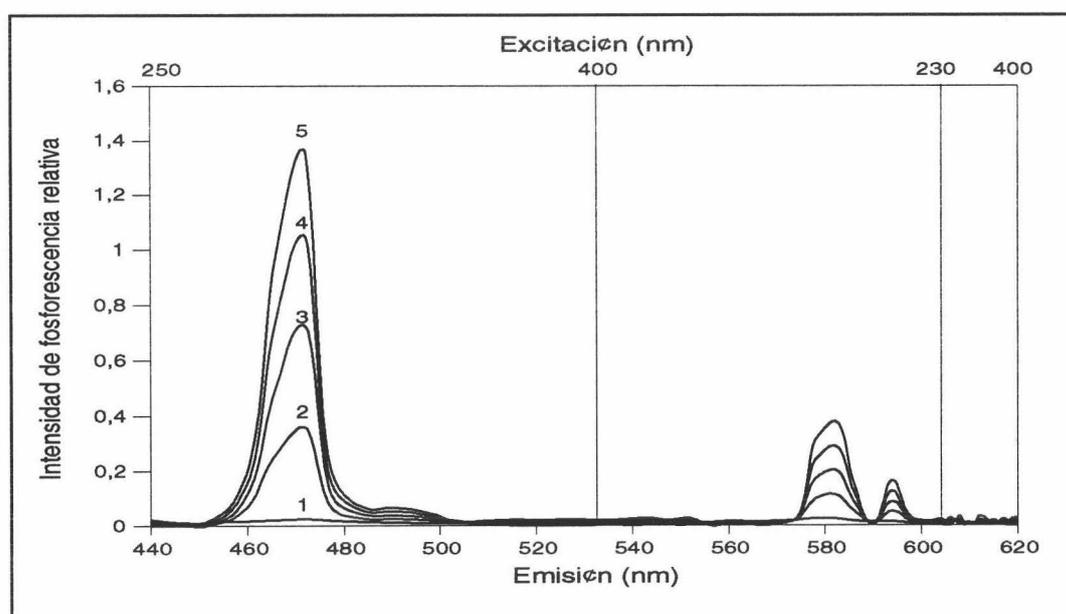


Figura n° II-20.- Calibrado correspondiente al Fen. (1) 0, (2) 85, (3) 170, (4) 255 y (5) 340 ng/ml.

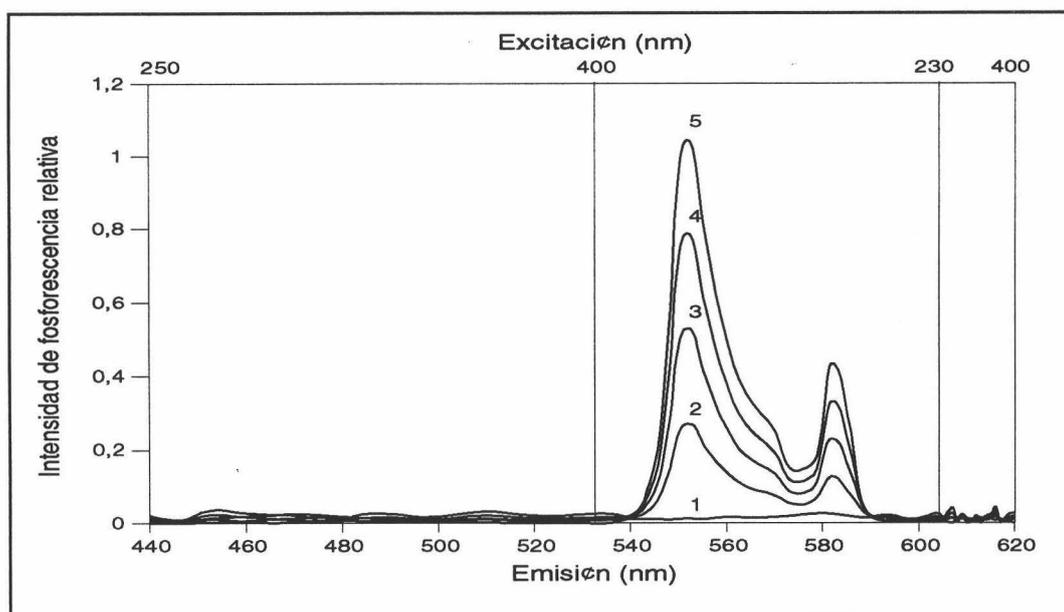


Figura n° II-21.- *Calibrado correspondiente al Flt. (1) 0, (2) 145, (3) 290, (4) 435 y (5) 580 ng/ml.*

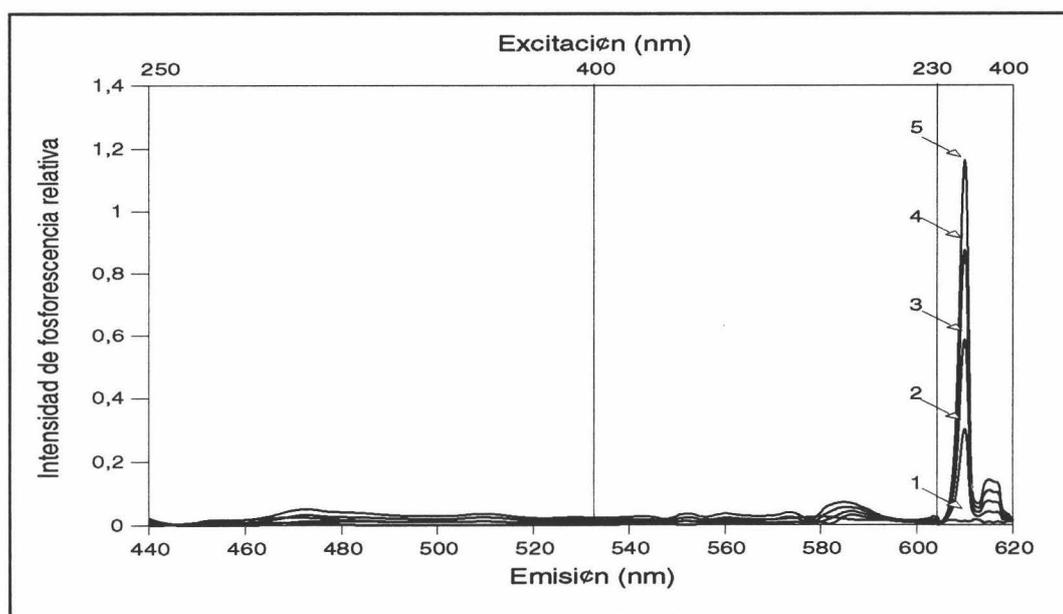


Figura n° II-22.- *Calibrado correspondiente al BaA. (1) 0, (2) 110, (3) 220, (4) 330 y (5) 440 ng/ml.*

Las medidas de intensidad de fosforescencia obtenidas para cada punto de las rectas de calibrado correspondientes a cada uno de los analitos se recogen en las Tablas n° II-19, II-20 y II-21.

Tabla n° II-19.- Réplicas correspondientes al calibrado del Fen.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'038	0'045	0'039
85	0'360	0'380	0'383
170	0'678	0'686	0'681
255	1'012	1'032	1'001
340	1'324	1'331	1'353

Tabla n° II-20.- Réplicas correspondientes al calibrado del Flt.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'027	0'034	0'031
145	0'279	0'262	0'255
290	0'485	0'489	0'495
435	0'720	0'695	0'730
680	0'935	0'960	0'950

Tabla n° II-21.- Réplicas correspondientes al calibrado del BaA.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'034	0'030	0'031
110	0'295	0'310	0'287
220	0'555	0'560	0'550
330	0'790	0'800	0'810
440	1'040	1'051	1'070

Los datos estadísticos obtenidos para las tres rectas en estudio, se resumen en la Tabla n° II-22.

Tabla n° II-22.- *Datos estadísticos de las rectas de calibrado.*

Dato estadístico	Fen	Flt	BaA
Ordenada en el origen (a)	0'043	0'033	0'038
Desviación estándar (s_a)	0'0052	0'0047	0'0046
Desviación estándar relativa (DER(a)) (%)	11'95	14'39	12'12
Pendiente (b)	0'0038	0'0016	0'0023
Desviación estándar (s_b)	0'00001	0'00001	0'00001
Desviación estándar relativa (DER(b)) (%)	0'65	0'84	0'74
Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$)	0'0116	0'0106	0'0103
Coefficiente de correlación (r)	0'9997	0'9995	0'9996
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99'94	99'91	99'93
g	0'0002	0'0003	0'0003

b) *Rectas de calibrado en mezclas.*

La concentración constante fijada para cada uno de los tres analitos ha sido de 170 ng/ml para el Fenantreno, 290 ng/ml para el Fluoranteno y 220 ng/ml para el Benz[a]antraceno. Se han construido así tres rectas de calibrado, variando la concentración de uno de los analitos dentro del rango dinámico lineal de cada uno de ellos y manteniendo constantes las concentraciones correspondientes a los otros dos. Las condiciones instrumentales a las cuales se han llevado a cabo son las indicadas en el procedimiento operatorio. En la Tabla n° II-23 se muestran las funciones de calibrado obtenidas para cada caso.

Tabla n° II-23.- *Funciones de calibrado para las mezclas.*

Analito	a	b	r
Fenantreno	0'042	0'0037	0'999
Fluoranteno	0'033	0'0015	0'999
Benz[a]antraceno	0'037	0'0022	0'999

En esta Tabla se observa que tanto la ordenada en el origen como la pendiente permanecen prácticamente inalterables dentro del error experimental, manteniendo una buena linealidad.

5.4. Parámetros de fiabilidad.

Los parámetros de fiabilidad del método: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido establecidos mediante el modelo de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado. La sensibilidad analítica, así como la linealidad son establecidas mediante el uso de los datos derivados del calibrado, reflejados en las Tablas nº II-19, II-20 y II-21. Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar tanto de los blancos como de los patrones usados para establecer las rectas de calibrado, respectivamente. Los datos de dichas desviaciones estándar se muestran en la Tabla nº II-24.

Tabla nº II-24- Desviaciones estándar en función del calibrado.

ng/ml de analito			s _c		
Fen	Flt	BaA	Fen	Flt	BaA
0	0	0	2'223	4'898	3'275
85	145	110	1'998	4'404	2'939
170	290	220	1'923	4'237	2'827
255	435	330	2'003	4'405	2'941
340	580	440	2'221	4'897	3'260

La estimación de todos los parámetros característicos del método, calculados a partir del modelo de análisis de la regresión se reflejan en la Tabla nº II-25.

Tabla nº II-25.- Parámetros de fiabilidad.

Parámetro	Fen	Flt	BaA			
Linealidad (1-DER(b)%)	99'35	99'16	99'26			
Sensibilidad analítica (ng/ml)	3'04	6'70	4'47			
Límite de detección (ng/ml)	6'67	14'70	9'83			
Límite de cuantificación (ng/ml)	22'23	48'98	32'75			
Rango dinámico lineal (ng/ml)	22'23-340	48'98-580	32'75-440			
Precisión (DER%)	85 ng/ml	2'29	145 ng/ml	2'98	110 ng/ml	2'63
	170 ng/ml	1'15	290 ng/ml	1'46	220 ng/ml	1'27
	255 ng/ml	0'78	435 ng/ml	1'02	330 ng/ml	0'89
	340 ng/ml	0'65	580 ng/ml	0'84	440 ng/ml	0'74

Mediante la representación gráfica de los valores de precisión para cada uno de los valores de concentración del calibrado, es posible por interpolación, estimar la DER (%) para cualquier valor de concentración dentro del rango lineal.

5.5. Estudio de interferencias.

Se llevó a cabo el análisis de la influencia ejercida por la presencia de otros HAP sobre la determinación de los analitos de interés mediante el método propuesto.

Para llevar a cabo dicho estudio *se ha preparado una muestra para cada interferente que contenía 170 ng/ml de Fenantreno, 290 ng/ml de Fluoranteno y 220 ng/ml de Benz[a]antraceno junto con una cierta cantidad de interferente, y a la cual se le añaden 670 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TiNO_3$ 0'25 M, 526 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua hasta 10 ml.* Se registró la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales indicadas al pie de la correspondiente Tabla, estableciendo el nivel de tolerancia para cada especie. En la Tabla n° II-26 se resumen los datos de tolerancia para las distintas especies ensayadas.

Tabla n° II-26.- Nivel de tolerancia de especies extrañas.

Interferente	Nivel de tolerancia (ng/ml)		
	Fen	Flt	BaA
Fluoreno	500	500	330
Pireno	2000	2000	400
Naftaleno	400	30000	30000
Acenafteno	600	740	37000
Antraceno	1000	800	350

^{Fen} $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
^{Flt} $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
^{BaA} $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm, $t_{d/g}$ 3000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.

De esta tabla se deduce que en todos los casos hay una buena tolerancia de las especies ensayadas con relaciones, en algunos casos, del orden de 100 veces. El nivel de tolerancia para cada compuesto depende de la localización espectral y del valor de la vida media del interferente frente a dicho compuesto.

6. Aplicaciones.

El método propuesto se ha aplicado a la determinación simultánea de Fenantreno, Fluoranteno y Benz[a]antraceno en mezclas sintéticas y muestras naturales.

6.1. Resolución de muestras sintéticas.

Se llevó a cabo la determinación conjunta de los tres HAP para distintas proporciones en mezclas de ellos, al objeto de comprobar la validez del método propuesto. Para todas ellas se ha seguido el mismo procedimiento: *en un matraz de 10 ml se añaden los volúmenes necesarios de microemulsión de Fen, Flt y BaA para que la concentración final de los mismos entre dentro del rango lineal, a continuación se le añaden 670 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 526 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua. Se mide la intensidad de fosforescencia a las $\lambda_{exc/em}$ de 296/464 nm, 358/552 nm y 292/610 nm, correspondientes a Fen, Flt y BaA respectivamente en el espectro asincrónico de ángulo variable, calculándose la concentración encontrada, para cada una de las especies en estudio, mediante interpolación en la correspondiente función de calibrado y el error en cada determinación. En la Tabla nº II-27, se resumen los resultados obtenidos.*

Tabla nº II-27.- Estudio de recuperación en muestras sintéticas.

Concentración adicionada (ng/ml)			Concentración encontrada (ng/ml)			Recuperación (%)		
Fen	Flt	BaA	Fen	Flt	BaA	Fen	Flt	BaA
85	580	110	82	565	108	96'5	97'4	98'2
85	290	220	80	275	212	94'1	94'8	96'4
170	145	330	164	142	314	96'5	98'0	95'2
170	435	440	163	420	424	96'3	96'6	96'4
255	145	110	246	137	104	96'5	94'5	94'5
255	290	220	239	269	211	93'8	92'8	95'9
340	580	330	329	562	312	96'8	96'9	94'5
340	435	440	324	424	418	95'3	97'5	95'0

^{Fen} $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
^{Flt} $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
^{BaA} $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm, $t_{d/g}$ 3000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.

En todos los casos estudiados las recuperaciones obtenidas varían entre 90-100 %; el hecho de que éstas no superen el 100 % se debe a la desactivación fosforescente originada por la elevada concentración de moléculas en el corazón micelar. Los resultados obtenidos van a permitir la aplicación del método analítico a la determinación de Fen, Flt y BaA en matrices complejas, en las que pueden llegar a encontrarse a los niveles de concentración que abarca el método, como son muestras de café tostado.

6.2. Muestras de café.

a) Método analítico y resultados.

Como método analítico se ha empleado el de la curva de calibrado con adición de patrón. A una muestra de 5 g de café Nescafé descafeinado se le adicionan 15 ml de ciclohexano y se introduce en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. La muestra se filtra y se lava con 5 ml de ciclohexano, recogiendo el extracto, siendo éste la disolución de muestra. Para la obtención de las curvas de calibrado, se preparó una serie de 5 muestras en matraces de 10 ml, para ello se adicionan 200 μ l de disolución problema evaporando el ciclohexano mediante el paso de N_2 , posteriormente se adiciona la cantidad suficiente de una disolución patrón ($2.4 \cdot 10^{-4}$ M en Fenantreno y Benz[a]antraceno y $3.6 \cdot 10^{-4}$ M en Fluoranteno) para que los valores de la concentración de analito estén dentro del rango lineal del método propuesto. Las condiciones instrumentales a las cuales se efectúan las medidas son las indicadas en el procedimiento operatorio. El contenido de las cinco muestras preparadas se detalla en la Tabla n° II-28.

Tabla n° II-28.- Curvas de adición de patrón.

μ l patrón	μ l muestra	ng/ml de HAP		
		Fen	Flt	BaA
20	200	85	145	110
40	200	170	290	220
60	200	255	435	330
80	200	340	580	440

Una vez seguido el procedimiento anteriormente descrito, de la medida de las intensidades de fosforescencia correspondientes se obtuvieron la siguientes rectas de calibrado que se muestran en la Tabla n° II-29.

Tabla nº II-29.- *Funciones de calibrado para las mezclas.*

Analito	a	b	r
Fenantreno	0'050	0'0035	0'998
Fluoranteno	0'038	0'0017	0'997
Benz[a]antraceno	0'040	0'0024	0'998

El hecho de que los valores de ordenada en el origen y pendiente no se hayan modificado significativamente indican que las concentraciones de los analitos en la muestra problema están por debajo del límite de detección del método propuesto, así como que existe ausencia de efecto matriz.

b) *Estudio de recuperación.*

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Para ello, a una muestra de 5 g de café Nescafé descafeinado se le adicionan distintas cantidades de los analitos en estudio de forma que su concentración entre dentro del rango lineal del método propuesto en cada caso. A la muestra de esta forma preparada se le adicionan 15 ml de ciclohexano y se introduce en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. La muestra se filtra y se lava con 5 ml de ciclohexano, recogiendo el extracto. A 200 μl de esta disolución se le evapora el ciclohexano mediante el paso de N_2 , después se le añaden 40 μl de microemulsión n-heptano/1-butanol/SDS, 670 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 526 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 806 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Las condiciones instrumentales a las cuales son llevadas a cabo las medidas de fosforescencia son las indicadas en el Procedimiento operatorio.

Los valores correspondientes a la intensidad de fosforescencia se interpolan en las funciones de calibrado de la experiencia anterior obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla nº II-30.

En todos los casos ensayados se obtienen porcentajes de recuperación comprendidos entre 90-100 % no superando en ningún caso este valor y no existiendo diferencias significativas entre los tres compuestos analizados.

Tabla n° II-30.- Estudio de recuperación en muestras de café.

Concentración adicionada (ng/ml)			Concentración encontrada (ng/ml)			Recuperación (%)		
Fen	Flt	BaA	Fen	Flt	BaA	Fen	Flt	BaA
85	580	110	78	555	101	91'8	95'7	91'8
85	290	220	79	270	207	92'9	93'8	93'1
170	145	330	162	139	310	95'3	95'9	93'9
170	435	440	160	415	414	94'1	95'4	93'1
255	145	110	242	134	104	94'9	92'4	93'6
255	290	220	238	270	207	92'3	93'3	93'1
340	580	330	329	560	310	96'8	96'6	93'9
340	435	440	321	414	408	94'4	93'8	95'4

^{Fen} $\lambda_{exc/em}$ 296/464 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
^{Flt} $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
^{BaA} $\lambda_{exc/em}$ 292/610 nm, $t_{d/g}$ 3000/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.

Por ello, se puede deducir que la determinación espectrofotométrica conjunta de Fen, Flt y BaA mediante barrido asincrónico es viable en muestras de café tostado, siguiendo la metodología propuesta.

Capítulo III

Determinación fosforimétrica conjunta de Acenafteno, Fluoranteno, Pireno, Benz[a]antraceno y Benzo[a]pireno



1. Características espectroscópicas.

Se procedió a la selección de cinco hidrocarburos aromáticos policíclicos, Acenafteno (Ace), Fluoranteno (Flt), Pireno (Pir), Benz[a]antraceno (BaA) y Benzo[a]pireno (BaP), sobre los cuales se ha propuesto un método conjunto de análisis fosforimétrico empleando el barrido sincrónico de ángulo variable como técnica resolutive.

1.1. Características fluorescentes.

En primer lugar, se registraron los espectros de fluorescencia total de los cinco HAP indicados anteriormente. Para ello, se prepararon una serie de muestras, conteniendo distintas cantidades de HAP de forma que fueran isofluorescentes, siguiendo el siguiente procedimiento: *Se preparó una disolución madre añadiendo a 100 μ l de una disolución $2'4 \cdot 10^{-2}$ M de cada uno de los HAP estudiados en n-heptano, 100 μ l de 1-butanol y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A distintas alícuotas de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M (100 μ l de Ace, 100 μ l de Flt, 50 μ l de Pir, 80 μ l de BaA y 40 μ l de BaP) se les añadió 600 μ l de SDS 0'5 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. De esta forma, la concentración final de cada HAP fue: 370 ng/ml para Ace, 485 ng/ml para Flt, 243 ng/ml para Pir, 438 ng/ml para BaA y 242 ng/ml para BaP. A las muestras así preparadas, se les registró el espectro en las siguientes condiciones instrumentales: *Excitación 250-325 nm para Ace, 250-400 nm para Flt, Pir y BaA y 250-450 nm para BaP, emisión 300-400 nm para Ace, 400-600 nm para Flt y 350-500 nm para Pir, BaA y BaP, velocidad de barrido de 6 nm/s, paso de monocromador 2 y 5 nm para el de emisión y excitación respectivamente, rendijas de excitación y emisión 4/4 nm y sensibilidad 525 V. Los máximos espectrales fluorescentes para Ace, Flt, Pir, BaA y BaP se sitúan, a 300/322, 360/455, 335/394, 290/390 y 390/406 nm, respectivamente.**

1.2. Características fosforescentes.

Se procedió al registro de los espectros de fosforescencia total de los cinco HAP en estudio. Para ello se prepararon una serie de muestras, de forma que fuesen isofosforescentes, siguiendo el siguiente procedimiento: *A distintas alícuotas de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M (42 μ l de Ace, 100 μ l de Flt, 75 μ l de Pir, 48 μ l de BaA y 300 μ l de BaP) se les añadió 600 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de*

Na₂SO₃ 0'1 M y 800 μl de H₂SO₄ 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final para cada HAP fue 155 ng/ml para Ace, 485 ng/ml para Flt, 365 ng/ml para Pir, 263 ng/ml para BaA y 1815 ng/ml para BaP. A estas muestras así preparadas, se les registró el espectro en las siguientes condiciones instrumentales: Excitación 250-350 nm para Ace, 250-425 nm para Flt y BaP y 250-400 nm para Pir y BaA, emisión 400-700 nm para Ace, 500-700 nm para Flt, 500-800 nm para Pir y BaA y 450-800 nm para BaP, velocidad de barrido 6 nm/s, paso de monocromador 2 y 5 nm para emisión y excitación respectivamente, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm, sensibilidad de 1000 V, t_d 200 μs y t_g 2000 μs. Los máximos espectrales fosforescentes para Ace, Flt, Pir, BaA y BaP se sitúan, a 294/594, 358/552, 336/596, 292/610 y 385/695 nm, respectivamente.

1.2.1. Curvas de decaimiento.

Se llevó a cabo el registro de las curvas de decaimiento de los cinco HAP en estudio, procediendo de forma similar a la antes mencionada: *A distintas alícuotas de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M (42 μl de Ace, 100 μl de Flt, 75 μl de Pir, 48 μl de BaA y 300 μl de BaP) se les añadió 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO₃ 0'25 M, 500 μl de Na₂SO₃ 0'1 M y 800 μl de H₂SO₄ 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. A las muestras preparadas de la forma anteriormente descrita se les registró la curva de decaimiento fosforescente a las siguientes condiciones instrumentales: Longitud de onda máxima para cada HAP (298/524 nm para Ace, 358/552 nm para Flt, 336/596 nm para Pir, 292/610 nm para BaA y 385/695 nm para BaP), barrido desde 0 ms hasta 5 ms para Ace y Flt, hasta 15 ms para BaA y BaP y hasta 30 ms para Pir, resolución 50 μs, repeticiones 100, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm y sensibilidad de 1000 V. Registradas las curvas de decaimiento, se calculan mediante ajuste a una curva exponencial, los parámetros vida media, que para los cinco HAP tienen un valor de: 1015 μs para Ace, 1097 μs para Flt, 6825 μs para Pir, 3017 μs para BaA y 2628 μs para BaP.*

Estas tres características luminiscentes, espectro de fluorescencia total, espectro de fosforescencia total y curva de decaimiento fosforescente se muestran para el Acenafteno, Fluoranteno, Pireno, Benz[a]antraceno y Benzo[a]pireno en las Figuras nº III-1, III-2, III-3, III-4 y III-5, respectivamente.

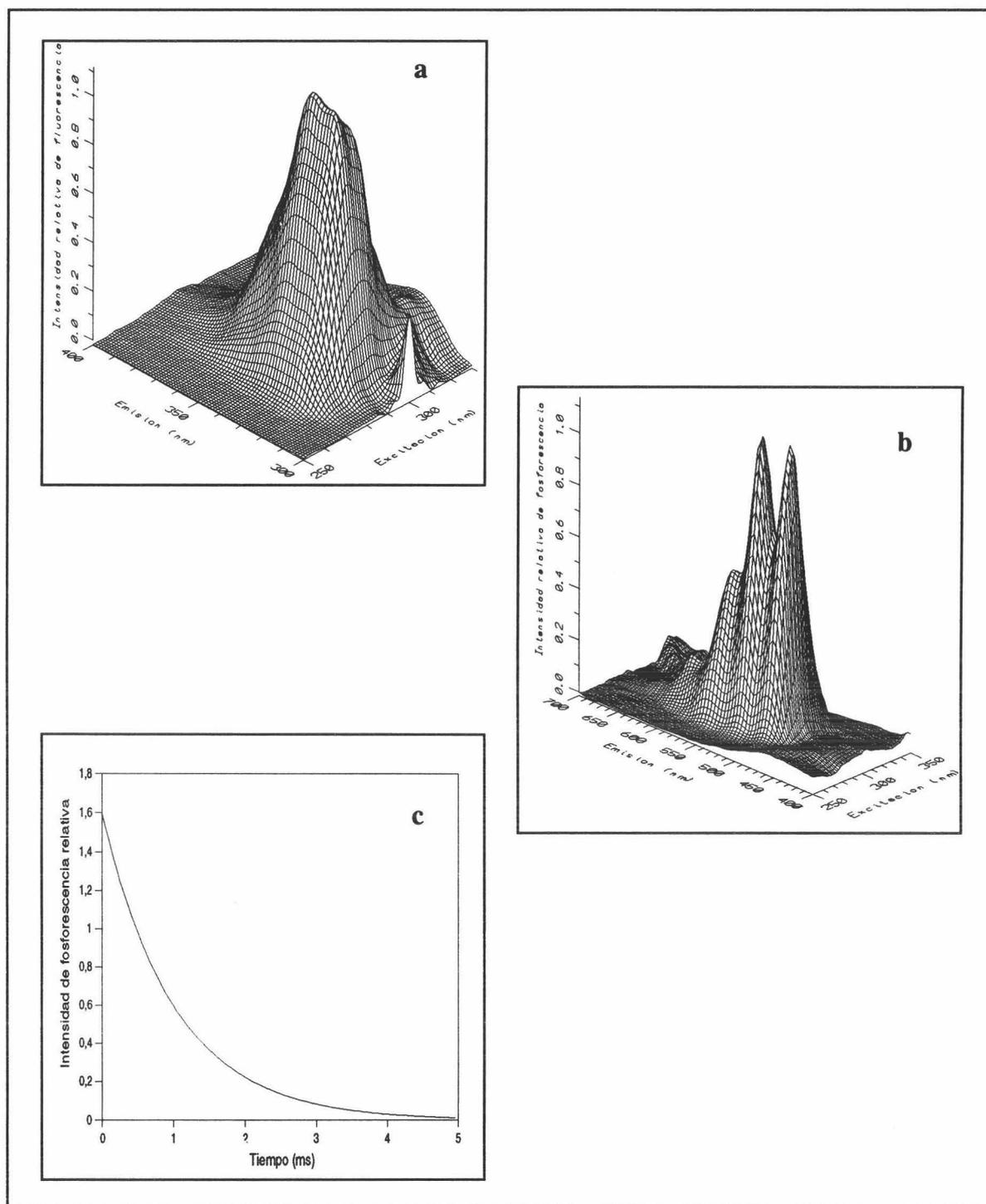


Figura nº III-1.- Espectros de fluorescencia total (a), fosforescencia total (b) y curva de decaimiento fosforescente (c) del Ace. (a) [Ace] 370 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M; (b) y (c) [Ace] 155 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

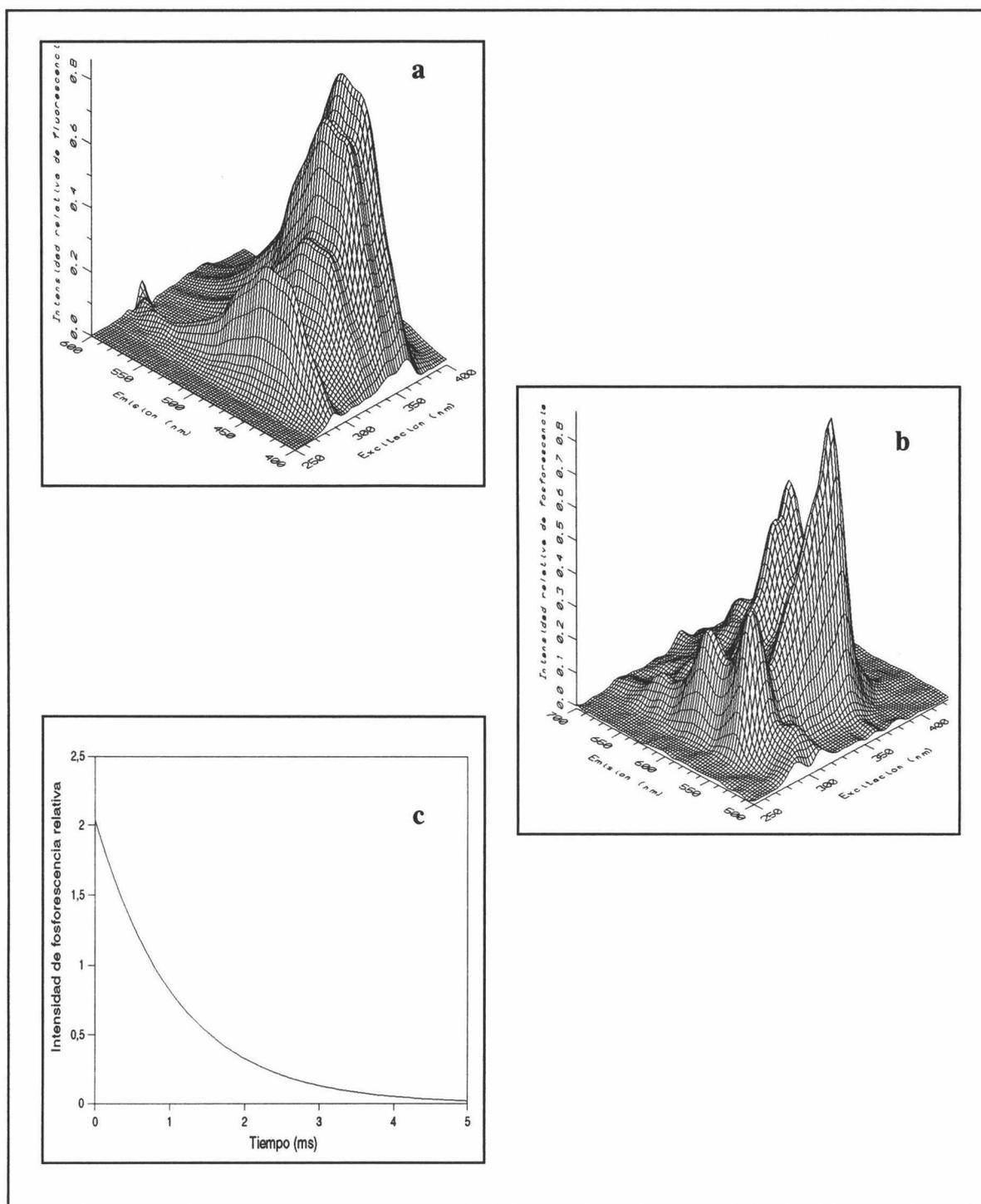


Figura nº III-2.- Espectros de fluorescencia total (a), fosforescencia total (b) y curva de decaimiento fosforescente (c) del Flt. (a) [Flt] 485 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M; (b) y (c) [Flt] 470 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

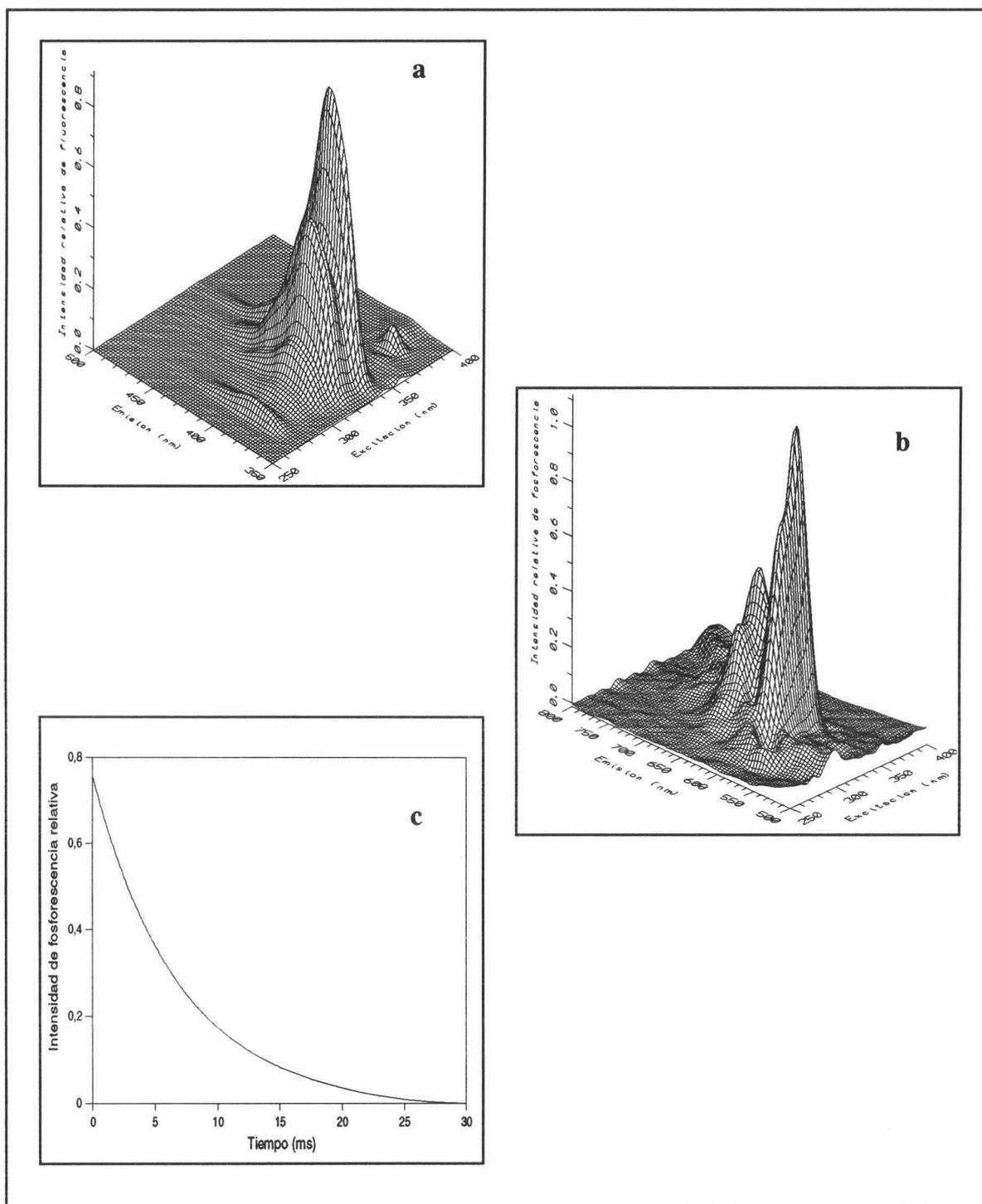


Figura nº III-3.- *Espectros de fluorescencia total (a), fosforescencia total (b) y curva de decaimiento fosforescente (c) del Pir. (a) [Pir] 243 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M; (b) y (c) [Pir] 365 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

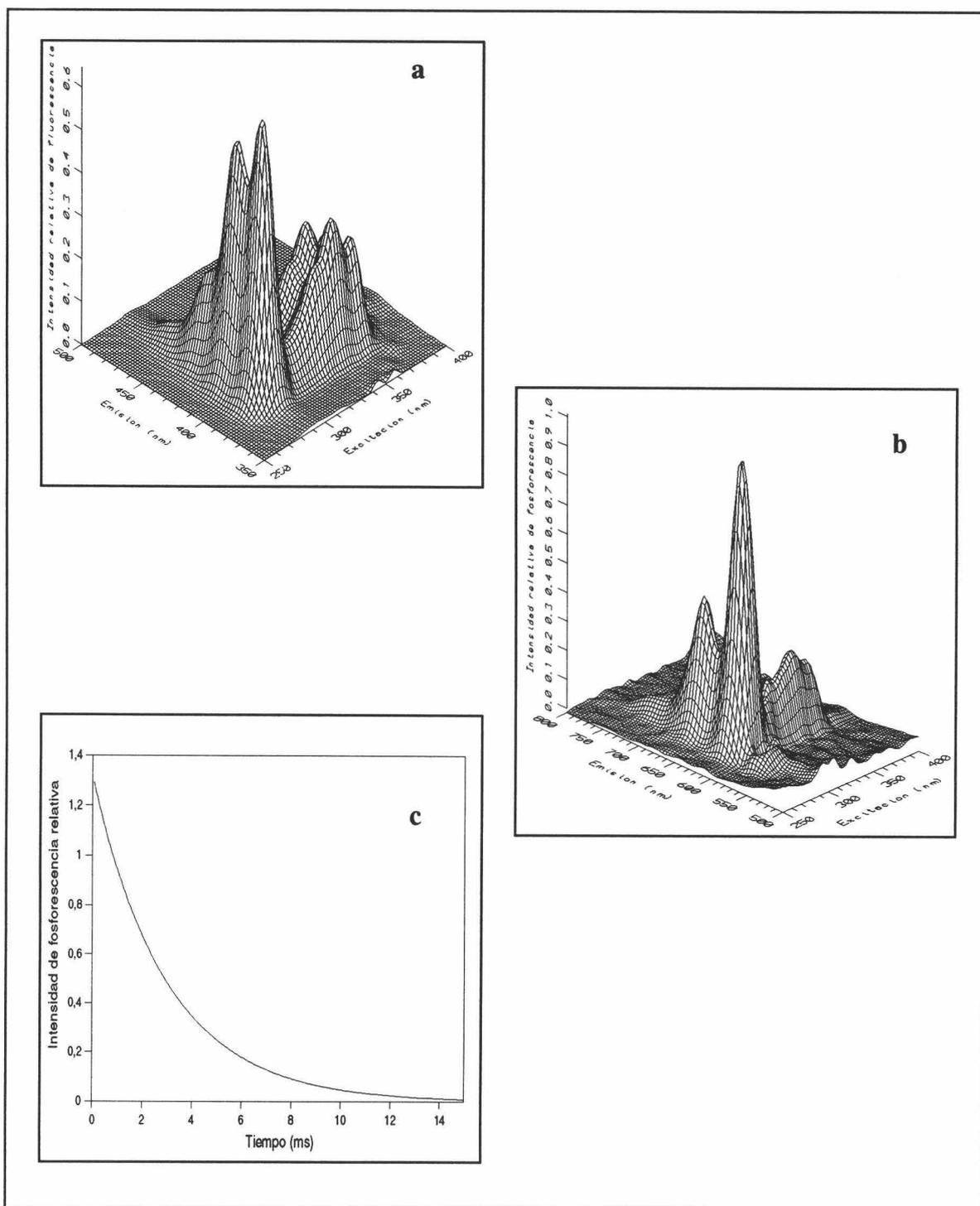


Figura nº III-4.- *Espectros de fluorescencia total (a), fosforescencia total (b) y curva de decaimiento fosforescente (c) del BaA. (a) [BaA] 438 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M; (b) y (c) [BaA] 250 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

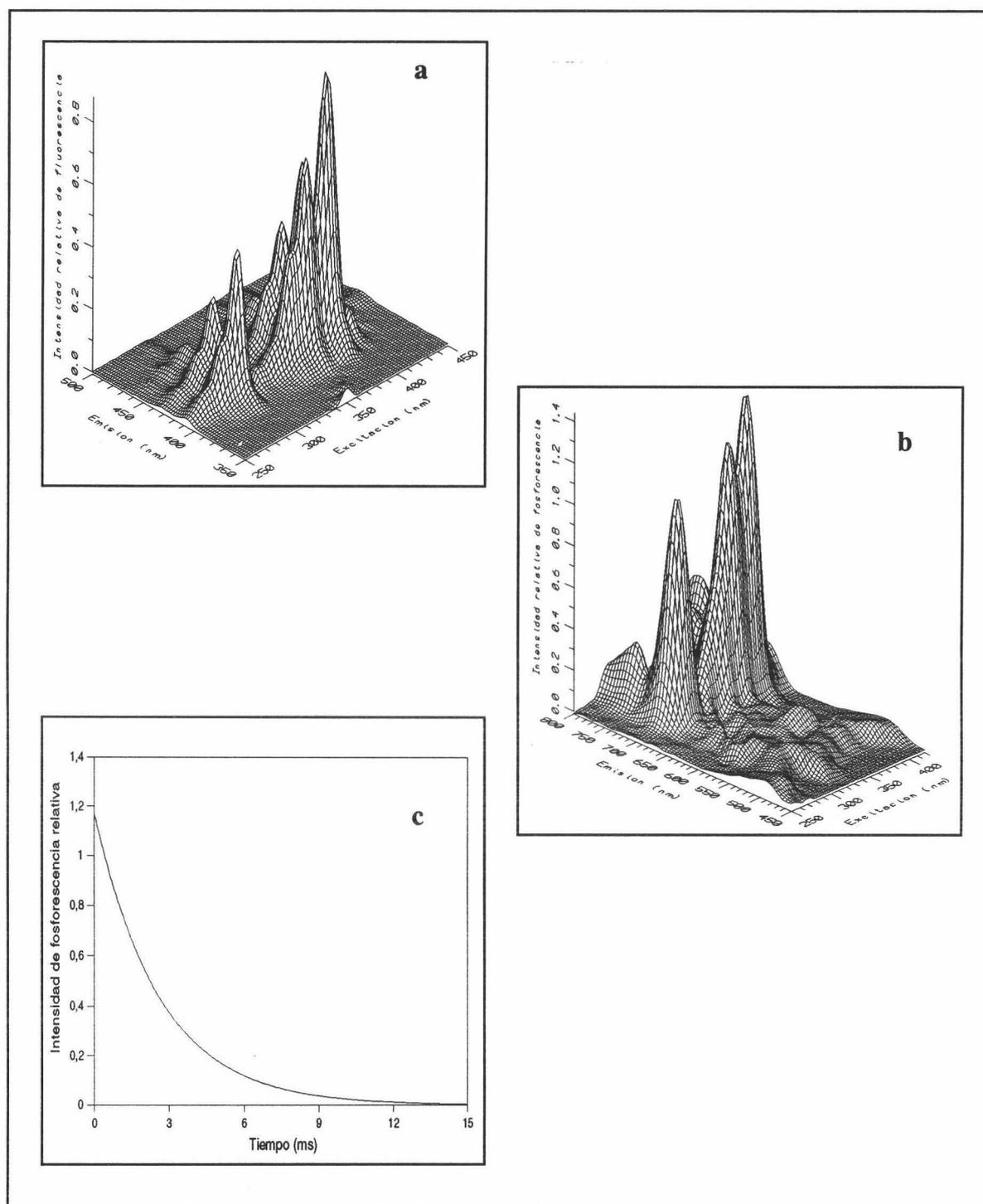


Figura nº III-5.- Espectros de fluorescencia total (a), fosforescencia total (b) y curva de decaimiento fosforescente (c) del BaP (a) [BaP] 242 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M; (b) y (c) [BaP] 1815 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

De igual forma, se procedió al registro del espectro de fosforescencia total, en las mismas condiciones instrumentales, de una muestra conteniendo a los cinco compuestos en estudio. Para ello, a una alícuota de 100 μl de disolución madre de Ace, Flt, Pir, BaA y BaP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en *n*-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TiNO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. El espectro de fosforescencia total junto con el correspondiente mapa de contorno se muestra en la Figura n° III-6.

1.3. Comparación entre la fluorescencia y la fosforescencia.

1.3.1. Contornos fluorescentes.

Se procedió a la comparación de los mapas de contorno de los espectros de fluorescencia total de los cinco HAP (véase Figura n° III-7). Se observa que no es posible la identificación y cuantificación de su mezcla a través de medidas de fluorescencia debido al gran solapamiento espectral que existe entre estos compuestos. Además comparando dichos contornos de dos en dos, se comprueba que:

- Acenafteno: Es posible la determinación en su máximo espectral (300/322 nm), ya que no existe solapamiento espectral con los otros compuestos estudiados.

- Fluoranteno: No sería posible la identificación y cuantificación en su máximo espectral, ya que existe solapamiento parcial con Pir, BaA y, sobre todo, con BaP, debiendo medir a longitudes de onda alejadas del máximo (360/455 nm).

- Pireno: No sería posible su identificación en su máximo (335/394 nm), debido al solapamiento espectral con BaA. También le interfieren Flt y BaP.

- Benz[a]antraceno: Sería posible su determinación en su máximo espectral (290/390 nm), aunque le interfieren Flt y, sobre todo, BaP.

- Benzo[a]pireno: Se puede determinar en su máximo espectral (390/406 nm) aunque le interfieren BaA, Pir y Flt.

La gran densidad espectral existente en la región entre 375 y 450 nm para la longitud de onda de emisión, da cuenta de la imposibilidad de desarrollo de un método fluorimétrico para la resolución de esta mezcla de HAP. Como se indica en la Figura n° III-7, sólo Ace no presentaría solapamiento con ninguno de los otros cuatro; Flt y BaP se

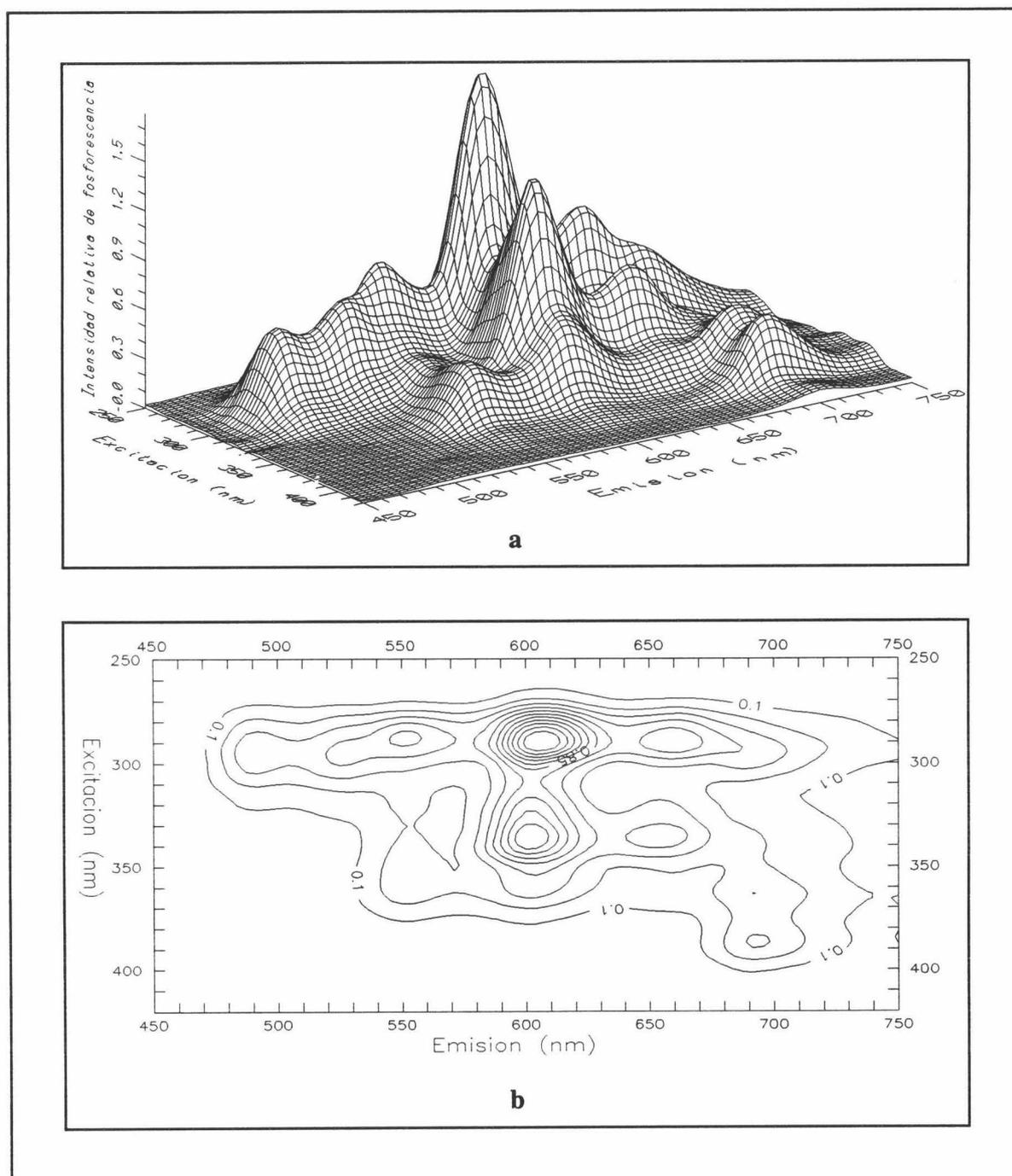


Figura nº III-6.- Espectro de fosforescencia total (a) y mapa de contorno (b) la mezcla de Ace, Flt, Pir, BaA y BaP. [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 485 ng/ml, [BaA] 548 ng/ml, [BaP] 606 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sens. 1000 V.

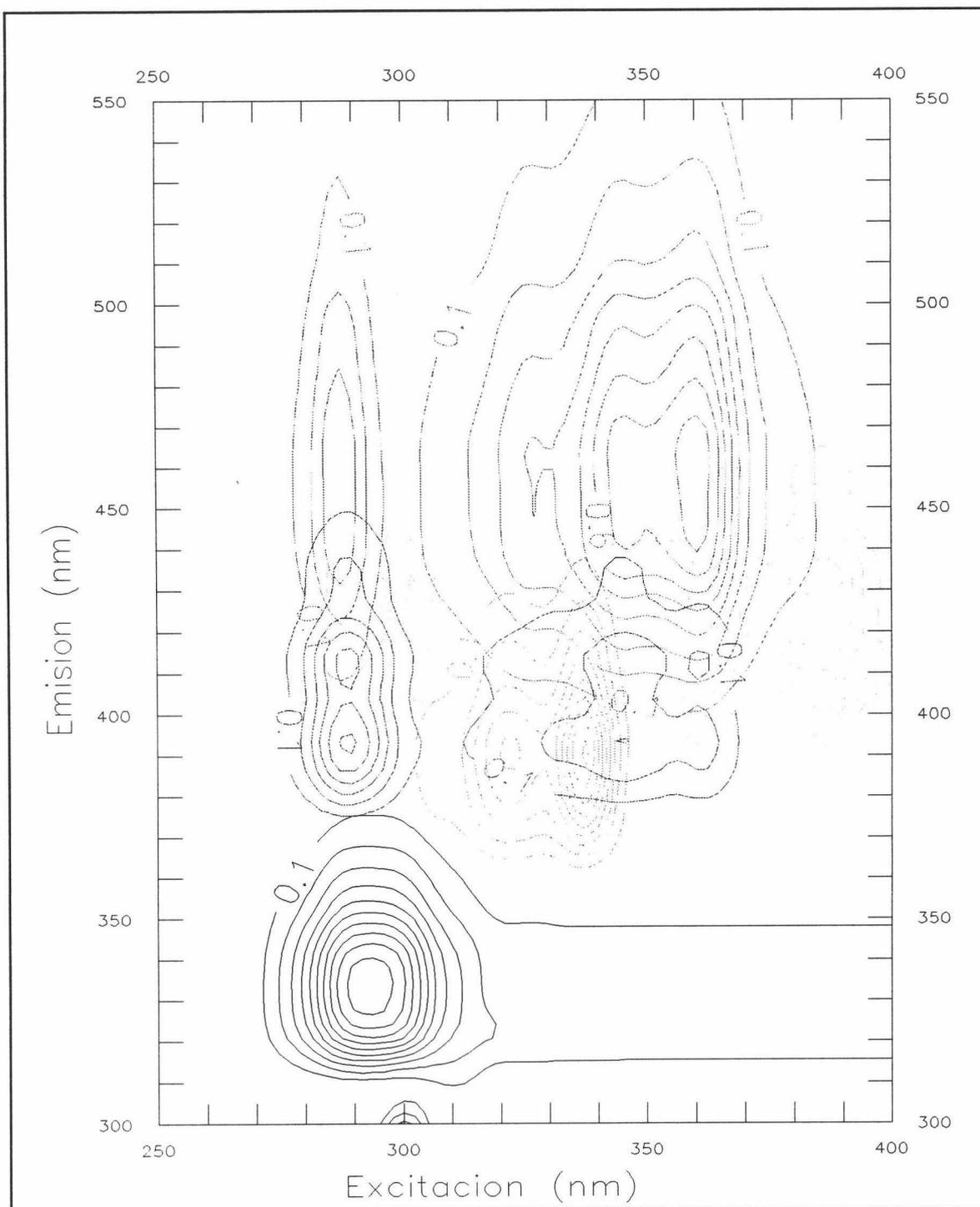


Figura n° III-7.- Contorno de los espectros de fluorescencia del Ace (-), Flt (- -), Pir (---), BaA (-) y BaP (---). [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 243 ng/ml, [BaA] 438 ng/ml, [BaP] 242 ng/ml y [SDS] $3 \cdot 00 \cdot 10^{-2}$ M.

podrían determinar en su máximo espectral aunque existe un gran solapamiento espectral entre ambos y con Pir y BaA; mientras que la determinación de Pir y BaA no sería posible por el gran solapamiento espectral entre ellos, y especialmente, con Flt y BaP.

1.3.2. Contornos fosforescentes.

Comparando los mapas de contorno de los espectros de fosforescencia total (véase Figura nº III-8) así como los valores de vida media anteriormente descritos de los cinco HAP en estudio, se comprueba que es posible la determinación de la mezcla mediante medidas de fosforescencia. Comparando dichos contornos de dos en dos, se comprueba que:

- Acenafteno: Es posible la identificación y cuantificación a uno de sus máximos espectrales fosforescentes (294/488 nm), puesto que no existe solapamiento espectral con ningún otro compuesto de la mezcla en dicho máximo.

- Fluoranteno: Se puede determinar a su máximo de excitación y emisión fosforescente (358/552 nm), aunque exista solapamiento con Ace, Pir y BaA.

- Pireno: Se puede determinar a su máximo espectral (336/596 nm), ya que aunque Flt y BaA le interfieren en su máximo de emisión fosforescente, la vida media del Pir (6825 μ s) es muy superior a la de los otros dos (1097 μ s para Flt y 3017 μ s para BaA), por lo que su determinación es posible modificando el parámetro tiempo de decaimiento (t_d).

- Benz[a]antraceno: Se podría determinar a su máximo espectral (290/615 nm), ya que al igual que para el Pir, aunque Ace y Flt le interfieren en su máximo de emisión, la vida media del BaA (3017 μ s) es superior a la de los otros dos (1015 μ s para Ace y 1097 μ s para Flt), por lo que su determinación es posible modificando el tiempo de decaimiento. La interferencia de más difícil solución es la del Pireno, ya que, aunque es una interferencia parcial, la vida media de éste es mucho mayor que la del BaA, por lo que se tiene que modificar la longitud de onda de medida.

- Benzo[a]pireno: Es posible su determinación en su máximo espectral (385/695 nm), puesto que ninguno de los otros cuatro componentes de la mezcla le interfieren en dicho máximo.

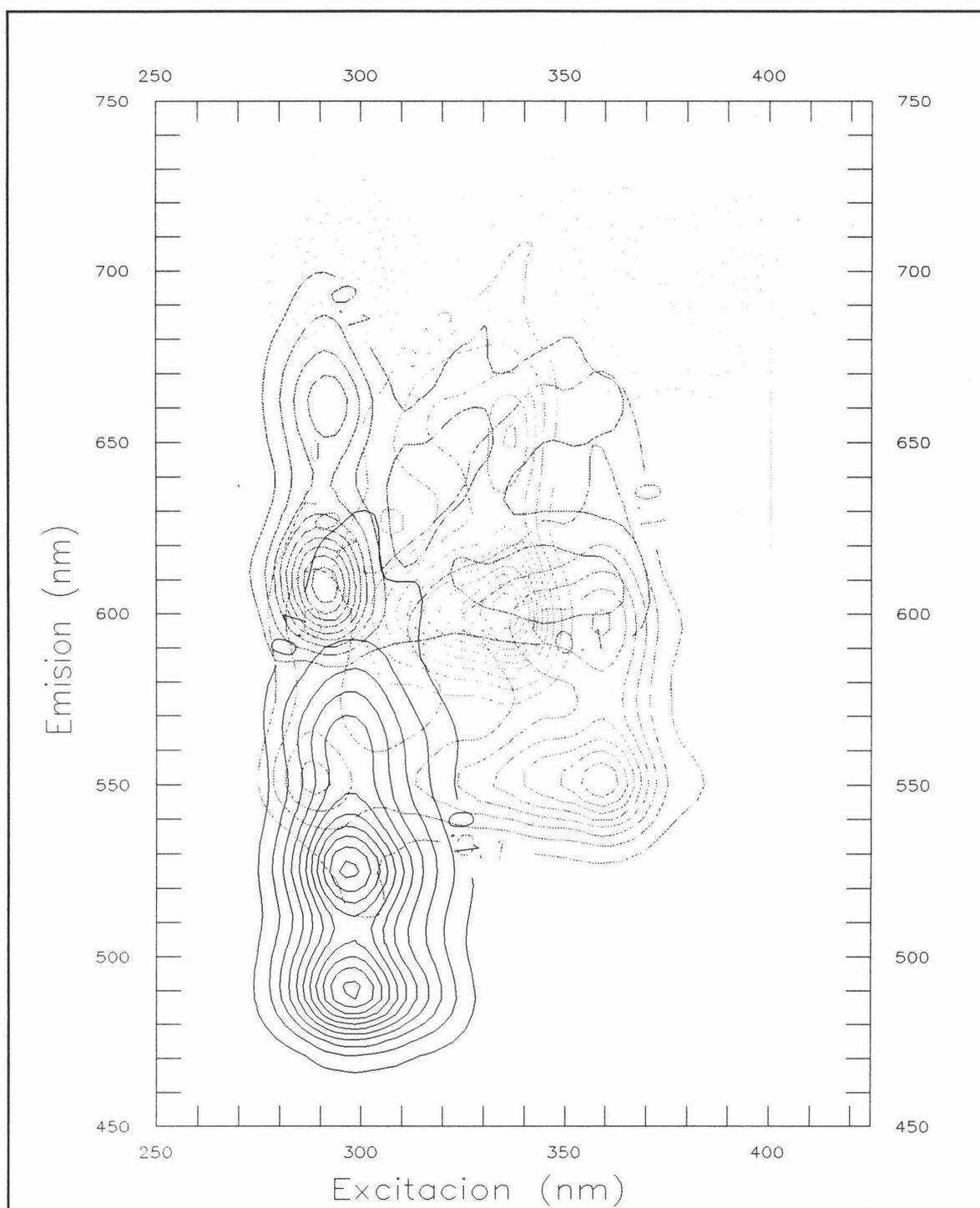


Figura n° III-8.- Contornos de los espectros de fosforescencia del Ace (—), Flt (---), Pir (---), BaA (—) y BaP (---). [Ace] 155 ng/ml, [Flt] 470 ng/ml, [Pir] 365 ng/ml, [BaA] 250 ng/ml, [BaP] 1815 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

Observando la Figura nº III-8, se comprueba, que es posible la determinación en su máximo espectral del Acenafteno, Fluoranteno y Benzo[a]pireno, existiendo un gran solapamiento espectral por parte de los dos primeros en la región de medida del Benz[a]antraceno y del Pireno, pero que, debido a las diferencias de vida media existentes entre estos últimos y el Acenafteno y el Fluoranteno, es perfectamente viable la determinación.

Aunque se intenta demostrar que la fosforescencia es una técnica más selectiva que la fluorescencia, es importante no olvidar que ambas son técnicas complementarias que se podrían aplicar simultáneamente a una misma mezcla de analitos. A las condiciones de fosforescencia establecidas para esta u otra mezcla de HAP, se pueden registrar señales de fluorescencia midiendo en el mismo instante del pulso de la lámpara, obteniendo así mayor información sobre el sistema que puede servir para la resolución de ciertas mezclas complejas.

2. Selección de las condiciones de medida y de la ruta.

Para llevar a cabo la optimización de los distintos parámetros instrumentales se van a preparar seis muestras utilizando los siguientes procedimientos operatorios:

- **Muestra Ace:** A una alícuota de 100 μl de disolución madre de Acenafteno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TiNO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de Ace fue de 370 ng/ml.

- **Muestra Flt:** A una alícuota de 100 μl de disolución madre de Fluoranteno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TiNO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de Flt fue de 485 ng/ml.

- **Muestra Pir:** A una alícuota de 100 μl de disolución madre de Pireno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TiNO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de Pir fue de 485 ng/ml.

- **Muestra BaA:** A una alícuota de 100 μl de disolución madre de Benz[a]antraceno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μl de

SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de BaA fue de 548 ng/ml.

- Muestra BaP: A una alícuota de 100 μ l de disolución madre de Benzo[a]pireno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de BaP fue de 606 ng/ml.

- Muestra M: A una alícuota de 100 μ l de disolución madre de Acenafteno, Fluoranteno, Pireno, Benz[a]antraceno y Benzo[a]pireno $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS, se le añaden 600 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Las concentraciones finales de Ace, Flt, Pir, BaA y BaP fueron de 370, 485, 485, 548 y 606 ng/ml, respectivamente.

2.1. Optimización individualizada de los parámetros instrumentales.

En primer lugar, se procedió a la optimización de las condiciones instrumentales de cada uno de los cinco analitos en estudio de forma individualizada, para tratar de conseguir las condiciones óptimas en cada caso.

a) Acenafteno.

Observando los espectros de fosforescencia total de los cinco analitos presentados en la Figura nº III-8, se indicó que sería posible determinar dicho compuesto a las longitudes de onda de su máximo de emisión fosforescente (296/488 nm) y considerando que la vida media del Ace es 1015 μ s, los parámetros t_d y t_g deben ser del orden de 200 y 2000 μ s, respectivamente. Sin embargo, es necesario optimizar las condiciones de medida en dos aspectos:

- Sensibilidad del detector: A las condiciones de registro de la Figura nº III-8, no se observan solapamientos espectrales, a las nuevas condiciones experimentales e instrumentales los otros compuestos generan una señal fosforescente relativamente elevada en el máximo del Ace. Éste es un compuesto altamente fosforescente, para no disminuir concentraciones relativas y obtener señales del mismo orden de magnitud, se puede

disminuir la sensibilidad del detector, consiguiendo entonces resultados aceptables. La intensidad fosforescente obtenida a estas condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm, rendijas 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s y sensibilidad 900 V, se presenta en la Tabla n° III-1.

Tabla n° III-1.- $I_{Fosf.}$ a las condiciones instrumentales del Ace.

$I_{Fosf.}^{Ace}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{Pir}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^{BaP}$	$I_{Fosf.}^M$
1'52	0'08	0'06	0'05	0'02	3'00

- Tiempos de decaimiento e integración: Existe una marcada desactivación de la intensidad de fosforescencia del Ace en presencia de los otros compuestos (véase la Figura n° III-9); sólo existe una zona donde la intensidad de fosforescencia de ambas muestras es del mismo orden de magnitud, la cual se puede elegir como zona de registro de la intensidad de fosforescencia.

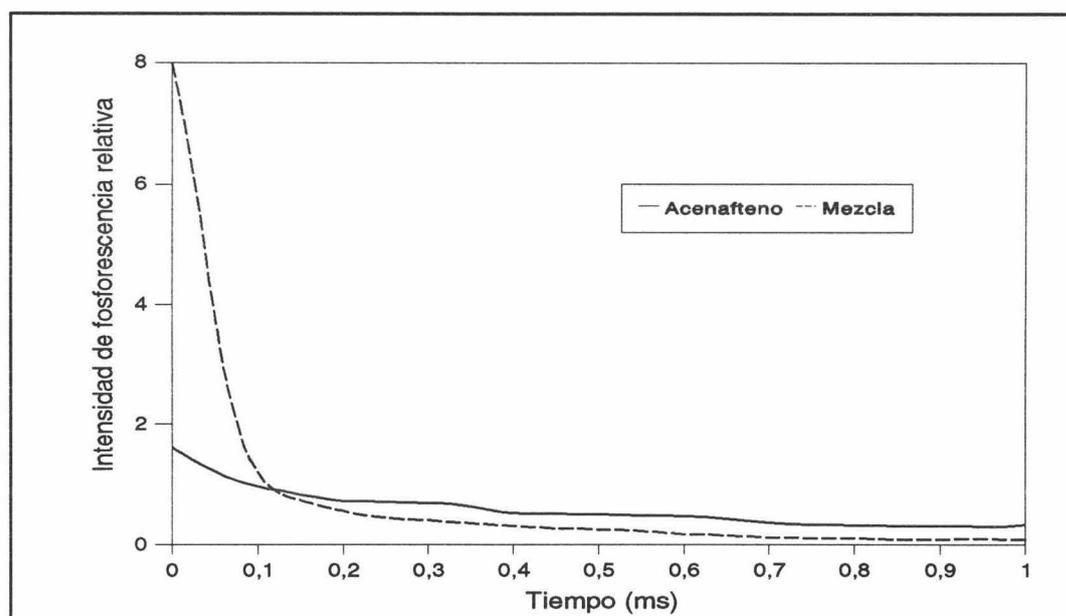


Figura n° III-9.- Comparación de las curvas del Ace, por separado y en la mezcla.

Las nuevas condiciones instrumentales serían: $\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm, rendijas 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, $t_{d/g}$ 75/150 μ s y sensibilidad 775 V. Las intensidades de fosforescencia registradas se presentan en la Tabla n° III-2.

Tabla n° III-2.- $I_{Fosf.}$ a las condiciones instrumentales finales del Ace.

$I_{Fosf.}^{Ace}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{Pir}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^{BaP}$	$I_{Fosf.}^M$
0'86	0'05	0'03	0'03	0'01	0'92

b) Fluoranteno.

Se comprueba que no existe solapamiento espectral en su máximo (358/552 nm) a esas condiciones experimentales por lo que las medidas se llevarán a cabo en dicho máximo. La intensidad de emisión registrada para, las seis muestras, a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas $_{exc/em}$ 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V, se muestran en la Tabla n° III-3.

Tabla n° III-3.- $I_{Fosf.}$ a las condiciones instrumentales del Flt.

$I_{Fosf.}^{Ace}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{Pir}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^{BaP}$	$I_{Fosf.}^M$
0'01	1'15	0'02	0'01	0'02	1'10

c) Pireno.

En su máximo de emisión fosforescente (336/596 nm), interfieren Flt y BaA, sin embargo, la vida media del Pireno (6825 μ s) es muy superior a la de los otros dos (1097 μ s para el Flt y 3017 μ s para el BaA), por lo que su determinación es posible modificando el tiempo de decaimiento. Para la optimización de este parámetro, se registraron las intensidades de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 336/596 nm, t_g 2000 μ s, rendijas $_{exc/em}$ 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V, variando t_d de 200 a 14000 μ s. Los resultados de esta optimización se muestran en la Tabla n° III-4.

Tabla n° III-4.- Optimización del t_d para el Pireno.

t_d (μ s)	$I_{Fosf.}^{Ace}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{Pir}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^{BaP}$	$I_{Fosf.}^M$
200	0'02	0'53	2'95	0'30	0'04	3'60
2000	0'02	0'22	2'37	0'22	0'03	2'75
4000	0'01	0'10	1'55	0'14	0'02	1'65
6000	0'01	0'04	1'02	0'09	0'02	0'99
8000	0'01	0'02	0'73	0'05	0'01	0'70
10000	0'01	0'01	0'49	0'04	0'01	0'46
12000	0'01	0'01	0'40	0'03	0'01	0'34
14000	0'01	0'01	0'28	0'02	0'01	0'23

Se comprueba que los mejores resultados se obtienen empleando un t_d de 8000 μs , eligiendo este valor para el resto del trabajo experimental.

d) Benz[a]antraceno.

Al máximo de emisión fosforescente del BaA (292/615 nm) le interfieren Ace, Flt y Pir. El solapamiento espectral con Ace y el Flt es prácticamente total, por lo que las medidas fosforescentes en el máximo espectral serían inviables sin algún parámetro discriminatorio entre ellos. El parámetro vida media de ambos compuestos frente al del BaA es lo suficientemente diferente como para utilizarlo como parámetro de selectividad a la hora de resolver mezclas de éstos. Para optimizar el tiempo de decaimiento se procedió a registrar la intensidad de fosforescencia de las muestras anteriores a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 296/610 nm, t_g 2000 μs , rendijas $_{exc/em}$ 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V. Los resultados se resumen en la Tabla n III-5.

Tabla n° III-5.- Optimización del t_d para el Benz[a]antraceno.

t_d (μs)	$I_{Fosf.}^{Ace}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{Pir}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^{BaP}$	$I_{Fosf.}^M$
200	0'32	0'30	0'32	2'60	0'04	3'04
1000	0'12	0'21	0'28	2'23	0'04	2'60
2000	0'04	0'13	0'14	1'84	0'03	2'04
3000	0'02	0'09	0'12	1'40	0'02	1'44
4000	0'01	0'06	0'09	1'07	0'01	1'06
5000	0'01	0'04	0'07	0'81	0'01	0'78
6000	0'01	0'03	0'06	0'61	0'01	0'57

Se observa que, conforme aumenta el tiempo de decaimiento las señales disminuyen significativamente, pero la relación entre la señal del BaA y la de los otros cuatro analitos aumenta hasta tiempos de decaimiento de 5000 μs , excepto para el caso del Pireno, donde la relación entre ambas intensidades prácticamente permanece constante. En este caso, la eliminación de la interferencia viene impuesta por una mejor selección de la longitud de onda de medida.

Esta optimización se llevó a cabo mediante el uso de un método simplex de dos variables, en donde λ_{exc} y λ_{em} son variadas conjuntamente hasta alcanzar los mejores

resultados (mejor relación posible entre la intensidad del BaA y Pir). Para ello se registró la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $t_{d/g}$ 5000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V. El desarrollo del simplex se muestra en la Tabla n° III-6 y su representación gráfica en la Figura n° III-10.

Tabla n° III-6.- Optimización del par $\lambda_{exc/em}$.

Punto	λ_{exc}	λ_{em}	I_{Fosf}^{Pir}	I_{Fosf}^{BaA}	$I_{Fosf}^{BaA} / I_{Fosf}^{Pir}$
a	290	610	0'09	1'13	13'0
b	300	610	0'14	0'43	3'0
c	295	620	0'07	0'54	7'6
Desecho b					
Nuevo triángulo a,c,d					
d	285	620	0'05	0'71	14'0
Desecho c					
Nuevo triángulo a,d,e					
e	280	610	0'09	0'81	9'5

El par de longitudes de onda óptimo donde llevar a cabo las medidas vendría dado por el punto del simplex, 287/615 nm, baricentro del triángulo a partir del cual el simplex se vuelve sobre sí mismo.

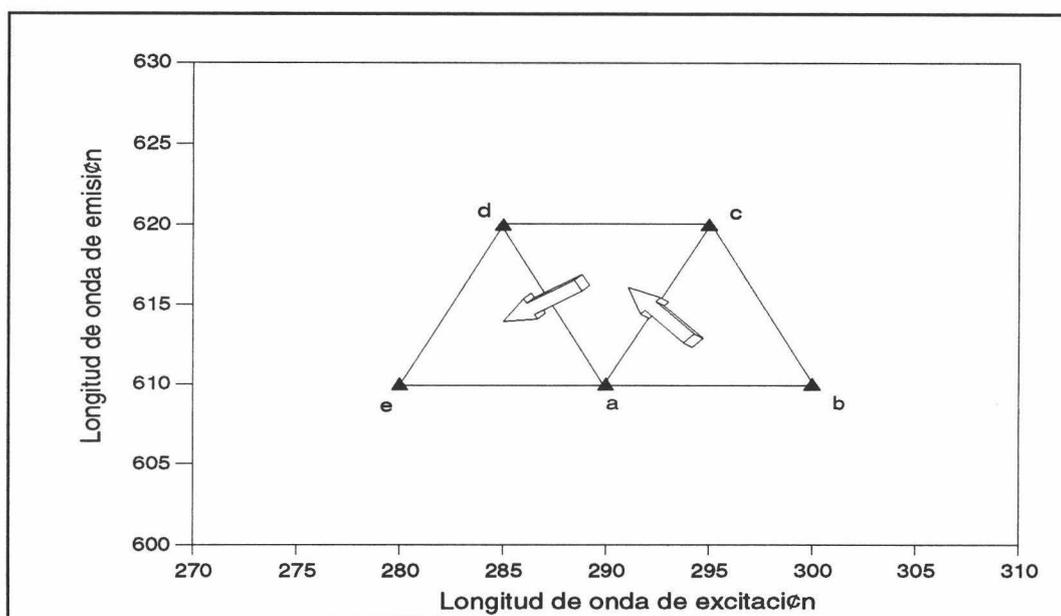


Figura n° III-10.- Optimización del para $\lambda_{exc/em}$.

e) *Benzo[a]pireno.*

Para el caso del Benzo[a]pireno, se comprueba que no existe solapamiento espectral en el máximo fosforescente (385/695 nm) a esas condiciones experimentales, por ello, las medidas se llevaron a cabo sobre dicho máximo. La intensidad de emisión registrada para estas seis muestras a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 385/695 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V, se muestran en la Tabla n° III-7.

Tabla n° III-7.- $I_{Fosf.}$ a las condiciones instrumentales del BaP.

$I_{Fosf.}^{Ace}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{Pir}$	$I_{Fosf.}^{BaA}$	$I_{Fosf.}^{BaP}$	$I_{Fosf.}^M$
0'01	0'02	0'01	0'02	0'43	0'41

Las condiciones instrumentales finales para los cinco analitos en estudio se resumen en la Tabla n° III-8.

Tabla n° III-8.- Condiciones instrumentales finales.

Parámetros instrumentales	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
$\lambda_{exc/em}$ (nm)	296/488	358/552	336/596	292/610	385/695
$t_{d/g}$ (μ s)	75/150	200/2000	8000/2000	5000/2000	200/2000
m.p.f. (ms)	5	5	5	5	5
Rendijas (nm)	16	16	16	16	16
Sensibilidad (V)	775	1000	1000	1000	1000

En la Figura n° III-11, se muestran gráficamente las coordenadas de excitación y emisión para la medida de cada uno de los compuestos en un mapa de contorno teórico, así como el tiempo de decaimiento e integración durante el cual se van a registrar las medidas indicado en las curvas de decaimiento correspondientes.

2.2. Optimización de la ruta.

Estudiando los topogramas correspondientes a los cinco HAP en estudio, se plantearon una serie de posibles rutas, por el método de ensayo y error, buscando siempre

una resolución máxima de los cinco analitos así como la mayor sensibilidad posible. De todas las rutas ensayadas, se seleccionó como óptima la determinada por los siguientes pares de $\lambda_{exc/em}$ 256/440, 320/514, 400/594, 310/597, 250/640 y 430/710 nm. Dicha ruta está representada sobre el topograma correspondiente a la mezcla de los cinco analitos, el cual se muestra en la Figura n° III-12.

2.3. Representación de los espectros asincrónicos de ángulo variable.

Existen dos formas diferentes de representación de los espectros asincrónicos de ángulo variable: representación tridimensional y representación bidimensional.

a) Representación tridimensional.

En la Figura n° III-13 se muestra el espectro en tres dimensiones correspondiente a la mezcla de los cinco hidrocarburos aromáticos policíclicos, es decir, intensidad de fosforescencia frente a las longitudes de onda de excitación y emisión simultáneamente, ilustrándose así la utilidad potencial de esta técnica para el análisis de mezclas. Las condiciones a las cuales se han llevado a cabo se indican al pie de la correspondiente figura.

b) Representación bidimensional.

La Figura n° III-14 muestra el espectro bidimensional correspondiente a la mezcla de los cinco HAP. En este tipo de representación espectral se ha eliminado el eje correspondiente a la longitud de onda de excitación, la intensidad de fosforescencia se representa frente a la longitud de onda de emisión; la línea vertical indica el cambio de dirección en la ruta. La manipulación de estos espectros se ha llevado a cabo mediante la utilización de los programas del propio espectrofotómetro y un programa de modelización de gráficos.

Los valores máximos de intensidad de fosforescencia de cada uno de los HAP corresponden a los valores de longitud de onda de excitación y emisión en el espectro asincrónico de: 296/488 nm, 358/552 nm, 336/596 nm, 292/610 nm y 385/695 nm para el acenafteno, fluoranteno, pireno, benz[a]antraceno y benzo[a]pireno, respectivamente.

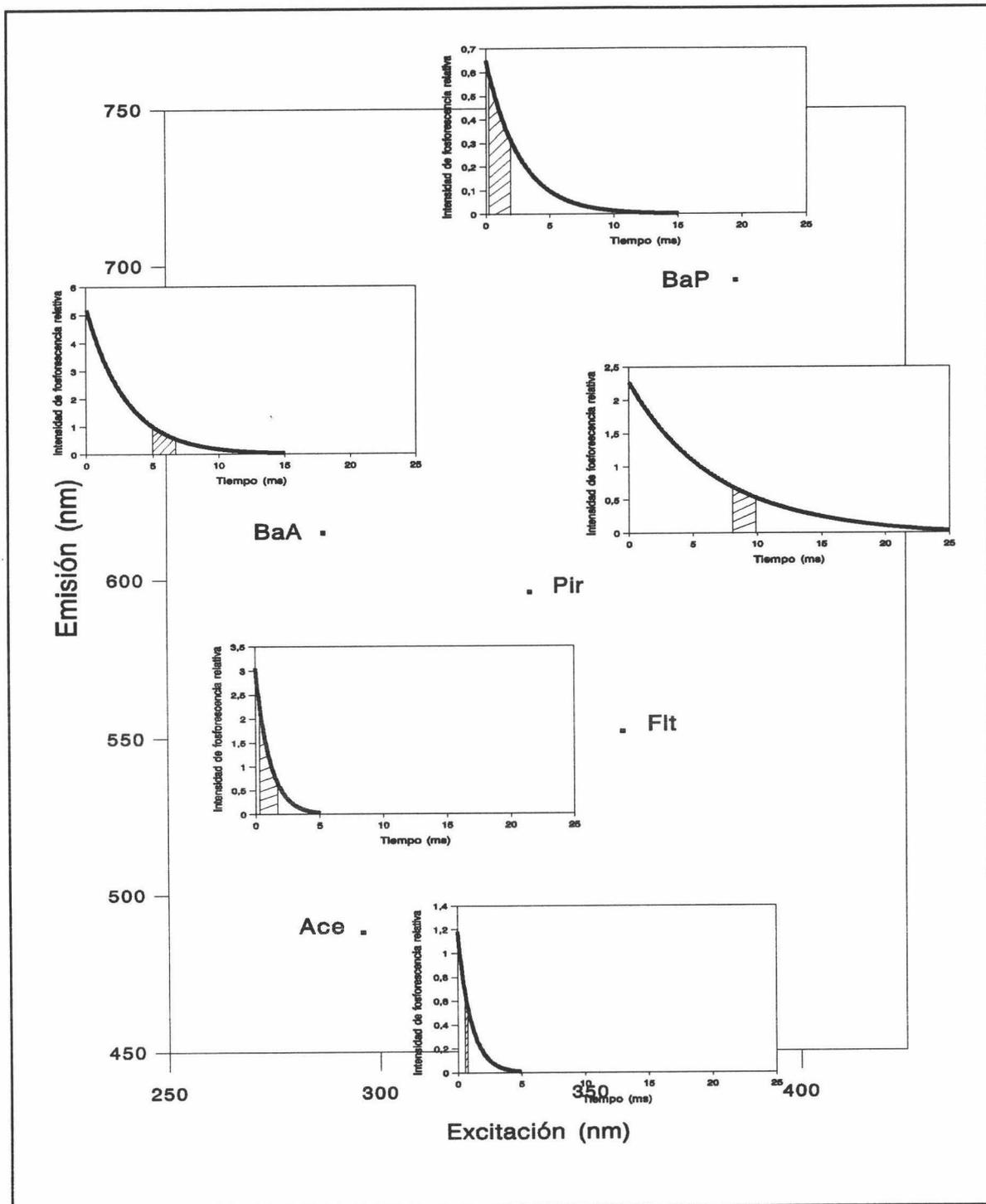


Figura nº III-11.- *Coordenadas de excitación y emisión y curvas de decaimiento del Ace, Flt, Pir, BaA y BaP. [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 485 ng/ml, [BaA] 548 ng/ml, [BaP] 606 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

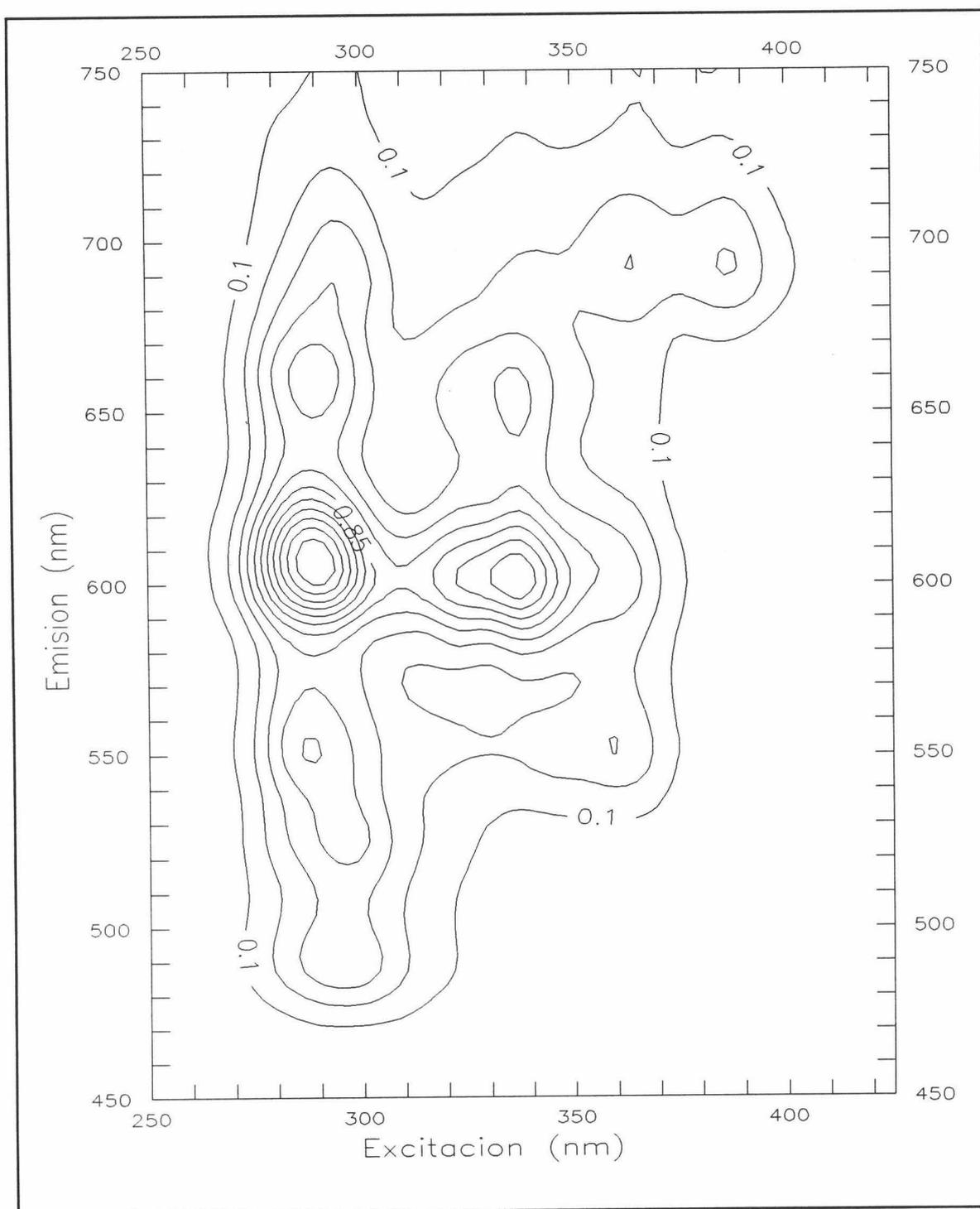


Figura n° III-12.- Ruta de trabajo representada sobre el topograma de la mezcla de Ace, Flt, Pir, BaA y BaP. [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 485 ng/ml, [BaA] 548 ng/ml, [BaP] 606 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

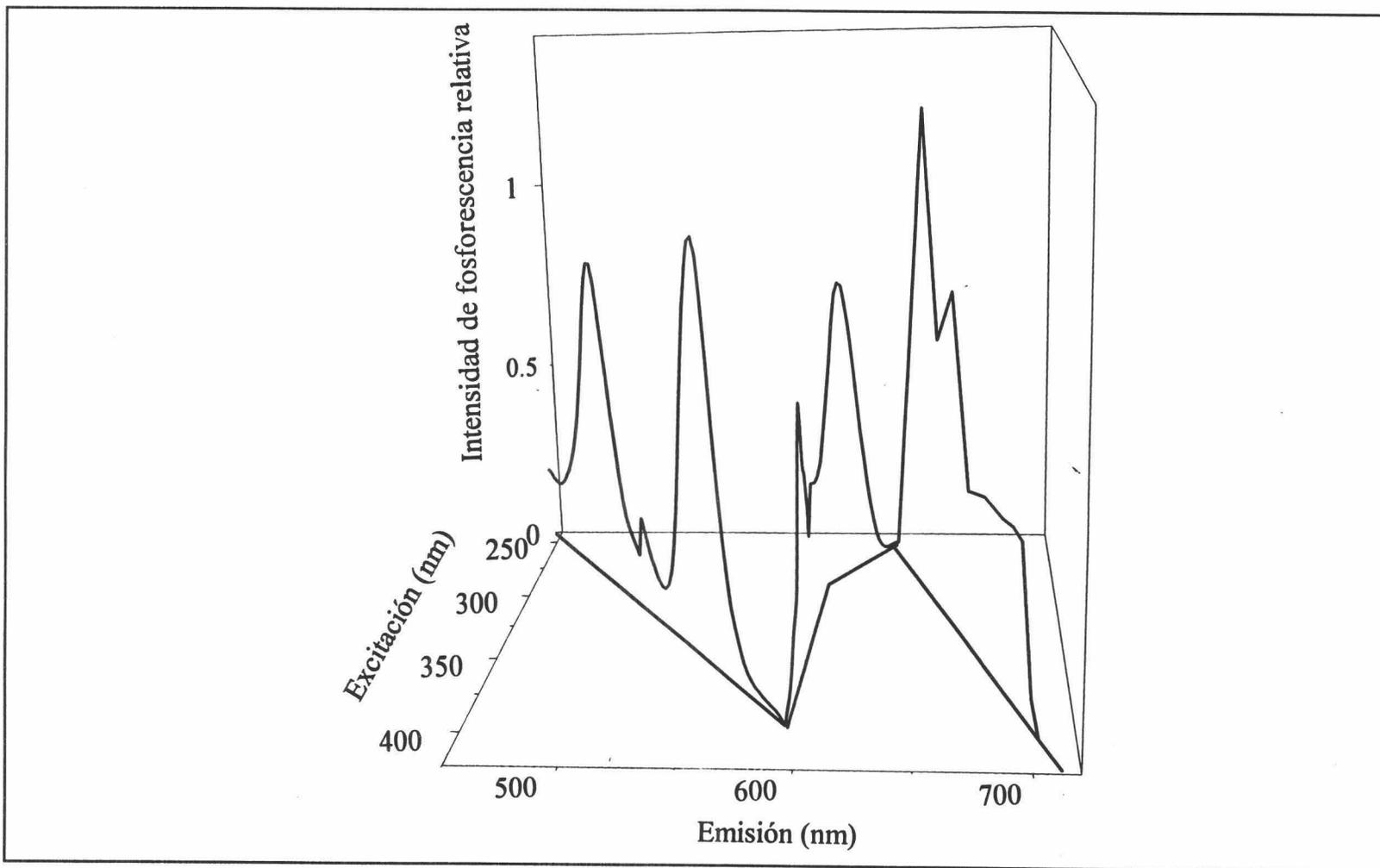


Figura n° III-13.- *Representación tridimensional de la ruta seleccionada para la resolución de la mezcla Ace, Flt, Pir, BaA y BaP. [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 485 ng/ml, [BaA] 548 ng/ml, [BaP] 606 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.*

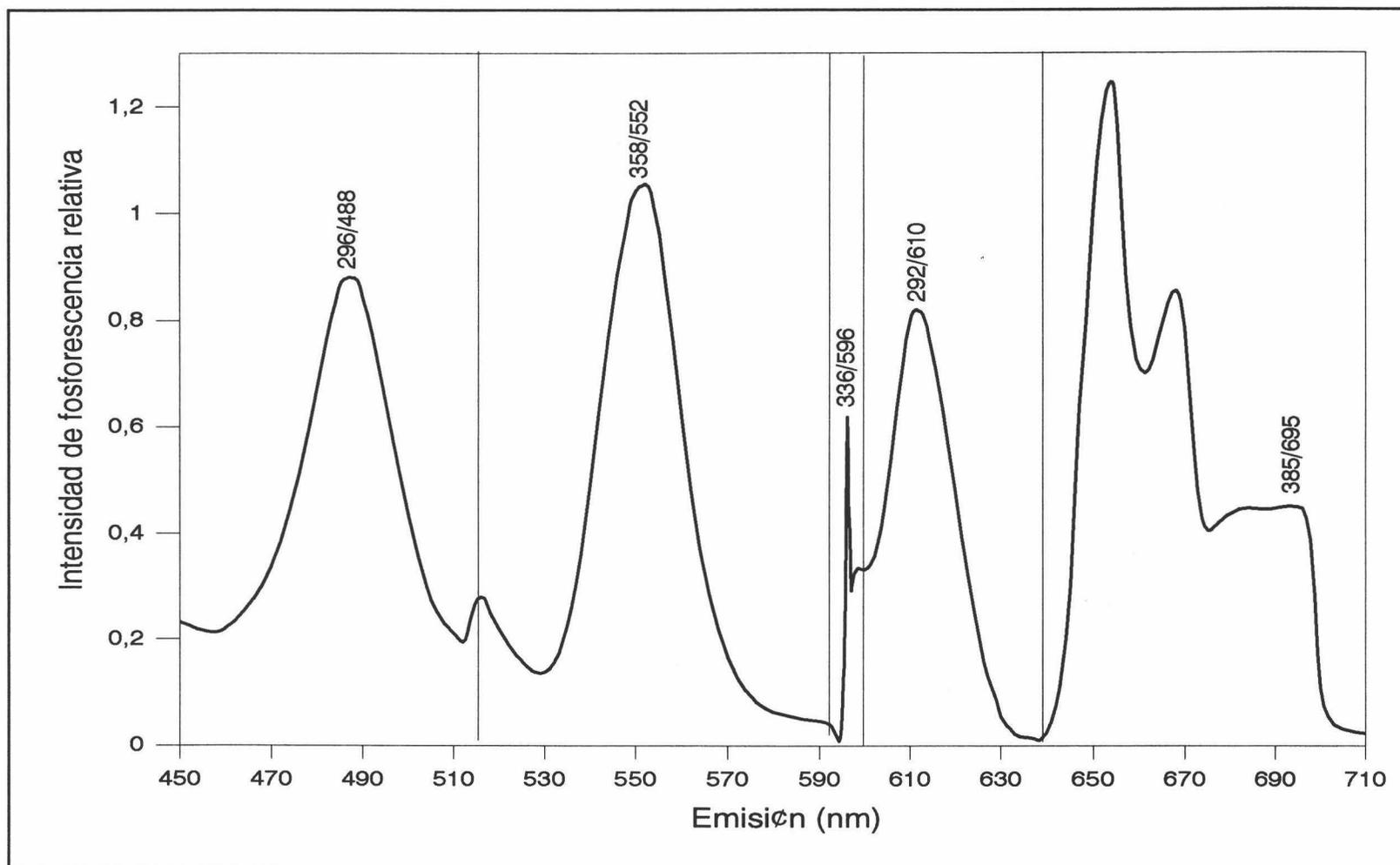


Figura nº III-14.- *Representación bidimensional del espectro de ángulo variable de la mezcla de Ace, Flt, Pir, BaA y BaP. [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 485 ng/ml, [BaA] 548 ng/ml, [BaP] 606 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. t_{dg} 200/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.*

3. Selección de variables experimentales.

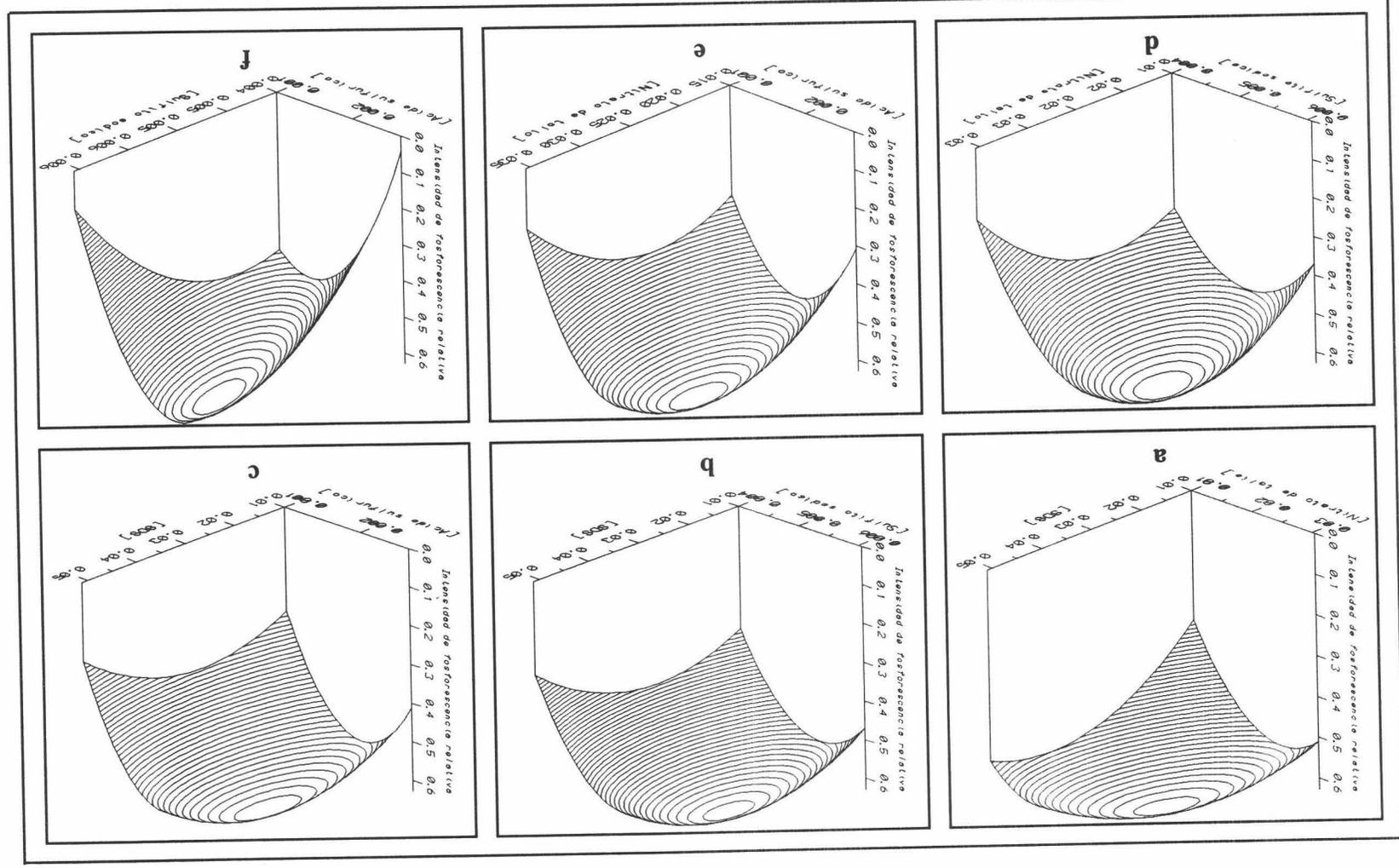
3.1. Optimización conjunta de agente micelar, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 .

Conocidos los óptimos experimentales de los reactivos SDS, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 para los analitos Fen, Flt y BaA estudiados en el Capítulo II, se procedió a la optimización de las concentraciones de estos reactivos en el caso de una muestra que contenga los cinco compuestos en estudio. Los resultados se resumen en las Tablas n° III-9 y III-10. Para ello: *Se preparó una disolución madre adicionando a 100 μ l de una disolución de n-heptano $2'4 \cdot 10^{-2}$ M en Ace, Flt, Pir BaA y BaP, 100 μ l de 1-butanol, y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A 100 μ l de esta disolución madre se le añaden cantidades variables de SDS 0'5 M, de $TiNO_3$ 0'25 M, de Na_2SO_3 0'1 M y de H_2SO_4 0'02 M, tal y como indican los diseños experimentales, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. A las muestras, de esta forma preparadas, se les midió la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales seleccionadas.*

La necesidad de desarrollar dos diseños de debe a la imposibilidad que suponía encontrar el óptimo del Pir y BaA en la zona experimental que abarca el diseño hasta ahora utilizado. El óptimo del Na_2SO_3 para estos dos analitos se encontraba fuera de la zona experimental, por lo que el diseño original se desplazó a valores de concentración más elevados para este reactivo. De esta forma, se abarca al óptimo y se mantiene el mismo rango de concentraciones.

El análisis de la varianza de los diseños experimentales, desarrollados para cada uno de los cinco analitos estudiados de forma conjunta, se presentan en las Tablas n° III-11, III-12, III-13, III-14 y III-15. La mayor variación de la intensidad de fosforescencia con las concentraciones de SDS, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 , se da para Ace y BaA, donde prácticamente todos los coeficientes lineales y cuadráticos son significativos, además del término cruzado que relaciona las concentraciones de SDS y Na_2SO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 para Ace y BaA, y los términos que relacionan SDS y $TiNO_3$ y $TiNO_3$ y H_2SO_4 para BaA. Para los otros tres analitos, Flt, Pir y BaP, la intensidad de fosforescencia se relaciona de forma cuadrática con las concentraciones de los cuatro reactivos, siendo los coeficientes de regresión lineales no significativos, excepto para Pir que es significativo el coeficiente que relaciona a la intensidad con la concentración de H_2SO_4 . El único término cruzado

Figura n° III-18.- Variación de la intensidad de fosforescencia del Pvr con [SDS] y [Na₂SO₃] (a), [SDS] y [TiNO₃] (b), [SDS] y [H₂SO₄] (c), [TTNO₃] y [Na₂SO₃] (d), [TTNO₃] y [H₂SO₄] (e) y con [Na₂SO₃] y [H₂SO₄] (f). [Pvr] 485 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 336/596 nm, t_{drg} 8000/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas^{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.



significativo, para estos tres compuestos, relaciona las concentraciones de Na_2SO_3 y H_2SO_4 y el que relaciona SDS y TINO_3 , TINO_3 y Na_2SO_3 , y TINO_3 y H_2SO_4 para Pir.

El modelo cuadrático propuesto para los cinco analitos se ajusta aceptablemente a los datos experimentales. Observando en las tablas del análisis de la varianza los términos correspondientes al fallo de ajuste, se comprueba que en todos los casos éste no es significativo, obteniendo el mejor resultado para el BaP. El valor del coeficiente de determinación para Ace, Flt, Pir, BaA y BaP, tiene un valor de 0'9605, 0'893, 0'9394, 0'8763 y 0'9479, respectivamente.

A partir de la valoración de los diseños experimentales (véase Tablas nº III-16, III-17, III-18, III-19 y III-20) se puede conocer la variación, de forma gráfica, de la intensidad de fosforescencia con la concentración de SDS, TINO_3 , Na_2SO_3 y de H_2SO_4 de forma univariante. Los resultados obtenidos se representan en la Figura nº III-15.

La variación en forma gráfica de la intensidad de fosforescencia con cada dos variables experimentales para cada uno de los analitos en estudio se refleja en las Figuras nº III-16, III-17, III-18, III-19 y III-20, para el acenafteno, fluoranteno, pireno, benz[a]antraceno y benzo[a]pireno respectivamente. En dichas figuras se muestran las superficies de respuesta de la intensidad de fosforescencia de cada uno de los analitos en estudio a sus condiciones instrumentales óptimas frente a las concentraciones de SDS y TINO_3 o SDS y Na_2SO_3 o SDS y H_2SO_4 o TINO_3 y Na_2SO_3 o TINO_3 y H_2SO_4 o Na_2SO_3 y H_2SO_4 , y a los óptimos correspondientes de las otras dos variables.

Como resultado del cálculo de la media aritmética de los valores óptimos conseguidos de estos cuatro reactivos experimentales para los cinco analitos en estudio, para el resto del trabajo experimental, se han elegido las siguientes concentraciones de trabajo:

$$[\text{SDS}] = 3'11 \cdot 10^{-2} \text{ M}$$

$$[\text{TINO}_3] = 2'39 \cdot 10^{-2} \text{ M}$$

$$[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 5'25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1'62 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Tabla n° III-9.- *Diseño experimental para los sistemas: (a) Ace - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 ; (b) Flt - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 ; (c) BaP - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .*

Punto	Variables experimentales				pH	$I_{Fosf.}^{Ace}$	$I_{Fosf.}^{Flt}$	$I_{Fosf.}^{BaP}$
	[SDS] ($\cdot 10^{-2}$)	[$TiNO_3$] ($\cdot 10^{-2}$)	[Na_2SO_3] ($\cdot 10^{-3}$)	[H_2SO_4] ($\cdot 10^{-3}$)				
1	3'00(0)	2'50(0)	5'00(0)	1'60(0)	6'64	0'88	1'03	0'43
2	2'00(-1)	2'00(-1)	4'50(-1)	1'80(1)	6'44	0'74	0'85	0'30
3	2'00	3'00(1)	4'50	1'80	6'27	0'75	0'82	0'31
4	2'00	2'00	4'50	1'40(-1)	6'67	0'84	0'95	0'38
5	4'00(1)	3'00	4'50	1'40	6'70	0'80	0'97	0'36
6	2'00	2'00	5'50(1)	1'40	6'88	0'65	0'85	0'31
7	4'00	2'00	5'50	1'40	6'93	0'67	0'82	0'32
8	4'00	3'00	4'50	1'80	6'51	0'65	0'85	0'31
9	4'00	2'00	4'50	1'40	6'75	0'80	1'00	0'38
10	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'92	1'02	0'41
11	4'00	2'00	5'50	1'80	6'93	0'87	1'00	0'39
12	2'00	3'00	5'50	1'40	6'84	0'62	0'85	0'33
13	4'00	3'00	5'50	1'40	6'90	0'64	0'89	0'32
14	4'00	2'00	4'50	1'80	6'57	0'64	0'85	0'34
15	2'00	3'00	4'50	1'40	6'62	0'84	1'00	0'39
16	2'00	3'00	5'50	1'80	6'59	0'84	0'99	0'39
17	4'00	3'00	5'50	1'80	6'68	0'82	0'96	0'38
18	2'00	2'00	5'50	1'80	6'70	0'80	0'92	0'37
19	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'91	0'99	0'42
20	0'94(-2'058)	2'50	5'00	1'60	6'60	0'86	0'90	0'35
21	3'00	3'52(2'058)	5'00	1'60	6'61	0'75	0'89	0'37
22	5'06(2'058)	2'50	5'00	1'60	6'66	0'70	0'88	0'38
23	3'00	1'47(-2'058)	5'00	1'60	6'75	0'82	0'92	0'39
24	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'90	1'02	0'40
25	3'00	2'50	5'00	1'19(-2'058)	6'90	0'70	0'85	0'32
26	3'00	2'50	5'00	2'01(2'058)	6'40	0'72	0'85	0'33
27	3'00	2'50	3'97(-2'058)	1'60	6'44	0'71	0'84	0'34
28	3'00	2'50	6'03(2'058)	1'60	6'84	0'70	0'85	0'30
29	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'90	0'98	0'40

Ace $\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm, $t_{d/g}$ 75/150 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 775 V.

Flt $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

BaP $\lambda_{exc/em}$ 385/695 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

Tabla n° III-10.- *Diseño experimental para los sistemas: a) Pir - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄; b) BaA - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Punto	Variables experimentales				pH	I _{Fosf.} ^{Pir}	I _{Fosf.} ^{BaA}
	[SDS] (·10 ⁻²)	[TlNO ₃] (·10 ⁻²)	[Na ₂ SO ₃] (·10 ⁻³)	[H ₂ SO ₄] (·10 ⁻³)			
1	3'00(0)	2'50(0)	5'50(0)	1'60(0)	6'95	0'67	0'87
2	4'00(1)	3'00(1)	6'00(1)	1'80(1)	6'65	0'60	0'76
3	2'00(-1)	2'00(-1)	5'00(-1)	1'80	5'90	0'45	0'58
4	4'00	3'00	5'00	1'40(-1)	6'95	0'37	0'58
5	2'00	3'00	5'00	1'80	5'90	0'43	0'57
6	4'00	3'00	6'00	1'40	6'50	0'42	0'56
7	2'00	3'00	6'00	1'80	6'57	0'62	0'69
8	4'00	2'00	5'00	1'80	6'20	0'46	0'57
9	4'00	2'00	6'00	1'80	6'35	0'57	0'85
10	3'00	2'50	5'50	1'60	6'95	0'64	0'86
11	4'00	2'00	6'00	1'40	7'25	0'45	0'70
12	4'00	3'00	5'00	1'80	6'05	0'46	0'61
13	4'00	2'00	5'00	1'40	6'55	0'59	0'79
14	2'00	3'00	6'00	1'40	6'87	0'43	0'57
15	2'00	2'00	6'00	1'40	7'05	0'39	0'57
16	2'00	2'00	5'00	1'40	6'60	0'53	0'75
17	2'00	2'00	6'00	1'80	6'42	0'57	0'74
18	2'00	3'00	5'00	1'40	6'45	0'53	0'70
19	3'00	2'50	5'50	1'60	6'95	0'62	0'85
20	0'94(-2'058)	2'50	5'50	1'60	6'25	0'55	0'76
21	5'06(2'058)	2'50	5'50	1'60	6'27	0'50	0'75
22	3'00	2'50	5'50	2'01(2'058)	6'00	0'41	0'55
23	3'00	3'53(2'058)	5'50	1'60	6'00	0'49	0'76
24	3'00	2'50	5'50	1'60	6'45	0'61	0'84
25	3'00	2'50	5'50	1'19(-2'058)	6'79	0'44	0'54
26	3'00	2'50	4'47(-2'058)	1'60	5'85	0'47	0'58
27	3'00	2'50	6'53(2'058)	1'60	6'70	0'43	0'57
28	3'00	1'47(-2'058)	5'50	1'60	6'40	0'51	0'79
29	3'00	2'50	5'50	1'60	6'95	0'63	0'82

^{Pir} λ_{exc/em} 336/596 nm, t_{d/g} 8000/2000 μs, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
^{BaA} λ_{exc/em} 287/615 nm, t_{d/g} 5000/2000 μs, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

Tabla n° III-11.- *Análisis de la varianza del Ace.*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0110193	1	0'0110193	50'09	0'0021
a ₂	0'0015389	1	0'0015389	7'00	0'0573
a ₃	0'0011891	1	0'0011891	5'40	0'0807
a ₄	0'0034643	1	0'0034643	15'75	0'0166
a ₁₂	0'0005062	1	0'0005062	2'30	0'2039
a ₁₃	0'0085562	1	0'0085562	38'89	0'0034
a ₁₄	0'0007563	1	0'0007563	3'44	0'1373
a ₂₃	0'0005062	1	0'0005062	2'30	0'2039
a ₂₄	0'0003062	1	0'0003062	1'39	0'3034
a ₃₄	0'0976562	1	0'0976562	443'89	0'0000
a ₁₁	0'0247946	1	0'0247946	112'70	0'0004
a ₂₂	0'0228572	1	0'0228572	103'90	0'0005
a ₃₃	0'0633119	1	0'0633119	287'78	0'0001
a ₄₄	0'0601924	1	0'0601924	273'60	0'0001
Fallo de ajuste	0'0088240	10	0'0008824	4'01	0'0964
Error Puro	0'0008800	4	0'0002200		
Total	0'2456827	28			

Tabla n° III-12.- *Análisis de la varianza del Flt*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0001937	1	0'0001937	0'41	0'5623
a ₂	0'0000326	1	0'0000326	0'07	0'8078
a ₃	0'0000046	1	0'0000046	0'01	0'9272
a ₄	0'0003310	1	0'0003310	0'70	0'4570
a ₁₂	0'0005062	1	0'0005062	1'08	0'3580
a ₁₃	0'0000063	1	0'0000063	0'01	0'9149
a ₁₄	0'0001563	1	0'0001563	0'33	0'6009
a ₂₃	0'0007563	1	0'0007563	1'61	0'2734
a ₂₄	0'0005063	1	0'0005063	1'08	0'3580
a ₃₄	0'0637562	1	0'0637562	135'65	0'0003
a ₁₁	0'0155282	1	0'0155282	33'04	0'0045
a ₂₂	0'0111896	1	0'0111896	23'81	0'0082
a ₃₃	0'0327991	1	0'0327991	69'79	0'0011
a ₄₄	0'0305649	1	0'0305649	65'03	0'0013
Fallo de ajuste	0'0129058	10	0'0012906	2'75	0'1713
Error Puro	0'0018800	4	0'0004700		
Total	0'1388207	28			

Tabla n° III-13.- *Análisis de la varianza del Pir*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0007218	1	0'0007218	1'36	0'3080
a ₂	0'0014933	1	0'0014933	2'82	0'1685
a ₃	0'0008913	1	0'0008913	1'68	0'2645
a ₄	0'0061603	1	0'0061603	11'62	0'0270
a ₁₂	0'0052562	1	0'0052562	9'92	0'0345
a ₁₃	0'0005063	1	0'0005063	0'96	0'3939
a ₁₄	0'0003062	1	0'0003062	0'58	0'4971
a ₂₃	0'0068063	1	0'0068063	12'84	0'0231
a ₂₄	0'0045563	1	0'0045563	8'60	0'0427
a ₃₄	0'0495062	1	0'0495062	93'41	0'0006
a ₁₁	0'0170710	1	0'0170710	32'21	0'0048
a ₂₂	0'0262573	1	0'0262573	49'54	0'0021
a ₃₃	0'0505402	1	0'0505402	95'36	0'0006
a ₄₄	0'0656367	1	0'0656367	123'84	0'0004
Fallo de ajuste	0'0233100	10	0'0023310	4'40	0'0832
Error Puro	0'0021200	4	0'0005300		
Total	0'2056138	28			

Tabla n° III-14.- *Análisis de la varianza del BaA.*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0021509	1	0'0021509	5'81	0'0735
a ₂	0'0133583	1	0'0133583	36'10	0'0039
a ₃	0'0029663	1	0'0029663	8'02	0'0473
a ₄	0'0011891	1	0'0011891	3'21	0'1475
a ₁₂	0'0052562	1	0'0052562	14'21	0'0196
a ₁₃	0'0076563	1	0'0076563	20'69	0'0104
a ₁₄	0'0018063	1	0'0018063	4'88	0'0917
a ₂₃	0'0001562	1	0'0001562	0'42	0'5578
a ₂₄	0'0052563	1	0'0052563	14'21	0'0196
a ₃₄	0'0798062	1	0'0798062	215'69	0'0001
a ₁₁	0'0156643	1	0'0156643	42'34	0'0029
a ₂₂	0'0100098	1	0'0100098	27'05	0'0065
a ₃₃	0'1232923	1	0'1232923	333'22	0'0001
a ₄₄	0'1511594	1	0'1511594	408'54	0'0000
Fallo de ajuste	0'0209259	10	0'0020926	5'66	0'0547
Error Puro	0'0014800	4	0'0003700		
Total	0'3697034	28			

Tabla n° III-15.- *Análisis de la varianza del BaP*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0002730	1	0'0002730	1'61	0'2738
a ₂	0'0000692	1	0'0000692	0'41	0'5645
a ₃	0'0000732	1	0'0000732	0'43	0'5542
a ₄	0'0000173	1	0'0000173	0'10	0'7688
a ₁₂	0'0009000	1	0'0009000	5'29	0'0829
a ₁₃	0'0000000	1	0'0000000	0'00	1'0000
a ₁₄	0'0004000	1	0'0004000	2'35	0'1998
a ₂₃	0'0002250	1	0'0002250	1'32	0'3141
a ₂₄	0'0000250	1	0'0000250	0'15	0'7247
a ₃₄	0'0156250	1	0'0156250	91'91	0'0007
a ₁₁	0'0036964	1	0'0036964	21'74	0'0096
a ₂₂	0'0017612	1	0'0017612	10'36	0'0323
a ₃₃	0'0135573	1	0'0135573	80'93	0'0008
a ₄₄	0'0123242	1	0'0123242	72'50	0'0010
Fallo de ajuste	0'0014984	10	0'0001498	0'88	0'6057
Error Puro	0'0006800	4	0'0001700		
Total	0'0417862	28			

Tabla n° III-16.- *Valoración del diseño experimental para el sistema Ace - SDS - TINO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Coeficientes		
a ₁ = 0'834432		
a ₂ = 62'9078		
a ₃ = 546'495		
a ₄ = -161'589		
a ₁₂ = -112'5		
a ₁₃ = 4625	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
a ₁₄ = -3437'5	[SDS] = 2'59·10 ⁻² M	A ₁ < 0
a ₂₃ = -2250	[TINO ₃] = 2'46·10 ⁻² M	A ₂ > 0
a ₂₄ = 4375	[Na ₂ SO ₃] = 4'93·10 ⁻³ M	A ₃ < 0
a ₃₄ = 781250	[H ₂ SO ₄] = 1'61·10 ⁻³ M	A ₄ > 0
a ₁₁ = -296'15		Es un máximo
a ₂₂ = -1137'38		
a ₃₃ = -189293		
a ₄₄ = -1'1536·10 ⁶		
a = -1'095		

Tabla nº III-17.- Valoración del diseño experimental para el sistema Flt - SDS - $TlNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

Coeficientes		
$a_1 = 14'0307$		
$a_2 = 38'6456$		
$a_3 = 280'824$		
$a_4 = -450'415$		
$a_{12} = -112'5$		
$a_{13} = 125$	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
$a_{14} = 1562'5$	$[SDS] = 3'02 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$A_1 < 0$
$a_{23} = 2750$	$[TlNO_3] = 2'51 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$A_2 > 0$
$a_{24} = -5625$	$[Na_2SO_3] = 4'80 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$A_3 < 0$
$a_{34} = 631250$	$[H_2SO_4] = 1'51 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$A_4 > 0$
$a_{11} = -234'365$		Es un máximo
$a_{22} = -795'793$		
$a_{33} = -136246$		
$a_{44} = -822023$		
$a = -0'020$		

Tabla nº III-18.- Valoración del diseño experimental para el sistema Pir - SDS - $TlNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

Coeficientes		
$a_1 = 13'5758$		
$a_2 = -2'11038$		
$a_3 = 742'458$		
$a_4 = 387'203$		
$a_{12} = -362'5$		
$a_{13} = 1125$	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
$a_{14} = 2187'5$	$[SDS] = 2'92 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$A_1 < 0$
$a_{23} = 8250$	$[TlNO_3] = 2'56 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$A_2 > 0$
$a_{24} = 16875$	$[Na_2SO_3] = 5'69 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$A_3 < 0$
$a_{34} = 556250$	$[H_2SO_4] = 1'68 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$A_4 > 0$
$a_{11} = -245'732$		Es un máximo
$a_{22} = -1219'04$		
$a_{33} = -169126$		
$a_{44} = -1'20461 \cdot 10^6$		
$a = -1'963$		

Tabla n° III-19.- Valoración del diseño experimental para el sistema BaA - SDS - $TlNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

Coeficientes			
$a_1 = -8'43907$			
$a_2 = 21'7107$			
$a_3 = 1679'74$			
$a_4 = 1387'76$			
$a_{12} = -362'5$			
$a_{13} = 4375$	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo	
$a_{14} = 5312'5$	$[SDS] = 3'78 \cdot 10^{-2} M$	$A_1 < 0$	
$a_{23} = -1250$	$[TlNO_3] = 2'03 \cdot 10^{-2} M$	$A_2 > 0$	
$a_{24} = 18125$	$[Na_2SO_3] = 5'80 \cdot 10^{-3} M$	$A_3 < 0$	
$a_{34} = 706250$	$[H_2SO_4] = 1'70 \cdot 10^{-3} M$	$A_4 > 0$	
$a_{11} = -235'39$		Es un máximo	
$a_{22} = -752'671$			
$a_{33} = -264156$			
$a_{44} = -1'82806 \cdot 10^6$			
$a = -5'121$			

Tabla n° III-20.- Valoración del diseño experimental para el sistema BaP - SDS - $TlNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

Coeficientes			
$a_1 = 6'94482$			
$a_2 = 14'44969$			
$a_3 = 341'427$			
$a_4 = 68'282$			
$a_{12} = -150$			
$a_{13} = -1'071 \cdot 10^{-8}$	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo	
$a_{14} = 2500$	$[SDS] = 3'22 \cdot 10^{-2} M$	$A_1 < 0$	
$a_{23} = 1500$	$[TlNO_3] = 2'39 \cdot 10^{-2} M$	$A_2 > 0$	
$a_{24} = -1250$	$[Na_2SO_3] = 4'98 \cdot 10^{-3} M$	$A_3 < 0$	
$a_{34} = 312500$	$[H_2SO_4] = 1'60 \cdot 10^{-3} M$	$A_4 > 0$	
$a_{11} = -114'346$		Es un máximo	
$a_{22} = -315'719$			
$a_{33} = -882238'6$			
$a_{44} = -521977$			
$a = -0'777$			

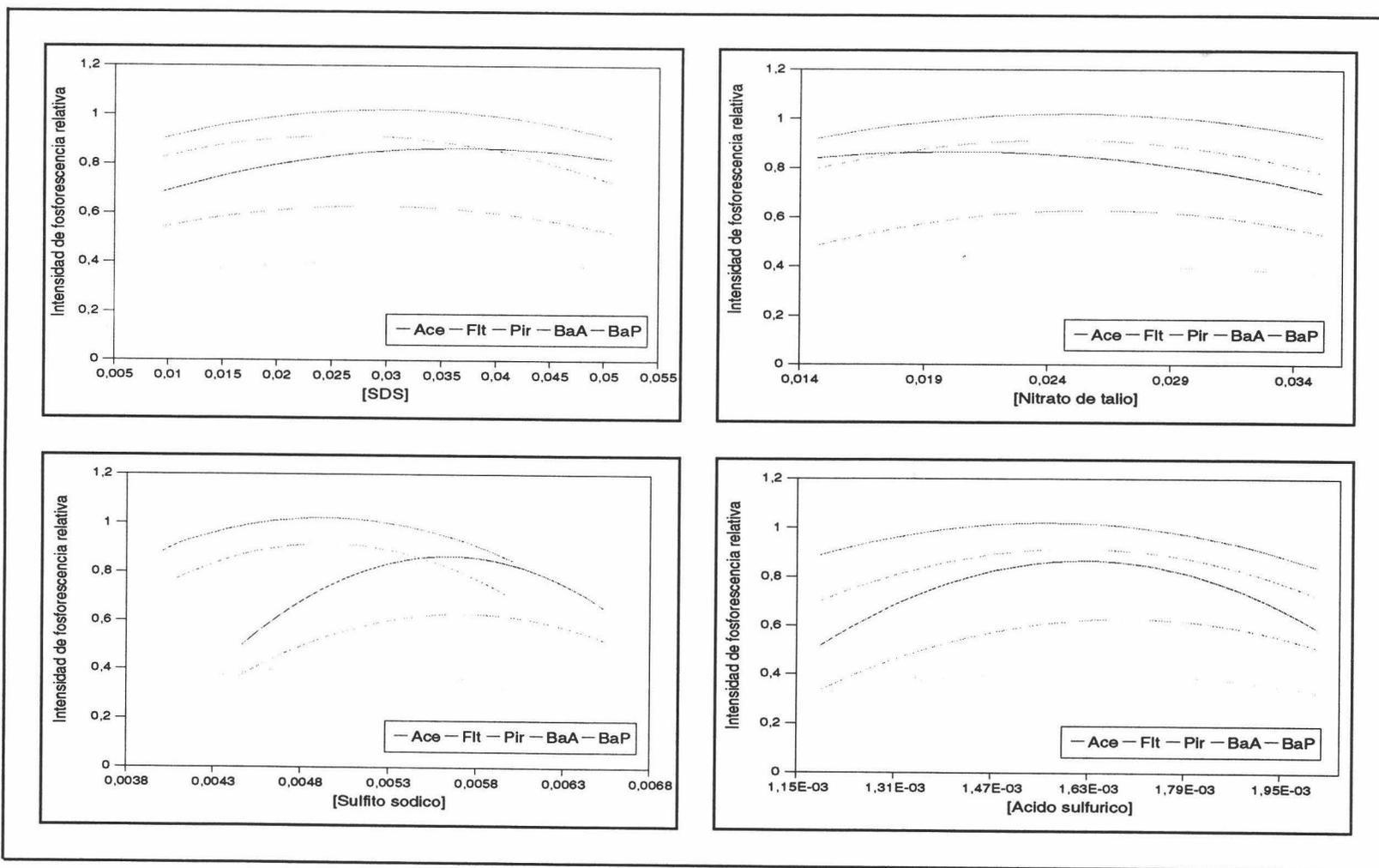


Figura n° III-15.- Variación de la intensidad de fosforescencia del Ace, Flt, Pir, BaA y BaP con la [SDS] (a), [TINO₃] (b), [Na₂SO₃] (c) y con la [H₂SO₄] (c). [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 485 ng/ml, [BaA] 548 ng/ml, [BaP] 606 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 296/488, 358/552, 336/596, 287/615 y 385/695 nm, respectivamente, $t_{d/g}$ 75/150 μ s para Ace, 200/2000 μ s para Flt y BaP, 8000/2000 μ s para Pir y 5000/2000 μ s para BaA, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 775 V para Ace y 1000 V para el resto.

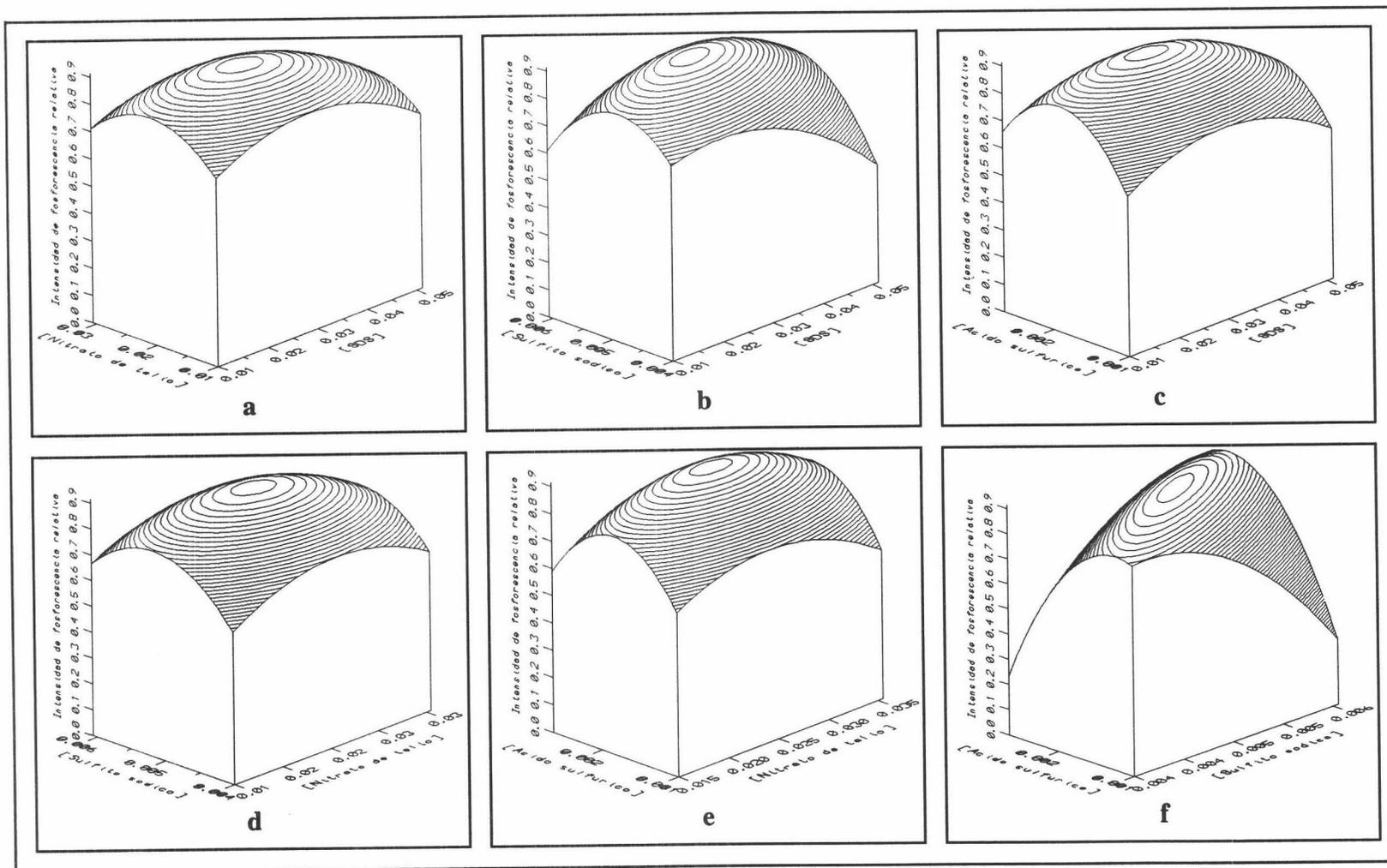


Figura n° III-16.- Variación de la intensidad de fosforescencia del Ace con $[SDS]$ y $[TiNO_3]$ (a), $[SDS]$ y $[Na_2SO_3]$ (b), $[SDS]$ y $[H_2SO_4]$ (c), $[TiNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TiNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y con $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). $[Ace]$ 370 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm, $t_{d/g}$ 75/150 μs , m.p.f. 5 ms, rendijas $_{exc/em}$ 16/16 nm y sensibilidad 775 V.

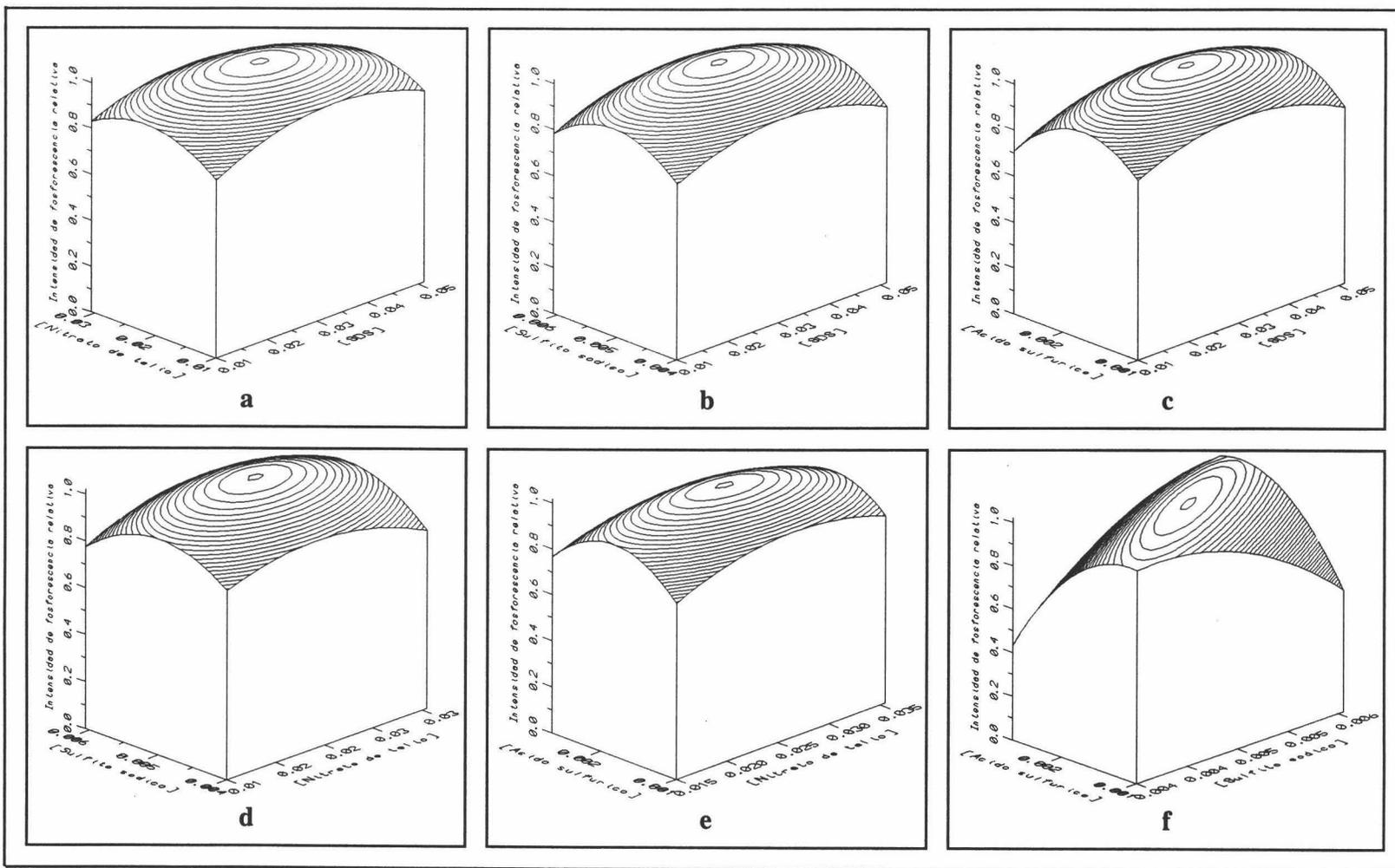


Figura n° III-17.- Variación de la intensidad de fosforescencia del Flt con $[SDS]$ y $[TlNO_3]$ (a), $[SDS]$ y $[Na_2SO_3]$ (b), $[SDS]$ y $[H_2SO_4]$ (c), $[TlNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TlNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y con $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). $[Flt]$ 485 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μs , m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

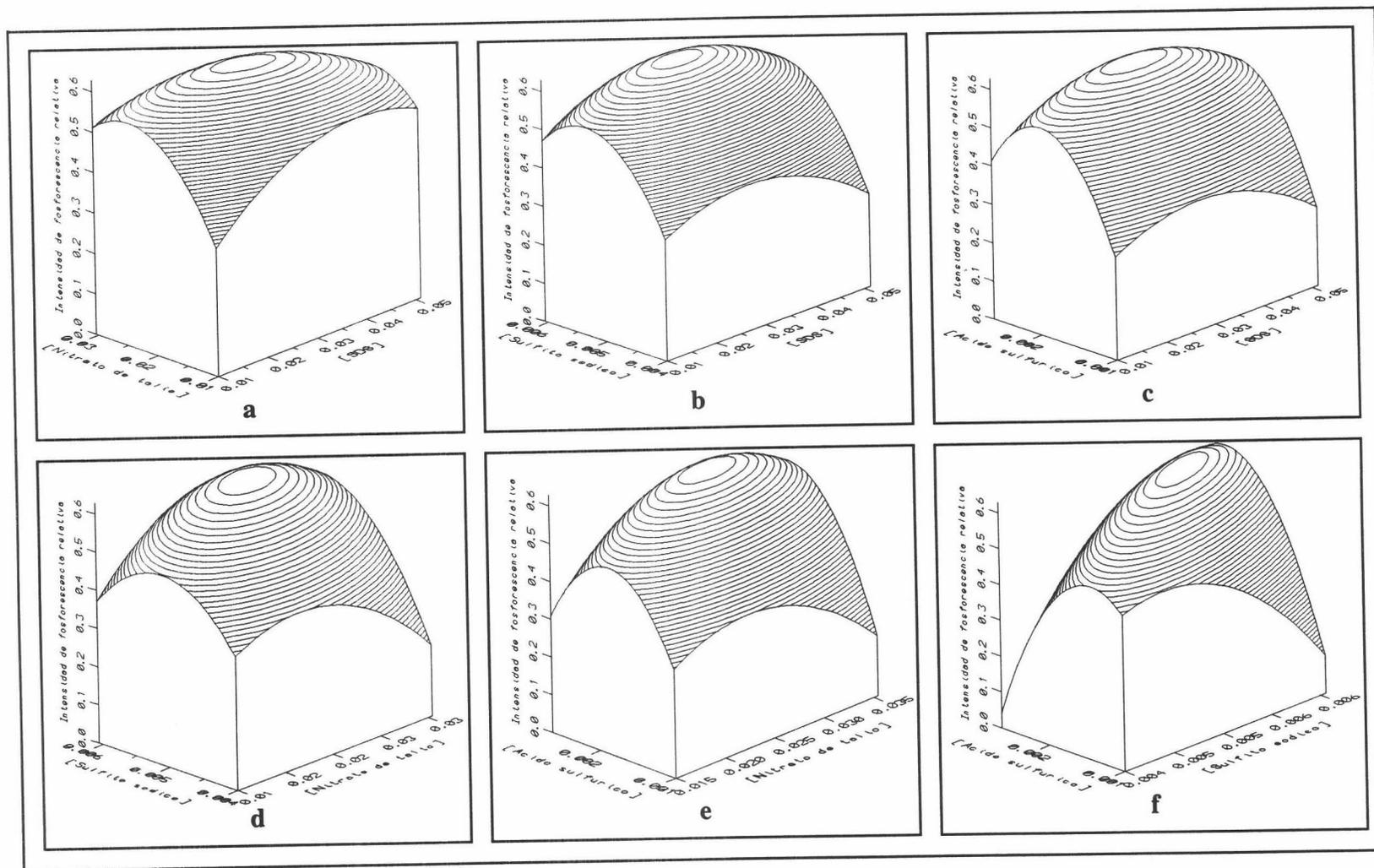


Figura n° III-18.- Variación de la intensidad de fosforescencia del Pir con [SDS] y $[TlNO_3]$ (a), [SDS] y $[Na_2SO_3]$ (b), [SDS] y $[H_2SO_4]$ (c), $[TlNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TlNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y con $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). [Pir] 485 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 336/596 nm, $t_{d/g}$ 8000/2000 μs , m.p.f. 5 ms, rendijas $_{exc/em}$ 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

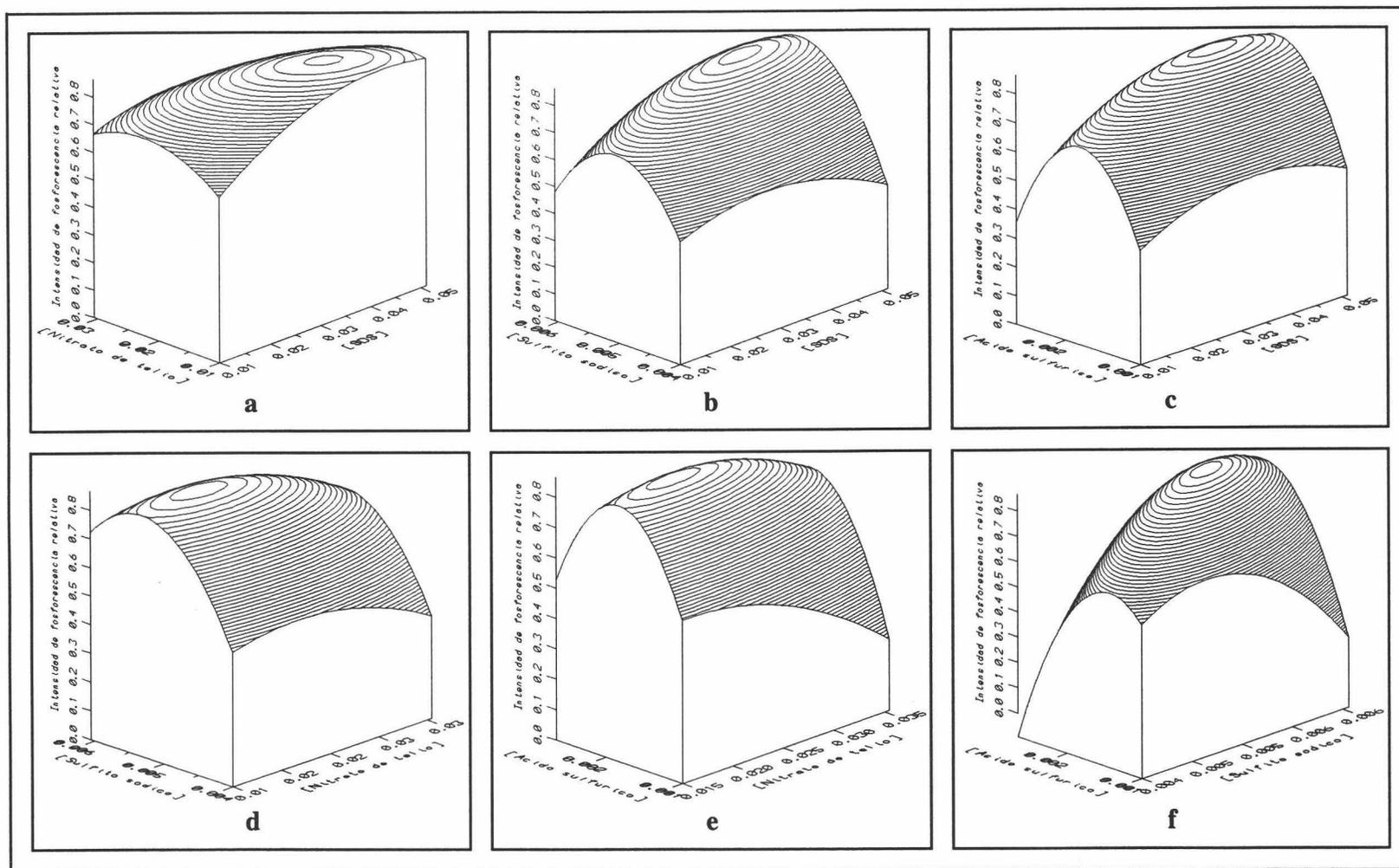


Figura n° III-19.- Variación de la intensidad de fosforescencia del BaA con [SDS] y [TlNO₃] (a), [SDS] y [Na₂SO₃] (b), [SDS] y [H₂SO₄] (c), [TlNO₃] y [Na₂SO₃] (d), [TlNO₃] y [H₂SO₄] (e) y con [Na₂SO₃] y [H₂SO₄] (f). [BaA] 548 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 287/615 nm, $t_{d/g}$ 5000/2000 μ s, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

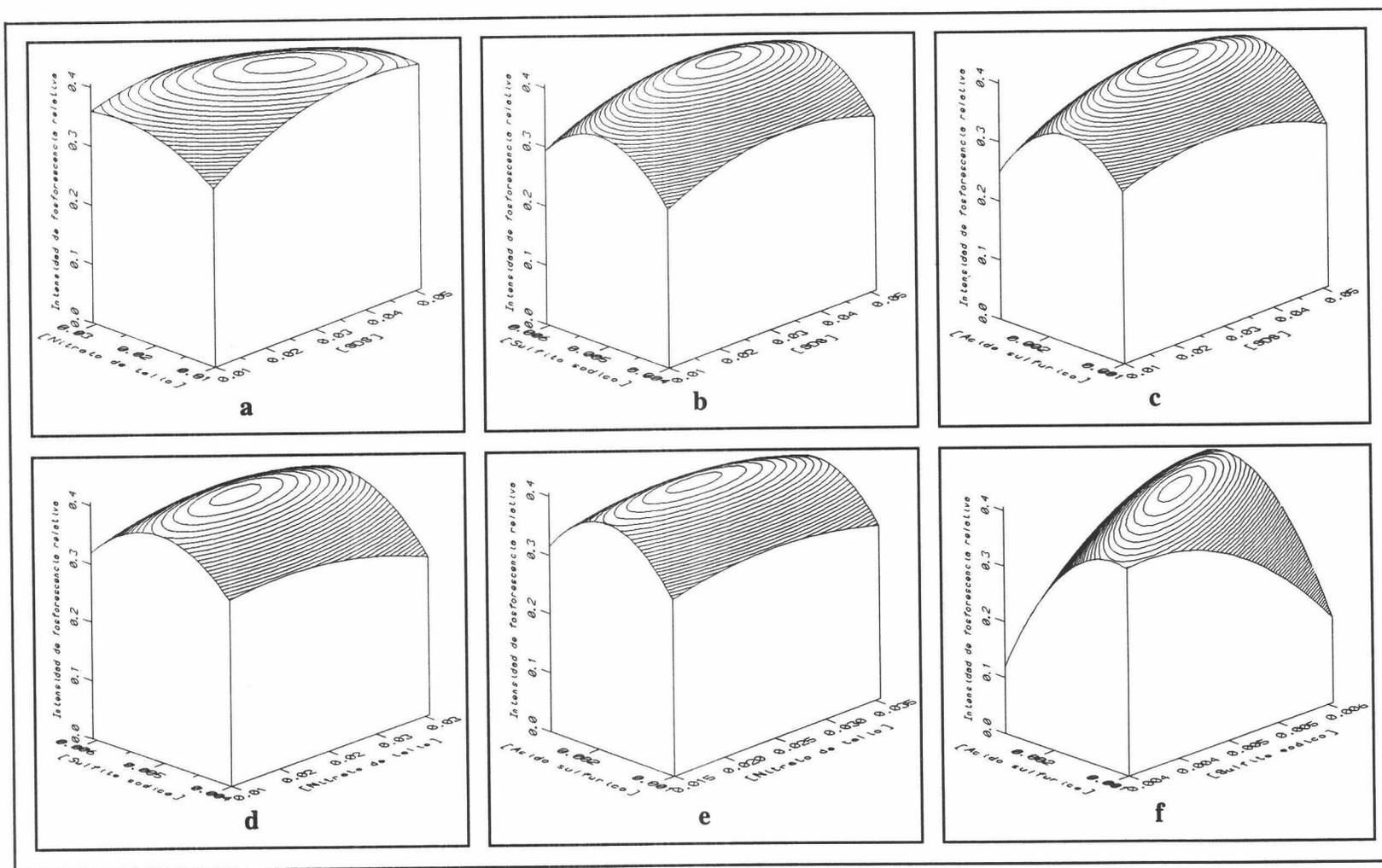


Figura nº III-20.- Variación de la intensidad de fosforescencia del BaP con $[SDS]$ y $[TiNO_3]$ (a), $[SDS]$ y $[Na_2SO_3]$ (b), $[SDS]$ y $[H_2SO_4]$ (c), $[TiNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TiNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y con $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). $[BaP]$ 606 ng/ml. $\lambda_{exc/em}$ 385/695 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μs , m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 1000 V.

3.2. Selección del tipo de microemulsión.

Para llevar a cabo la selección del agente emulsionante, se procedió de forma similar a la realizada en el Capítulo II. Para ello, se siguió el siguiente procedimiento: Se prepararon distintas disoluciones madre añadiendo a 100 μl de una disolución $2'4 \cdot 10^{-2}$ M de cada uno de los HAP estudiados en *n*-pentano o *n*-hexano o *n*-heptano, 100 μl de 1-butanol o 1-pentanol enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A 100 μl de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M se les añadió 622 μl de SDS 0'5 M, 955 μl de TINO_3 0'25 M, 524 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla n° III-21.

Tabla n° III-21.- Selección del agente emulsionante.

Agente emulsionante	$I_{\text{Fosf.}}$				
	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
N-pentano/1-butanol	0'86	1'10	0'64	0'93	0'44
N-pentano/1-pentanol	0'88	1'16	0'62	0'92	0'43
N-hexano/1-butanol	0'88	1'17	0'66	0'90	0'43
N-hexano/1-pentanol	0'87	1'18	0'66	0'93	0'44
N-heptano/1-butanol	0'89	1'19	0'66	0'94	0'44
N-heptano/1-pentanol	0'88	1'17	0'65	0'94	0'45

$\text{Ace } \lambda_{\text{exc/em}} 296/488 \text{ nm, } t_{\text{d/g}} 75/150 \text{ } \mu\text{s, } \text{rendijas}_{\text{exc/em}} 16/16 \text{ nm, m.p.f. } 5 \text{ ms y sens. } 775 \text{ V.}$
 $\text{Flt } \lambda_{\text{exc/em}} 358/552 \text{ nm, } t_{\text{d/g}} 200/2000 \text{ } \mu\text{s, } \text{rendijas}_{\text{exc/em}} 16/16 \text{ nm, m.p.f. } 5 \text{ ms y sens. } 1000 \text{ V.}$
 $\text{Pir } \lambda_{\text{exc/em}} 336/596 \text{ nm, } t_{\text{d/g}} 8000/2000 \text{ } \mu\text{s, } \text{rendijas}_{\text{exc/em}} 16/16 \text{ nm, m.p.f. } 5 \text{ ms y sens. } 1000 \text{ V.}$
 $\text{BaA } \lambda_{\text{exc/em}} 287/615 \text{ nm, } t_{\text{d/g}} 5000/2000 \text{ } \mu\text{s, } \text{rendijas}_{\text{exc/em}} 16/16 \text{ nm, m.p.f. } 5 \text{ ms y sens. } 1000 \text{ V.}$
 $\text{BaP } \lambda_{\text{exc/em}} 385/695 \text{ nm, } t_{\text{d/g}} 200/2000 \text{ } \mu\text{s, } \text{rendijas}_{\text{exc/em}} 16/16 \text{ nm, m.p.f. } 5 \text{ ms y sens. } 1000 \text{ V.}$

Se comprobó que no existen diferencias significativas entre los distintos agentes emulsionantes probados para estos cinco analitos, presentando, los cinco, análogo comportamiento en todos los casos estudiados, eligiendo el *n*-heptano/1-butanol como agente emulsionante para el resto del trabajo experimental.

También se llevaron a cabo estudios sobre la proporción del agente emulsionante, comprobando que no existen diferencias significativas entre las distintas proporciones estudiadas. Si bien, se eligió en este caso un 2% para el *n*-heptano y el 1-butanol, para favorecer la formación de la disolución madre que contenga los cinco HAP.

2 % N-heptano y 2 % 1-butanol

3.3. Optimización del volumen de muestra.

Para llevar a cabo esta experiencia, se procedió al desarrollo de la siguiente metodología: *Se prepararon una serie de disoluciones adicionando a 100 μl de una disolución madre $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en los cinco HAP en n-heptano/1-butanol/SDS, 622 μl de SDS 0'5 M, 955 μl de TiNO_3 0'25 M, 524 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones se colocaron distintos volúmenes, entre 1'5 y 4 ml, en la cubeta de medida, registrando la variación de la intensidad de fosforescencia con el tiempo a los máximos de emisión de cada uno de los analitos (Ace, 296/488 nm; Flt, 358/552 nm; Pir, 336/596 nm; BaA, 292/610 nm y BaP, 385/695 nm) y a las condiciones instrumentales propias de cada analito e indicadas en la Tabla n° III-21. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla n° III-22.*

Tabla n° III-22.- Influencia del volumen de muestra.

Volumen muestra (ml)	Tiempo de medida (min)				
	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
1'5	1'5	4'0	3'0	0'5	4'0
2'0	1'5	5'0	3'0	1'0	5'0
3'0	2'0	6'0	4'0	1'5	6'0
4'0	2'5	7'0	5'5	2'0	7'0

La tendencia observada concuerda con los resultados obtenidos en los dos Capítulos anteriores, es decir, a medida que se disminuya el volumen de muestra introducido en la cubeta, el tiempo de medida va disminuyendo, permaneciendo constante la intensidad de fosforescencia en todos los casos. Por ello, para el resto del trabajo experimental se seleccionó un volumen de:

Volumen de muestra: 1'5 ml

3.4. Influencia del orden de adición.

Para ver la influencia en la intensidad de fosforescencia se estudiaron distintos órdenes de adición no observándose diferencias significativas entre ellos. Para llevar a cabo esta experiencia se prepararon una serie de disoluciones mezclando 100 μl de una

disolución madre $2'4 \cdot 10^4$ M en Ace, Flt, Pir, BaA y BaP en *n*-heptano/1-butanol/SDS, 622 μ l de SDS 0'5 M, 955 μ l de TINO₃ 0'25 M, 524 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 810 μ l de H₂SO₄ 0'02 M en distintos órdenes, y enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones, así preparadas, se introdujeron 1'5 ml en la cubeta de medida y se registró la intensidad de fosforescencia a los máximos de emisión fosforescente de cada uno de los analitos. Los resultados se reflejan en la Tabla n° III-23.

Tabla n° III-23.- Influencia del orden de adición.

Orden de adición	I _{Fosf.}				
	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
M + SDS + TINO ₃ + Na ₂ SO ₃ + H ₂ SO ₄ + H ₂ O	0'89	1'10	0'66	0'90	0'44
M + TINO ₃ + H ₂ SO ₄ + SDS + Na ₂ SO ₃ + H ₂ O	0'87	1'08	0'64	0'92	0'43
M + H ₂ SO ₄ + TINO ₃ + Na ₂ SO ₃ + SDS + H ₂ O	0'86	1'12	0'65	0'94	0'42
TINO ₃ + SDS + Na ₂ SO ₃ + M + H ₂ SO ₄ + H ₂ O	0'88	1'07	0'67	0'88	0'40
SDS + Na ₂ SO ₃ + M + TINO ₃ + H ₂ SO ₄ + H ₂ O	0'88	1'11	0'65	0'88	0'41
TINO ₃ + M + H ₂ SO ₄ + Na ₂ SO ₃ + SDS + H ₂ O	0'89	1'14	0'65	0'90	0'40
Na ₂ SO ₃ + H ₂ SO ₄ + SDS + M + TINO ₃ + H ₂ O	0'87	1'10	0'66	0'92	0'44

Ace $\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm, $t_{d/g}$ 75/150 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 775 V.
 Flt $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 Pir $\lambda_{exc/em}$ 336/596 nm, $t_{d/g}$ 8000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 BaA $\lambda_{exc/em}$ 287/615 nm, $t_{d/g}$ 5000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 BaP $\lambda_{exc/em}$ 385/695 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

Al no observar diferencias significativas entre los distintos órdenes de adición, se mantuvo el orden de adición hasta ahora utilizado, es decir:



3.5. Influencia de la temperatura.

Se estudió la influencia de la temperatura sobre la intensidad de fosforescencia emitida por una disolución que contenía 370 ng/ml de Ace, 485 ng/ml de Flt y Pir, 548 ng/ml de BaA, 606 ng/ml de BaP, $3'11 \cdot 10^{-2}$ M de SDS, $2'39 \cdot 10^{-2}$ M de TINO₃, $5'25 \cdot 10^{-3}$ M de Na₂SO₃ y $1'62 \cdot 10^{-3}$ M de H₂SO₄. Se colocaron 1'5 ml de esta disolución en la cubeta de medida registrando la intensidad de fosforescencia a distintas temperaturas, desde 15 a 40 °C. Los resultados se muestran en la Tabla n° III-24.

Tabla n° III-24.- *Influencia de la temperatura.*

Temperatura (°C)	$I_{\text{Fosf.}}$				
	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
15	1'44	1'78	1'24	1'43	0'73
20	1'18	1'46	0'82	1'23	0'60
25	0'88	1'17	0'66	0'93	0'45
30	0'64	1'00	0'50	0'80	0'36
35	0'55	0'89	0'44	0'64	0'34
40	0'43	0'67	0'35	0'52	0'28

Ace $\lambda_{\text{exc/em}}$ 296/488 nm, $t_{\text{d/g}}$ 75/150 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 775 V.
Flt $\lambda_{\text{exc/em}}$ 358/552 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
Pir $\lambda_{\text{exc/em}}$ 336/596 nm, $t_{\text{d/g}}$ 8000/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
BaA $\lambda_{\text{exc/em}}$ 287/615 nm, $t_{\text{d/g}}$ 5000/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
BaP $\lambda_{\text{exc/em}}$ 385/695 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/2000 μs , rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.

Se comprueba que un aumento de temperatura conlleva, en todos los casos, una disminución de la intensidad de fosforescencia; por lo tanto, es aconsejable el uso de un baño termostático para llevar a cabo las medidas de fosforescencia en estas condiciones de trabajo. Se optó por termostatar a una temperatura de:

Temperatura: 25 °C

3.6. Estabilidad con el tiempo.

Para llevar a cabo esta experiencia se siguió el siguiente procedimiento operatorio: A 100 μl de una disolución madre $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en Ace, Flt, Pir, BaA y BaP en *n*-heptano/*l*-butanol/SDS se le añaden 622 μl de SDS 0'5 M, 955 μl de TlNO_3 0'25 M, 524 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones se introdujeron 1'5 ml en la cubeta de medida termostaticada a 25 °C y se midió la intensidad de fosforescencia a los máximos de emisión fosforescente de cada uno de los analitos.

Este estudio es el que se muestra en la Figura n° III-21, donde se observa que, tras un pequeño tiempo, de aproximadamente 2 minutos para el caso del Ace y del BaA y de 6 minutos para el Flt, Pir y el BaP, la señal permanece estable al menos durante una hora, tiempo suficiente para realizar la medidas analíticas oportunas.

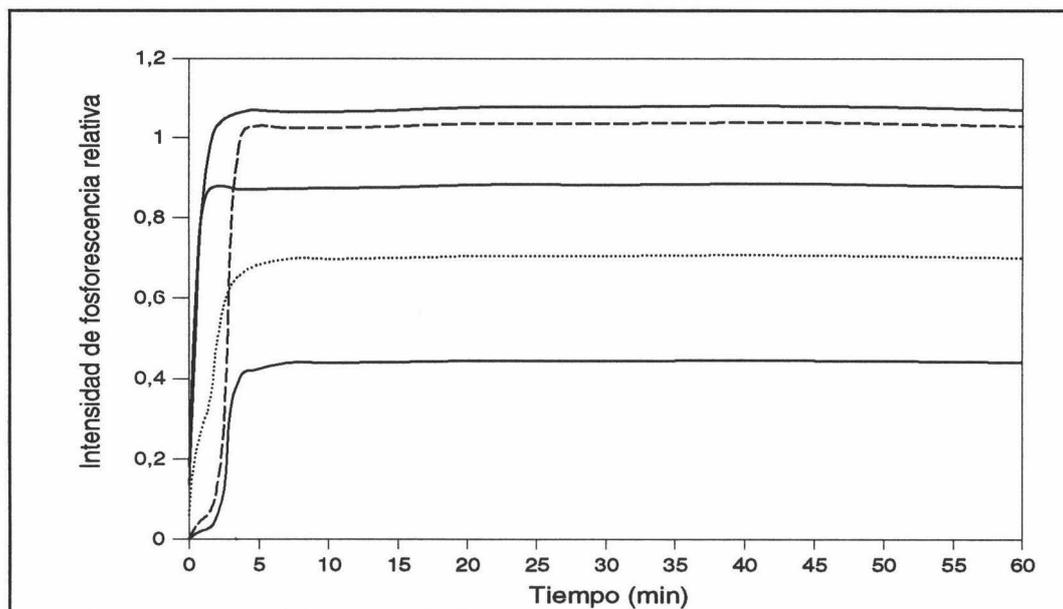


Figura nº III-21.- Estabilidad con el tiempo. [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 485 ng/ml, [BaA] 548 ng/ml, [BaP] 606 ng/ml, [SDS] $3'11 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'39 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'25 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'62 \cdot 10^{-3}$ M.

3.7. Influencia de la concentración de analito.

Para determinar, de una forma precisa, el rango dinámico lineal donde se puede desarrollar el método, se procedió al estudio de la influencia de la concentración de analito, obteniendo así información adicional sobre el comportamiento del sistema en estas condiciones de trabajo.

Para llevar a cabo este estudio, a distintas alícuotas de una disolución madre de analito $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en *n*-heptano/1-butanol/SDS, se les añaden 622 μ l de SDS 0'5 M, 955 μ l de TlNO₃ 0'25 M, 524 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 810 μ l de H₂SO₄ 0'02 M, y enrasando con agua destilada hasta 10 ml de forma que la concentración de analito variara entre 0 a 556 ng/ml para el Ace, entre 0 a 965 ng/ml para el Flt, entre 0 a 965 ng/ml para el Pir, entre 0 a 840 ng/ml para el BaA y entre 0 a 1820 ng/ml para el BaP. De estas muestras se introducen 1'5 ml en la cubeta de medida, y se mide la intensidad de fosforescencia a las condiciones instrumentales propias de cada analito: $\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm para Ace, 358/552 nm para Flt, 336/596 nm para Pir, 287/615 nm para BaA y 385/695 nm para BaP, $t_{d/g}$

75/150 μs para Ace, 200/2000 μs para Flt y BaP, 8000/2000 μs para Pir y 5000/2000 μs para BaA, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 775 V para Ace y 1000 V para el resto.

La representación gráfica de este estudio se refleja en la Figura III-22. Se comprueba que existen, para los cinco analitos en estudio, un amplio rango de concentración donde la respuesta varía linealmente con la concentración, siendo de 0 a 370 ng/ml para el Ace, de 0 a 645 ng/ml para el Flt, de 0 a 645 ng/ml para el Pir, de 0 a 560 ng/ml para el BaA y de 0 a 1212 ng/ml para el BaP, observándose la mayor variación de la intensidad de fosforescencia con la concentración para el Acenafteno y el Fluoranteno y la menor para el Benzo[a]pireno.

Rango dinámico lineal

Ace: 0-370 ng/ml
 Flt: 0-645 ng/ml
 Pir: 0-645 ng/ml
 BaA: 0-560 ng/ml
 BaP: 0-1212 ng/ml

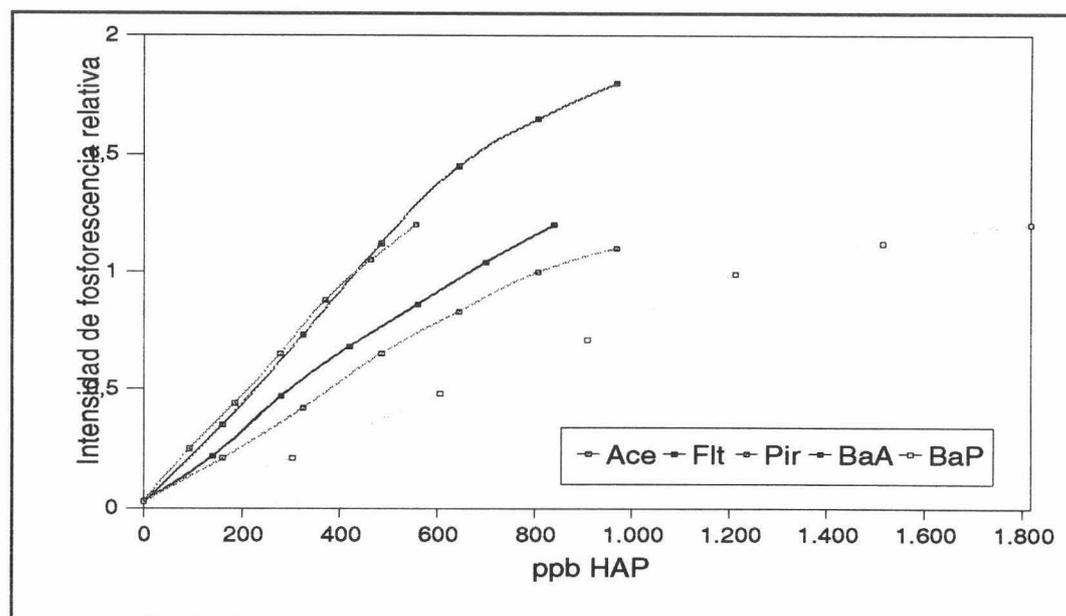


Figura nº III-22.- Estudio de la influencia de la concentración de HAP. $[\text{SDS}] 3'11 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{TINO}_3] 2'39 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_3] 5'25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ y $[\text{H}_2\text{SO}_4] 1'62 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

4. Selección de otros parámetros instrumentales.

4.1. Optimización del mínimo período de flash.

La optimización de este parámetro instrumental se llevó a cabo para disminuir los tiempos de estabilización de la señal y aumentar la reproducibilidad de las medidas. Para el caso de estos cinco compuestos, la relación entre el m.p.f. y el tiempo de medida mantuvo el mismo comportamiento que en los casos estudiados con anterioridad. La optimización se llevó a cabo del siguiente modo: *A distintas alícuotas de 100 μ l de disoluciones madre $2 \cdot 4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS de los cinco compuestos en estudio, se les añaden 622 μ l de SDS 0'5 M, 955 μ l de $TiNO_3$ 0'25 M, 524 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml. Se registraron las curvas de desarrollo de la fosforescencia en función del tiempo, variando el pulso de la lámpara entre 5 y 30 ms, midiendo el tiempo al cual se producía la estabilización de la señal. Los resultados se muestran en la Tabla n° III-25, indicando los tiempos de estabilización de la señal, para cada uno de los cinco analitos en estudio, en función de la velocidad de pulso de la lámpara.*

Tabla n° III-25.- Optimización del m.p.f..

m.p.f. (ms)	Tiempo de estabilización (min)				
	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
5	1'0	3'5	3'0	1'5	4'0
10	2'0	4'0	4'0	3'0	5'5
20	3'0	5'5	5'0	4'0	7'0
30	4'0	6'0	6'0	5'0	9'0

<i>Ace</i>	$\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm, $t_{d/g}$ 75/150 μ s, rendijas _{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 775 V.
<i>Flt</i>	$\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas _{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
<i>Pir</i>	$\lambda_{exc/em}$ 336/596 nm, $t_{d/g}$ 8000/2000 μ s, rendijas _{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
<i>BaA</i>	$\lambda_{exc/em}$ 287/615 nm, $t_{d/g}$ 5000/2000 μ s, rendijas _{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
<i>BaP</i>	$\lambda_{exc/em}$ 385/695 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas _{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.

Se observa que a medida que aumenta el tiempo entre pulso y pulso, el tiempo de estabilización también aumenta, manteniéndose constante la intensidad de fosforescencia. La velocidad de pulso óptima seleccionada para el resto del trabajo experimental fue:

m.p.f.: 5 ms

4.2. Optimización de la longitud de onda de excitación.

Se procedió a la preparación de cinco muestras de los cinco analitos en estudio siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, para llevar a cabo el registro de la variación de la intensidad de fosforescencia con el tiempo excitando a distintas longitudes de onda, para establecer los tiempos de estabilización. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla n° III-26 y las condiciones instrumentales a las cuales se han registrado son las mismas que las utilizadas en la Tabla n° III-25.

Fluoranteno y Benzo[a]pireno poseen dos máximos de excitación a 290 y 352 nm y a 300 y 385 nm, respectivamente, absorbiendo en una amplia zona, lo que permite estudiar la influencia de la longitud de onda de excitación desde 280 nm hasta 410 nm. Para los otros tres analitos (Acenafteno, Pireno y Benz[a]antraceno) la zona de estudio es mucho más reducida.

Tabla n° III-26.- Optimización de la λ_{exc} .

λ_{exc} (nm)	Tiempo de estabilización (min)				
	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
280	1'5	2'0	-	1'5	-
290	2'0	2'0	-	2'0	2'5
300	2'5	3'0	-	3'0	3'0
310	4'0	3'0	3'0	4'0	3'5
320	-	3'5	3'5	-	4'0
330	-	4'0	4'0	-	-
340	-	4'0	5'0	-	-
350	-	5'0	6'0	-	-
360	-	6'0	-	-	4'0
370	-	-	-	-	5'0
380	-	-	-	-	6'0
390	-	-	-	-	7'0
400	-	-	-	-	8'0
410	-	-	-	-	8'5

De estos datos se deduce que la cinética de la reacción de desoxigenación está favorecida a longitudes de onda de excitación más energéticas, no siendo muy drástica esta influencia.

λ_{exc} 290 nm para Ace, Flt, BaA y BaP y 330 nm para Pir

5. Estudio de los parámetros analíticos.

Antes de determinar los distintos parámetros analíticos para el método propuesto, se debe establecer el método de trabajo a seguir, para lo cual es necesario estudiar la interdependencia de las señales analíticas y a partir de este estudio, determinar la posibilidad de realizar una cuantificación directa de los analitos mediante su espectro asincrónico.

5.1. Estudio de la interdependencia de las señales analíticas.

Para llevar a cabo el estudio de la interdependencia de las señales analíticas se prepararon seis muestras independientes conteniendo 370 ng/ml de Ace la primera, 485 ng/ml de Flt la segunda, 495 ng/ml de Pir la tercera, 560 ng/ml BaA la cuarta, 606 ng/ml BaP la quinta y la mezcla de las cinco la sexta muestra, a las cuales se les añadió 622 μ l de SDS 0'5 M, 955 μ l de TINO₃ 0'25 M, 524 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 810 μ l de H₂SO₄ 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Se registraron los espectros correspondientes siguiendo la ruta ya descrita y cuyas coordenadas son: 256/440, 320/514, 400/594, 310/597, 250/640 y 430/710 nm. El resto de condiciones instrumentales fueron: Rendijas de excitación y emisión 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, sensibilidad 1000 V para todos los tramos excepto para el primero que fue 775 V y $t_{d/g}$ 75/150 μ s para el primer tramo, 200/2000 μ s para el segundo y quinto tramo, 8000/2000 μ s para el tercer tramo y 5000/2000 μ s para el cuarto tramo de la ruta.

Los espectros asincrónicos registrados se muestran en la Figura III-23. Se puede observar el máximo de emisión de cada uno de los analitos a los siguientes valores de longitud de onda de excitación y emisión: 296/488 nm para Ace, 358/552 nm para Flt, 336/596 nm para Pir, 287/615 nm para BaA y 385/695 nm para BaP, respectivamente. También se observa el espectro de la mezcla, que es aproximadamente la suma de los espectros individuales de cada HAP. En la Tabla n° III-27 se muestran las medidas de intensidad de fosforescencia correspondientes a cada uno de los analitos en sus espectros individuales y en el correspondiente a la mezcla, así como los errores relativos obtenidos para los espectros individuales con respecto al espectro de la mezcla. La ruta utilizada permite la determinación directa de cada uno de los analitos sin necesidad de obtener sus

correspondientes espectros derivados, con lo cual se agiliza el método además de no conseguir una mejora de los resultados.

Tabla nº III-27.- Interdependencia de las señales analíticas.

	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
$I_{\text{Fosf. individual}}$	0'860	1'149	0'652	0'902	0'405
$I_{\text{Fosf. mezcla}}$	0'922	1'200	0'628	0'867	0'431
% de error relativo	-6'7	-4'4	3'8	3'8	-7'0

5.2. Procedimiento operatorio.

En un matraz de 10 ml se colocan alícuotas de una disolución $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en Ace, Flt, Pir, BaA o BaP en *n*-heptano/1-butanol/SDS de forma que la concentración de éstos en la disolución variase entre 0 y 370 ng/ml, entre 0 y 645 ng/ml, entre 0 y 645 ng/ml, entre 0 y 560 ng/ml y entre 0 y 1210 ng/ml respectivamente para cada analito, se adicionan 622 μl de SDS 0'5 M, 955 μl de TiNO_3 0'25 M, 524 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μl de H_2SO_4 0'02 M y se enrasa con agua destilada. De esta disolución, así preparada, se adicionan 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso con un período de 5 ms a la longitud de onda de 290 nm, excepto para Pir que es a 330 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide a los 2 minutos (6 minutos para el Flt y el BaP) después de empezar a irradiar a una longitud de onda de emisión de 488 nm, 552 nm, 596 nm, 615 nm y 685 nm para Ace, Flt, Pir, BaA y BaP respectivamente con una sensibilidad de 1000 V para todos los casos, excepto para Ace que es de 775 V, $t_{\text{d/g}}$ de 75/150 μs , 200/2000 μs para Flt y BaP, 8000/2000 μs para Pir y 5000/2000 μs para BaA.

5.3. Rectas de calibrado.

Para comprobar la independencia entre las señales analíticas de los cinco HAP, a partir de medidas de la señal analítica correspondiente a cada uno de ellos en su espectro asincrónico, se han establecido dos funciones de calibrado para cada analito, con muestras que contenían cantidades crecientes de uno de los HAP, en ausencia y presencia de concentraciones intermedias de los otros cuatro.

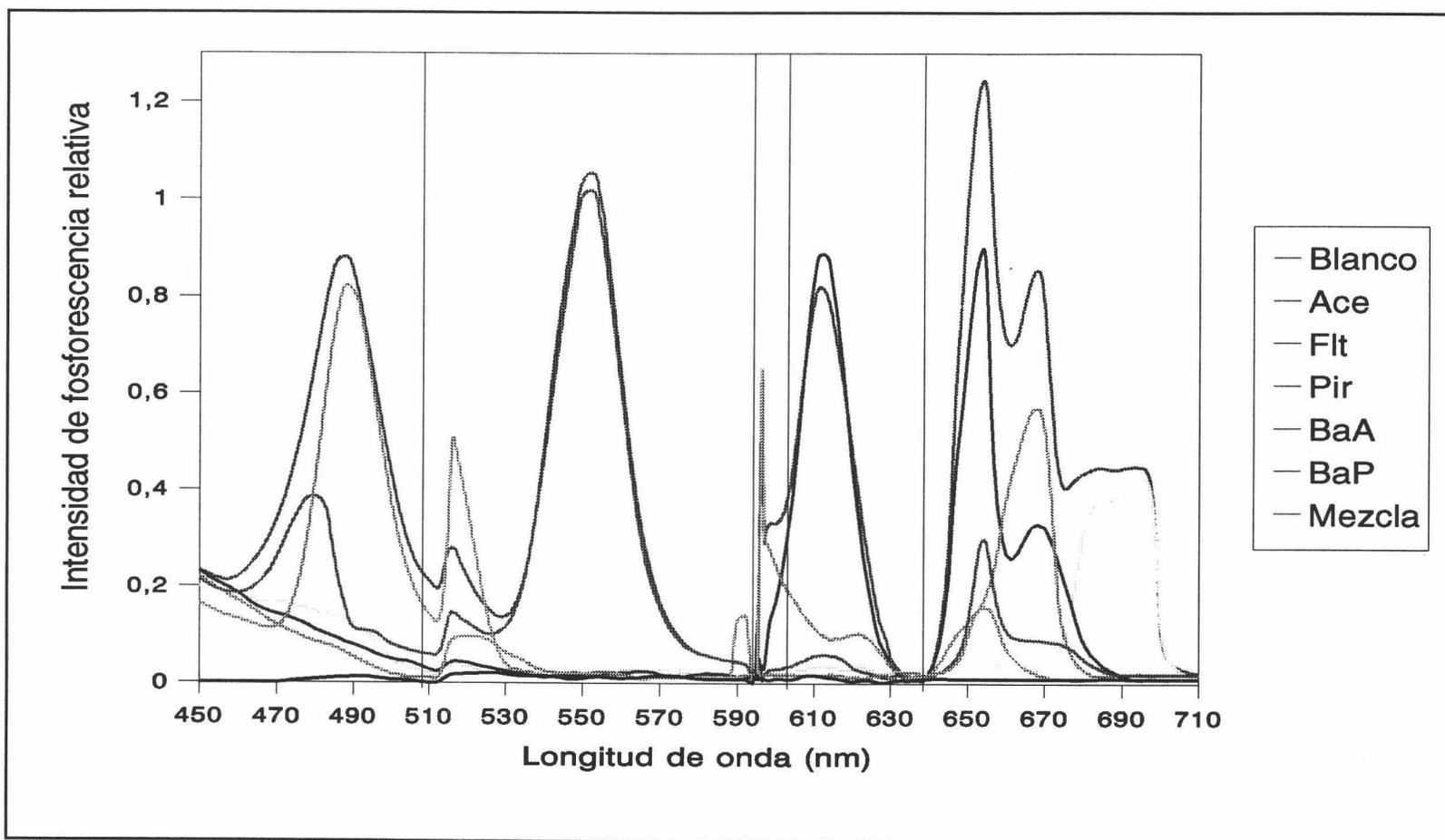


Figura nº III-23.- *Interdependencia de las señales correspondientes a los espectros de los componentes por separado y de la mezcla de Ace, Flt, Pir, BaA y BaP. [Ace] 370 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 485 ng/ml, [BaA] 548 ng/ml, [BaP] 606 ng/ml. $t_{d/g}$ 75/150 μ s para el primer tramo, 200/2000 μ s para el segundo y el quinto, 8000/2000 μ s para el tercer tramo y 5000/2000 μ s para el cuarto, m.p.f. 5 ms, rendijas_{exc/em} 16/16 nm y sensibilidad 775 V para el primer tramo y 1000 V para el resto.*

a) Rectas de calibrado individuales.

Para establecer los calibrados individuales de los cinco HAP, se prepararon cinco series de cinco disoluciones. En cada una se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de Ace, Flt, Pir, BaA y BaP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en n-heptano/1-butanol/SDS de forma que las concentraciones variaran entre 0 y 370 ng/ml, entre 0 y 645 ng/ml, entre 0 y 645 ng/ml, entre 0 y 560 ng/ml y entre 0 y 1210 ng/ml, respectivamente para cada analito. Seguidamente, se les añadió 622 μ l de SDS 0'5 M, 955 μ l de $TiNO_3$ 0'25 M, 524 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml.

Las condiciones instrumentales establecidas fueron: *Coordenadas de la ruta 256/440, 320/514, 400/594, 310/597, 250/640 y 430/710 nm, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, sensibilidad 1000 V para todos los tramos excepto para el primero que fue de 775 V y t_{dig} de 75/150 μ s para el primer tramo, 200/2000 μ s para el segundo y quinto tramo, 8000/2000 μ s para el tercer tramo y 5000/2000 μ s para el cuarto tramo de la ruta.* En las Figuras nº III-24, III-25, III-26, III-27, III-28 y III-29, se recogen los espectros obtenidos (la Figura nº III-27, es una ampliación de la zona correspondiente al calibrado del Pireno de la Figura nº III-26).

A las condiciones instrumentales establecidas las interferencias más graves las soporta el Ace del resto de componentes de la mezcla y el BaA, por parte del Pir; si bien, en la mayor parte de los casos éstas no son significativas, por lo que se puede concluir que es posible la resolución de una mezcla formada por Ace, Flt, Pir, BaA y BaP, a concentraciones dentro del rango lineal. Las medidas de intensidad de fosforescencia obtenidas para cada punto de las rectas de calibrado, correspondientes a cada uno de los analitos, se recogen en las Tablas nº III-28, III-29, III-30, II-31 y III-32.

Tabla nº III-28.-Réplicas correspondientes al calibrado del Ace.

ng/ml	$I_{Fosf.}$	$I_{Fosf.}$	$I_{Fosf.}$
0	0'028	0'035	0'029
93	0'232	0'250	0'253
185	0'440	0'451	0'441
278	0'663	0'674	0'653
370	0'864	0'871	0'884

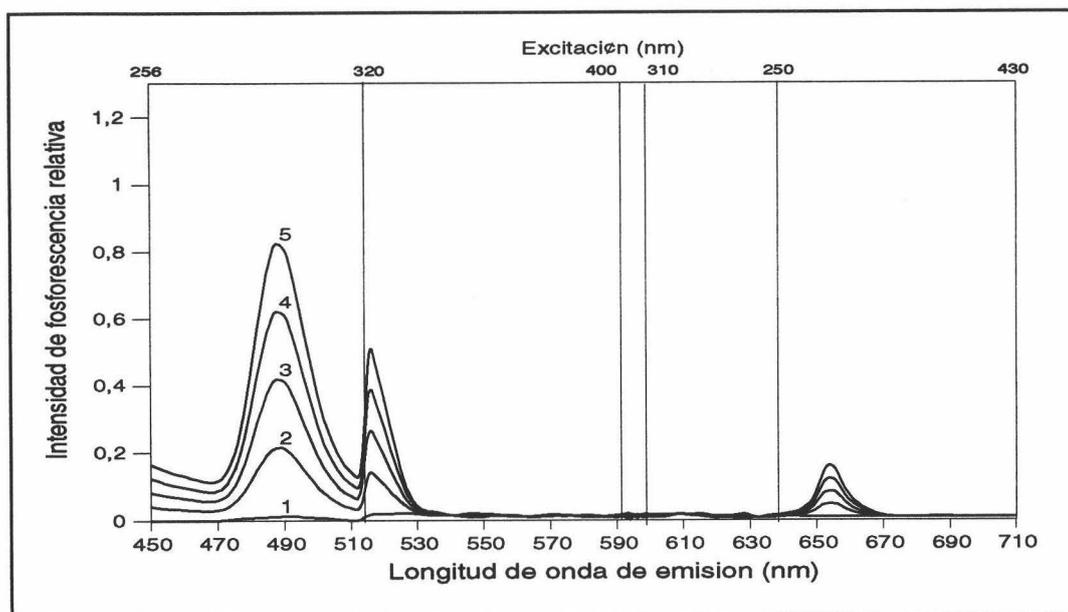


Figura n° III-24.- *Calibrado correspondiente al Acenafteno. (1) 0, (2) 93, (3) 185, (4) 278 y (5) 370 ng/ml.*

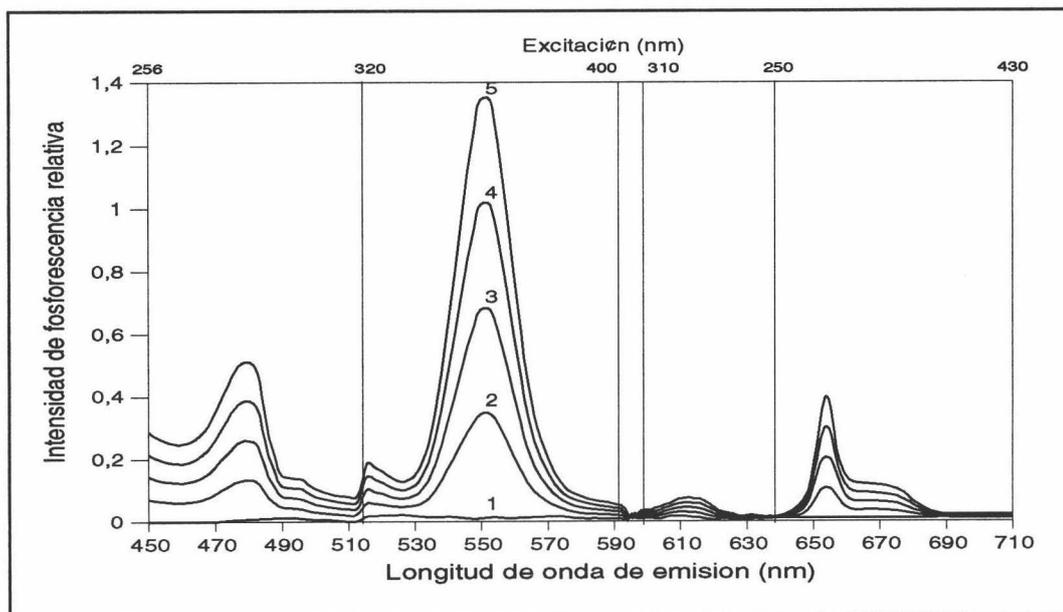


Figura n° III-25.- *Calibrado correspondiente al Fluoranteno. (1) 0, (2) 160, (3) 325, (4) 485 y (5) 645 ng/ml.*

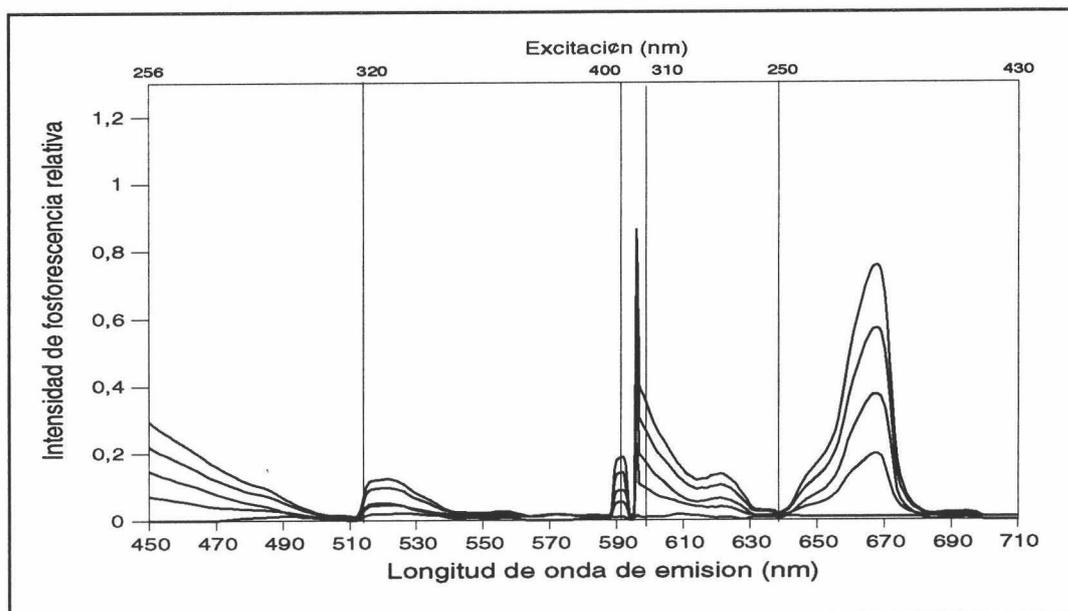


Figura nº III-26.- *Calibrado correspondiente al Pireno. (1) 0, (2) 160, (3) 325, (4) 485 y (5) 645 ng/ml.*

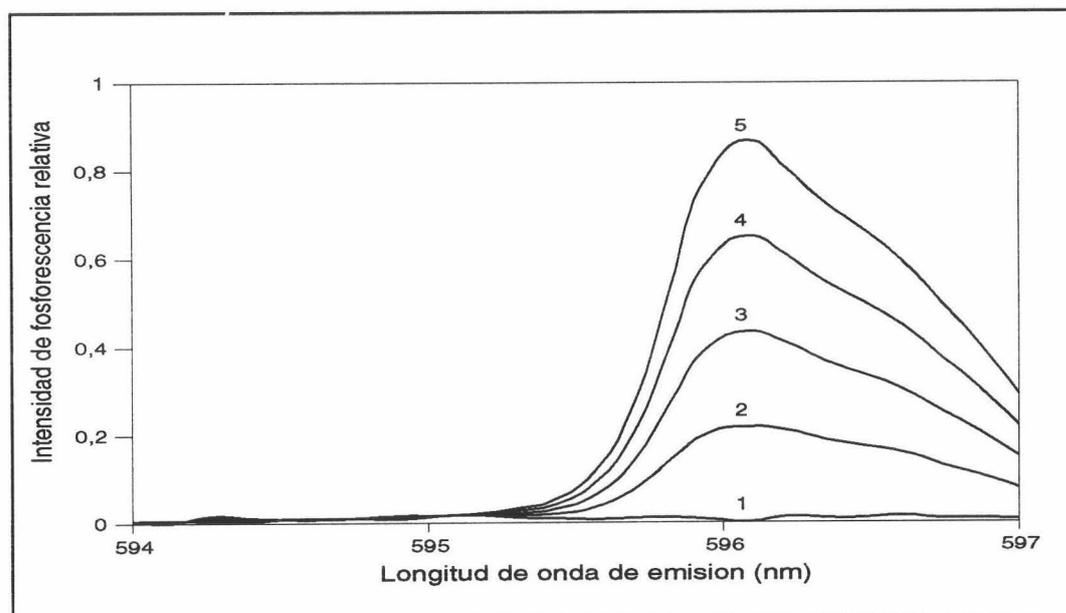


Figura nº III-27.- *Ampliación de la zona correspondiente al calibrado del Pireno. (1) 0, (2) 160, (3) 325, (4) 485 y (5) 645 ng/ml.*

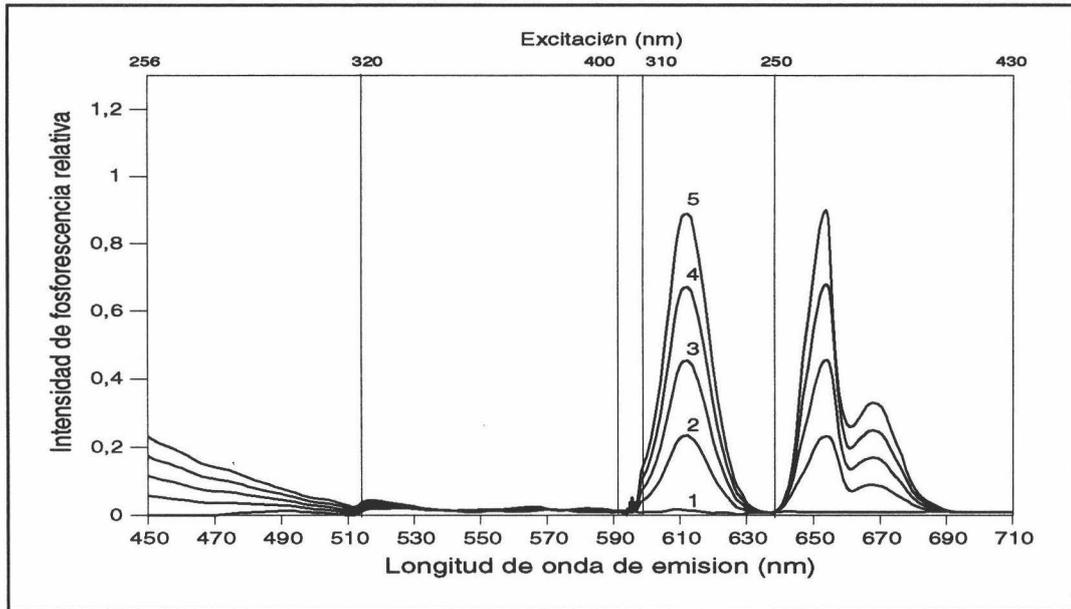


Figura n° III-28.- *Calibrado correspondiente al Benz[a]antraceno. (1) 0, (2) 140, (3) 280, (4) 420 y (5) 560 ng/ml.*

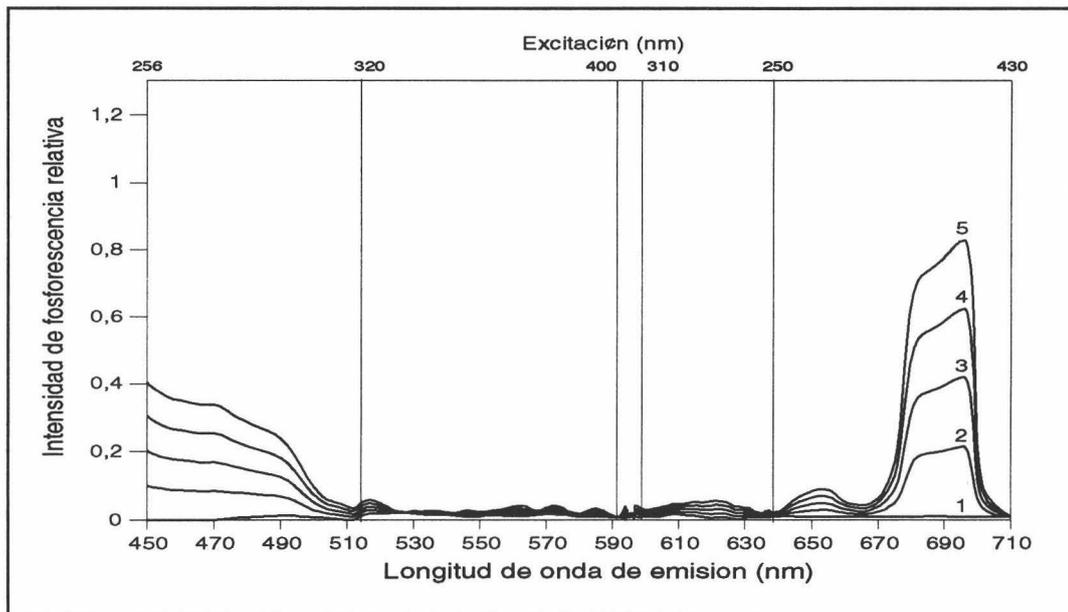


Figura n° III-29.- *Calibrado correspondiente al Benzo[a]pireno. (1) 0, (2) 303, (3) 606, (4) 909 y (5) 1212 ng/ml.*

Tabla n° III-29.- Réplicas correspondientes al calibrado del Flt.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'032	0'023	0'021
160	0'377	0'331	0'340
325	0'735	0'712	0'741
485	1'102	1'124	1'132
645	1'464	1'410	1'473

Tabla n° III-30.- Réplicas correspondientes al calibrado del Pir.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'038	0'025	0'029
160	0'210	0'234	0'198
325	0'430	0'427	0'399
485	0'684	0'654	0'607
645	0'851	0'835	0'815

Tabla n° III-31.- Réplicas correspondientes al calibrado del BaA.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'032	0'028	0'033
140	0'225	0'234	0'214
280	0'474	0'470	0'460
420	0'691	0'675	0'667
560	0'850	0'884	0'841

Tabla n° III-32.- Réplicas correspondientes al calibrado del BaP.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'022	0'035	0'028
303	0'220	0'201	0'211
606	0'481	0'475	0'490
909	0'724	0'700	0'694
1212	1'010	1'000	0'961

Los datos estadísticos obtenidos para las cinco rectas en estudio, se resumen en la Tabla n° III-33.

Tabla n° III-33.- Datos estadísticos de las rectas de calibrado.

Dato estadístico	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
Ordenada en el origen (a)	0'030	0'010	0'021	0'030	-0'0004
Desviación estándar (s_a)	0'0039	0'0115	0'0101	0'0084	0'0126
Desviación estándar relativa (DER(a)) (%)	12'84	114'11	48'32	27'89	-3144'23
Pendiente (b)	0'0023	0'0022	0'0013	0'0015	0'0008
Desviación estándar (s_b)	0'00001	0'00001	0'00001	0'00001	0'00001
Desviación estándar relativa (DER(b)) (%)	0'75	1'30	2'03	0'63	2'12
Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$)	0'0086	0'0257	0'0227	0'0189	0'0281
Coefficiente de correlación (r)	0'9996	0'9989	0'9973	0'9983	0'9971
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99'93	99'78	99'47	99'65	99'42
g	0'0003	0'0008	0'0019	0'0012	0'0021

b) Rectas de calibrado en mezclas.

Se han establecido las funciones de calibrado para cada HAP en la presencia de los otros cuatro. La concentración constante fijada para cada uno de los cinco analitos ha sido 370 ng/ml para Ace, 485 ng/ml para Flt, 495 ng/ml para Pir, 560 ng/ml para BaA y 606 ng/ml para BaP. Se han construido así cinco rectas de calibrado, variando la concentración de uno de los analitos dentro de su correspondiente rango dinámico lineal y manteniendo constantes las concentraciones de los otros cuatro en los valores citados anteriormente. Las condiciones instrumentales utilizadas son las indicadas en el procedimiento operatorio. En la Tabla n° III-34 se muestran las funciones de calibrado obtenidas.

Tabla n° III-34.- Funciones de calibrado para las mezclas.

Analito	a	b	r
Acenafteno	0'031	0'0026	0'999
Fluoranteno	0'030	0'0023	0'996
Pireno	0'020	0'0012	0'994
Benz[a]antraceno	0'034	0'0014	0'993
Benzo[a]pireno	0'002	0'0009	0'992

Tanto la ordenada en el origen como la pendiente permanecen prácticamente inalterables, con respecto a las funciones de calibrado de los HAP de forma individual, manteniendo una buena linealidad.

5.4. Parámetros de fiabilidad.

Los parámetros de fiabilidad del método: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido calculados mediante el modelo de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado. La sensibilidad analítica, así como la linealidad son establecidas mediante el uso de los datos derivados del calibrado, reflejados en las Tablas nº III-28, 29, 30, 31 y 32. Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar de los blancos y de los patrones usados para el establecimiento de las rectas de calibrado. Los valores de dichas desviaciones estándar se muestran en la Tabla nº III-35.

Tabla nº III-35- Desviaciones estándar en función del calibrado.

ng/ml					s _c				
Ace	Flt	Pir	BaA	BaP	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
0	0	0	0	0	2'777	8'340	13'041	9'149	25'348
93	160	160	140	303	2'499	7'594	11'875	8'303	23'426
185	325	325	280	606	2'405	7'259	11'362	7'929	22'276
278	485	485	420	909	2'505	7'593	11'895	8'298	23'048
370	645	645	580	1212	2'779	8'356	11'091	9'073	26'033

La estimación de todos los parámetros característicos del método, calculados a partir del modelo de análisis de la regresión se reflejan en la Tabla nº III-36.

Tabla nº III-36.- Parámetros de fiabilidad.

Parámetro	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
Linealidad (1-DER(b)%)	99'25	98'70	97'97	98'36	97'87
Sensibilidad analítica (ng/ml)	3'80	11'48	17'96	12'53	35'22
Límite de detección (ng/ml)	8'33	25'02	39'12	27'45	76'05
Límite de cuantificación (ng/ml)	27'77	83'40	130'41	91'50	253'49
Rango dinámico lineal (ng/ml)	28-370	83-645	130-645	92-560	253-1212
Precisión (DER%)	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
	93 2'65	160 5'02	160 7'77	140 6'44	303 8'86
	185 1'32	325 2'26	325 3'61	280 2'73	606 3'69
	278 0'90	485 1'54	485 2'40	420 1'93	909 2'61
	370 0'75	645 1'30	645 2'04	560 1'65	1212 2'10

5.5. Estudio de interferencias.

El estudio se va a centrar en el análisis de la influencia ejercida por la presencia de otros hidrocarburos aromáticos policíclicos sobre los cinco analitos del método propuesto. Para ello, *se ha preparado una muestra para cada interferente que contenía 370 ng/ml de Acenafteno, 485 ng/ml de Fluoranteno, 495 ng/ml de Pireno, 560 ng/ml Benz[a]antraceno, 606 ng/ml Benzo[a]pireno junto con una cierta cantidad de interferente, a las cuales se les añadió 622 µl de SDS 0'5 M, 955 µl de TlNO₃ 0'25 M, 524 µl de Na₂SO₃ 0'1 M y 810 µl de H₂SO₄ 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml.* En la Tabla nº III-37 se resumen los datos de tolerancia de las distintas especies ensayadas para los cinco analitos de la mezcla.

Tabla nº III-37.- Nivel de tolerancia de especies extrañas.

Interferente	Nivel de tolerancia (ng/ml)				
	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
Fluoreno, Flu	500	500	33	330	600
Fenantreno, Fen	600	12000	2100	9000	12000
Naftaleno, Naf	400	30000	5000	30000	30000
Antraceno, Ant	1000	770	100	360	1000

Ace $\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm, $t_{d/g}$ 75/150 µs, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 775 V.
 Flt $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 µs, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
 Pir $\lambda_{exc/em}$ 336/596 nm, $t_{d/g}$ 8000/2000 µs, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
 BaA $\lambda_{exc/em}$ 287/615 nm, $t_{d/g}$ 5000/2000 µs, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.
 BaP $\lambda_{exc/em}$ 385/695 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 µs, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sens. 1000 V.

Se observa en esta tabla que los mayores niveles de tolerancia los presentan el Benzo[a]pireno y el Fluoranteno, sin duda, por la localización espectral de su máximo de emisión fosforescente. El compuesto que presenta mayor interferencia es el Acenafteno, debido a su localización espectral y a las condiciones instrumentales de medida de su intensidad fosforescente.

Sin embargo, en conjunto se puede decir que, a las condiciones experimentales e instrumentales seleccionadas para la determinación conjunta de los cinco HAP, no existen interferencias considerables por la presencia de otros hidrocarburos aromáticos policíclicos de características similares a los que se están estudiando.

6. Aplicaciones.

6.1. Resolución de muestras sintéticas.

Se llevó a cabo la determinación conjunta de los cinco HAP para distintas proporciones en mezclas de ellos, al objeto de comprobar la validez del método. Para todas las mezclas sintéticas se ha seguido el mismo procedimiento: *en un matraz de 10 ml se añaden los volúmenes necesarios de microemulsión de Ace, Flt, Pir, BaA y BaP para que la concentración final de los mismos entre dentro del rango lineal de cada compuesto. A continuación se le añaden 622 μ l de SDS 0'5 M, 955 μ l de $TiNO_3$ 0'25 M, 524 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada. Se mide la intensidad de fosforescencia a las $\lambda_{exc/em}$ de 296/488 nm, 358/552 nm, 336/596 nm, 287/615 nm y 385/695 nm, correspondientes al Ace, Flt, Pir, BaA y BaP, respectivamente, en el espectro asincrónico de ángulo variable, calculándose la concentración encontrada, para cada una de las especies en estudio, mediante interpolación en la correspondiente función de calibrado y a partir de ese valor el porcentaje de recuperación en cada determinación. En la Tabla n° III-38, se resumen los resultados obtenidos.*

Tabla n° III-38.- Estudio de recuperación en muestras sintéticas.

Concentración adicionada (ng/ml)					Recuperación (%)				
Ace	Flt	Pir	BaA	BaP	Ace	Flt	Pir	BaA	BaP
93	325	160	140	606	118'2	92'3	95'0	110'7	107'2
185	485	325	280	1212	111'1	94'8	92'3	116'1	90'7
278	645	160	420	303	119'9	93'0	93'8	107'1	107'3
370	160	325	560	303	119'2	87'5	95'4	114'3	108'9
93	325	160	560	303	116'1	92'3	90'0	108'9	113'9
185	485	325	420	606	119'2	92'8	92'3	107'1	107'1
78	645	160	280	606	114'6	97'7	93'8	125'0	110'6
370	160	325	140	606	117'6	90'6	90'8	125'4	112'8

Ace $\lambda_{exc/em}$ 296/488 nm, $t_{d/g}$ 75/150 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 775 V.
 Flt $\lambda_{exc/em}$ 358/552 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 Pir $\lambda_{exc/em}$ 336/596 nm, $t_{d/g}$ 8000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 BaA $\lambda_{exc/em}$ 287/615 nm, $t_{d/g}$ 5000/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.
 BaP $\lambda_{exc/em}$ 385/695 nm, $t_{d/g}$ 200/2000 μ s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1000 V.

6.2. Muestras de polvo de carretera.

a) Método analítico y resultados.

Como método analítico se ha empleado el de la curva de calibrado con adición de patrón. A una muestra de 10 g de polvo de carretera se le adicionan 10 ml de ciclohexano y se agita durante 30 minutos. La muestra se decanta y se repite la operación, se filtra y se lava con 5 ml de ciclohexano, se combinan los extractos enrasando a 25 ml. Para la obtención de las curvas de calibrado, se prepararon una serie de 5 muestras en matraces de 10 ml, para ello se toman 100 μ l de muestra, se evapora el ciclohexano mediante paso de N_2 ; posteriormente, se adiciona la cantidad suficiente de disolución patrón $2'4 \cdot 10^{-4}$ M de Ace, de Flt o de Pir, 622 μ l de SDS 0'5 M, 955 μ l de TINO₃ 0'25 M, 524 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 810 μ l de H₂SO₄ 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Las condiciones instrumentales a las cuales se efectúan las medidas son las indicadas en el procedimiento operatorio.

Una vez seguido el procedimiento anteriormente descrito, se obtuvieron las rectas de calibrado, a partir de las medidas de la intensidad de fosforescencia correspondientes. Éstas se muestran en la Tabla n° III-39.

Tabla n° III-39.- *Funciones de calibrado para las mezclas.*

Analito	a	b	r
Acenafteno	0'032	0'0022	0'997
Fluoranteno	0'020	0'0023	0'996
Pireno	0'024	0'0014	0'997

Los resultados obtenidos indican que las concentraciones de los analitos en la muestra problema están por debajo del límite de detección del método propuesto.

b) Estudio de recuperación.

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Para ello, a una muestra de 10 g de polvo de carretera se le adicionan distintas cantidades de Ace, Flt y Pir, de forma que su concentración entre dentro del rango lineal del método propuesto, en cada caso. A esta muestra se le adicionan 10 ml

de ciclohexano agitando durante 30 minutos. La muestra se decanta y se repite la operación, se filtra y se lava con 5 ml de ciclohexano, se combinan los extractos enrasando a 25 ml. Se toma 1 ml, se evapora el ciclohexano mediante paso de N_2 y se le añade 100 μ l de 1-heptano, 1-pentanol y disolución 0'5 M de SDS hasta un volumen final de 5 ml, siendo ésta la disolución de muestra. Para la obtención de las curvas de calibrado, se preparó una serie de 5 muestras en matraces de 10 ml, para ello se adicionan 500 μ l de disolución de muestra, posteriormente se adicionan 40 μ l de $2'4 \cdot 10^{-4}$ M en BaA y BaP, 122 μ l de SDS 0'5 M, 955 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 524 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. Las condiciones instrumentales a las cuales son llevadas a cabo las medidas de fosforescencia son las indicadas en el Procedimiento operatorio.

Los valores correspondientes a la intensidad de fosforescencia se interpolan en las funciones de calibrado de la experiencia anterior obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla n° III-40.

Tabla n° III-40.- Estudio de recuperación en muestras de polvo de carretera.

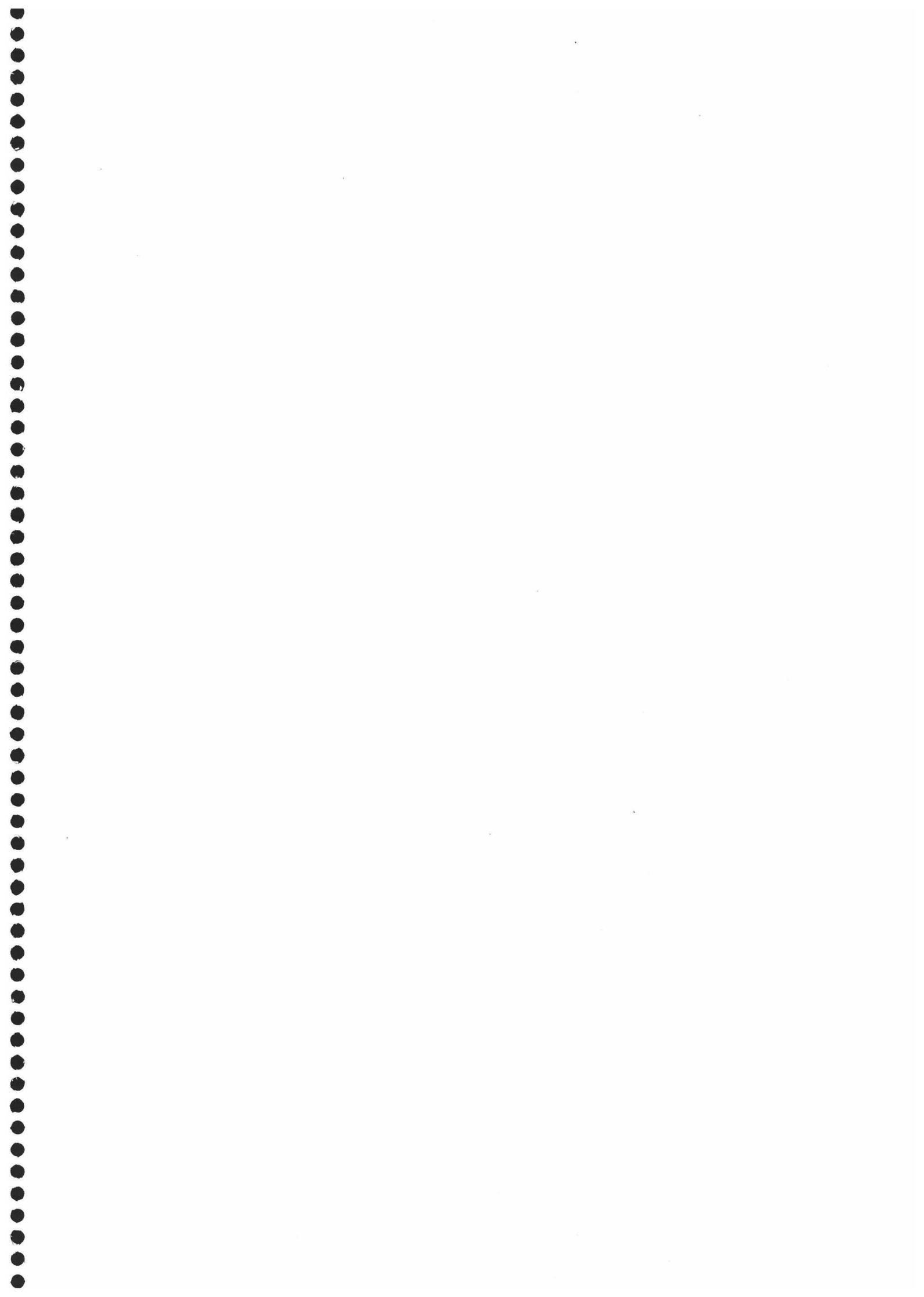
Concentración adicionada (ng/ml)			Concentración encontrada (ng/ml)			Recuperación (%)		
Ace	Flt	Pir	Ace	Flt	Pir	Ace	Flt	Pir
296	388	388	258	364	355	87'4	93'8	91'4
296	388	388	225	350	362	76'2	90'2	93'4
296	388	388	240	351	350	81'2	90'4	90'2
296	388	388	237	339	346	79'2	87'4	89'2

Los porcentajes de recuperación obtenidos están comprendidos entre 80 y 90 %, siendo los valores medios de 81'1, 90'5, 91'1 %, con unos valores de desviación estándar correspondientes de 4'73, 2'61 y 1'80, para Ace, Flt y Pir, respectivamente.

Se puede concluir que la determinación fosforimétrica conjunta de Ace, Flt y Pir, en presencia de BaA y BaP mediante barrido asincrónico es viable en muestras de polvo de carretera, siguiendo la metodología propuesta.

Capítulo IV

Determinación fosforimétrica conjunta cualitativa de nueve hidrocarburos aromáticos policíclicos



1. Características espectroscópicas.

Se procedió al estudio, desde un punto de vista cualitativo, de la determinación de una mezcla que contenga al menos nueve hidrocarburos aromáticos policíclicos distintos. Los nueve HAP elegidos fueron: Naftaleno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Pireno, Benz[a]antraceno, Benzo[a]pireno y Benzo[e]pireno.

Se realizó un estudio de la posible identificación fluorimétrica o fosforimétrica, de una mezcla de estos nueve HAP; con objeto de comparar ambas técnicas luminiscentes respecto a su posible utilización para resolver mezclas de estos analitos. Para ello, se registraron los espectros de fluorescencia y fosforescencia total y las curvas de decaimiento fosforescente de cada uno de ellos.

1.1. Características fluorescentes.

En primer lugar, se registraron los espectros de fluorescencia total de los nueve HAP indicados anteriormente. Para ello, se prepararon una serie de muestras conteniendo distintas cantidades de HAP, de forma que fueran isofluorescentes, según el procedimiento operatorio siguiente: *Se preparó una disolución madre añadiendo a 100 μ l de una disolución $2'4 \cdot 10^{-2}$ M de cada uno de los HAP estudiados en n-heptano, 100 μ l de 1-butanol y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. Distintas alícuotas de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M (500 μ l de Naf, 100 μ l de Ace, 50 μ l de Flu, 200 μ l de Fen, 100 μ l de Flt, 50 μ l de Pir, 80 μ l de BaA, 40 μ l de BaP y 60 μ l de BeP) se les añadió 600 μ l de SDS 0'5 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de cada HAP fue: 1500 ng/ml para Naf, 370 ng/ml para Ace, 200 ng/ml para Flu, 855 ng/ml para Fen, 485 ng/ml para Flt, 243 ng/ml para Pir, 438 ng/ml para BaA, 242 ng/ml para BaP y 363 ng/ml para BeP. A estas muestras se les ha registrado el espectro en las siguientes condiciones instrumentales: *Excitación 250-425 nm, emisión 275-550 nm, velocidad de barrido 6 nm/s, paso de monocromador de 2 nm y 5 nm para el de emisión y excitación respectivamente, rendijas de excitación y emisión 4/4 nm y sensibilidad de 525 V.* Los espectros de fluorescencia total obtenidos en estas condiciones para los distintos HAP se encuentran representados en forma de mapas de contorno en la Figura nº IV-1.*

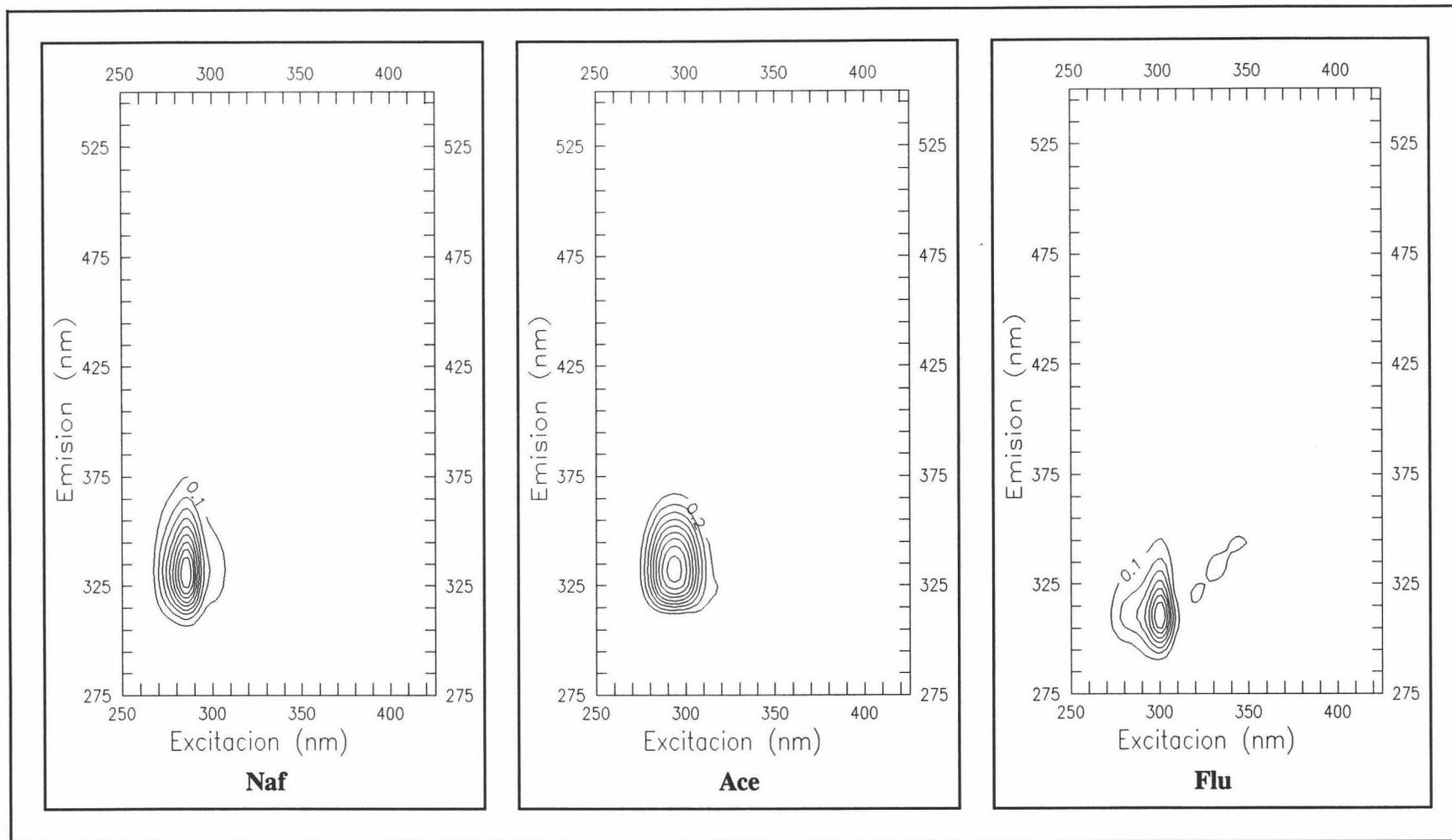


Figura n° IV-1.- Mapas de contorno de los espectros fluorescencia total del Naf, Ace, Flu, Fen, Flt, Pir, BaA, BaP y BeP. [Naf] 1500 ng/ml, [Ace] 370 ng/ml, [Flu] 200 ng/ml, [Fen] 855 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 243 ng/ml, [BaA] 438 ng/ml, [BaP] 242 ng/ml, [BeP] 363 ng/ml y [SDS] $3 \cdot 10^{-2}$ M.

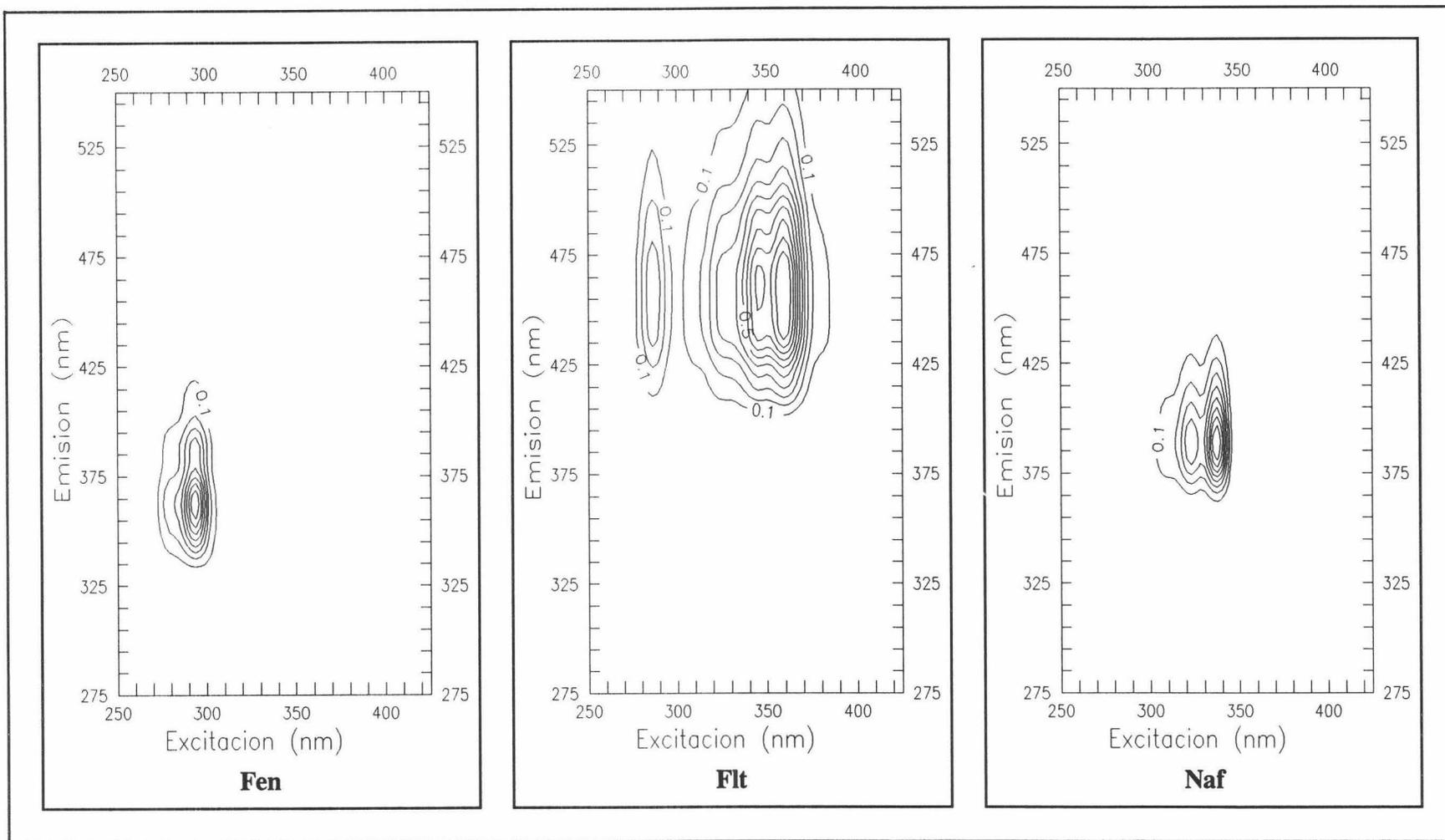


Figura nº IV-1.- (Continuación).

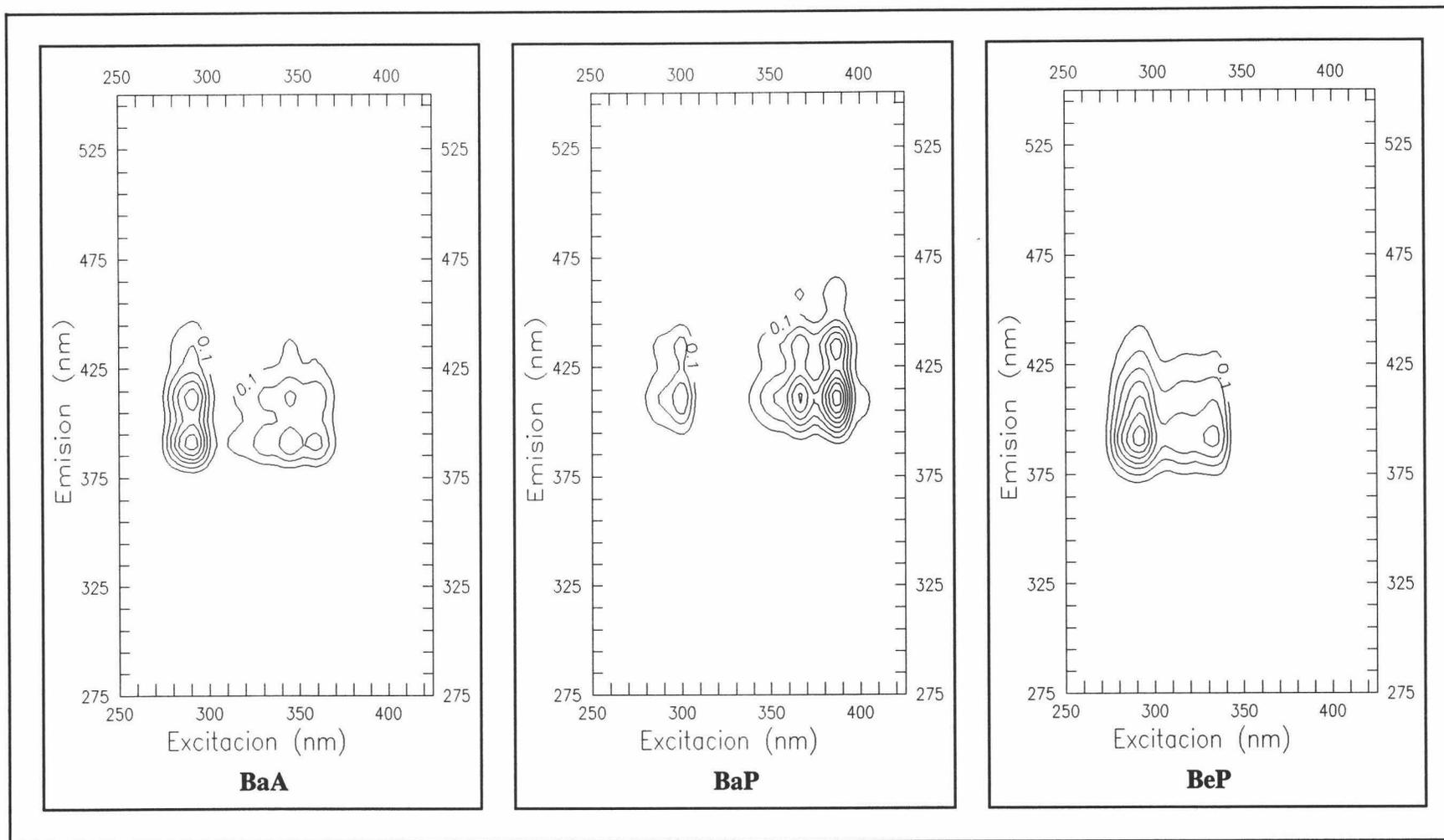


Figura n° IV-1.- (Continuación).

1.2. Características fosforescentes.

Conocidas las características fluorescentes, se procedió al registro de los espectros de fosforescencia total y de las curvas de decaimiento fosforescente a sus máximos de emisión. Para llevar a cabo el registro de los espectros de fosforescencia total se prepararon una serie de muestras conteniendo distintas cantidades de HAP, de forma que fueran isofosforescentes, según el procedimiento siguiente: *A distintas alícuotas de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^{-4}$ M (320 μ l de Naf, 42 μ l de Ace, 25 μ l de Flu, 60 μ l de Fen, 100 μ l de Flt, 75 μ l de Pir, 48 μ l de BaA, 300 μ l de BaP y 40 μ l de BeP) se les añadió 600 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La concentración final de cada HAP fue: 985 ng/ml para Naf, 155 ng/ml para Ace, 100 ng/ml para Flu, 257 ng/ml para Fen, 485 ng/ml para Flt, 365 ng/ml para Pir, 263 ng/ml para BaA, 1815 ng/ml para BaP y 242 ng/ml para BeP. A las muestras preparadas anteriormente se les registró el espectro en las siguientes condiciones instrumentales: *Excitación 250-425 nm, emisión 400-750 nm, velocidad de barrido de 6 nm/s, paso de monocromador de 2 nm y 5 nm para el de emisión y excitación respectivamente, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm, tiempo de decaimiento 200 μ s, tiempo de integración de 2000 μ s y sensibilidad de 1000 V.* Los respectivos espectros de fosforescencia total de los nueve HAP estudiados se reflejan en forma de mapas de contorno en la Figura n° IV-2.*

1.2.1. Curvas de decaimiento.

Un parámetro no existente en las técnicas fluorescentes convencionales y que hace que la fosforescencia sea una técnica más selectiva, es el tiempo de vida media. Las medidas de intensidad de fosforescencia se realizan a un tiempo determinado, denominado tiempo de decaimiento y durante un cierto tiempo, denominado tiempo de integración. En el presente estudio fosforimétrico de los distintos HAP, se ha utilizado un mismo tiempo de decaimiento e integración para todos los compuestos; sin embargo, se debe recordar que ambos se pueden utilizar como parámetros de selectividad de esta técnica.

Por este motivo se llevó a cabo el registro de las curvas de decaimiento de los distintos HAP, procediendo experimentalmente de forma similar a la parte anteriormente

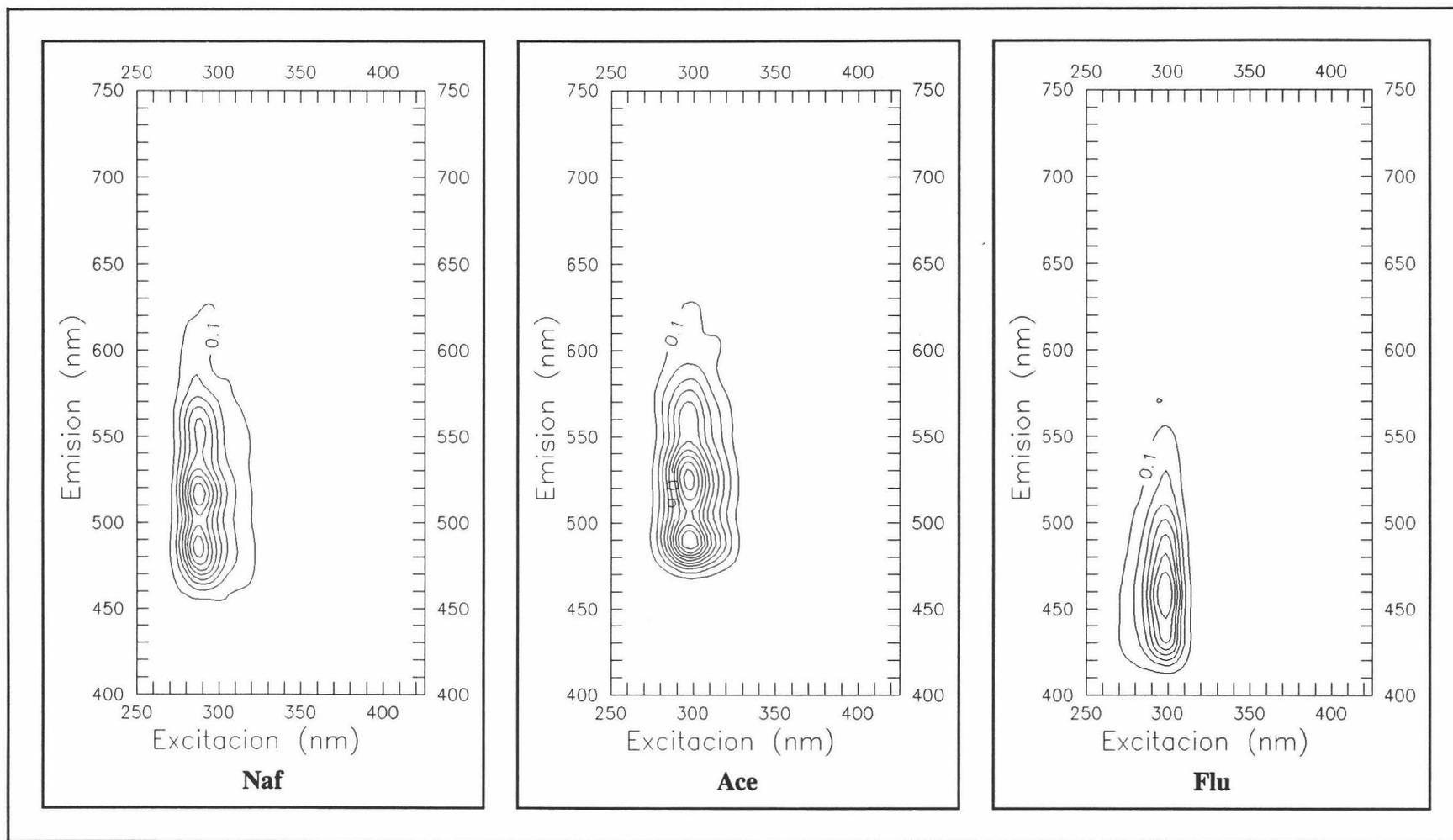


Figura nº IV-2.- Mapas de contorno de los espectros fosforescencia total del Naf, Ace, Flu, Fen, Flt, Pir, BaA, BaP y BeP. [Naf] 985 ng/ml, [Ace] 155 ng/ml, [Flu] 100 ng/ml, [Fen] 257 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 365 ng/ml, [BaA] 260 ng/ml, [BaP] 1815 ng/ml, [BeP] 242 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

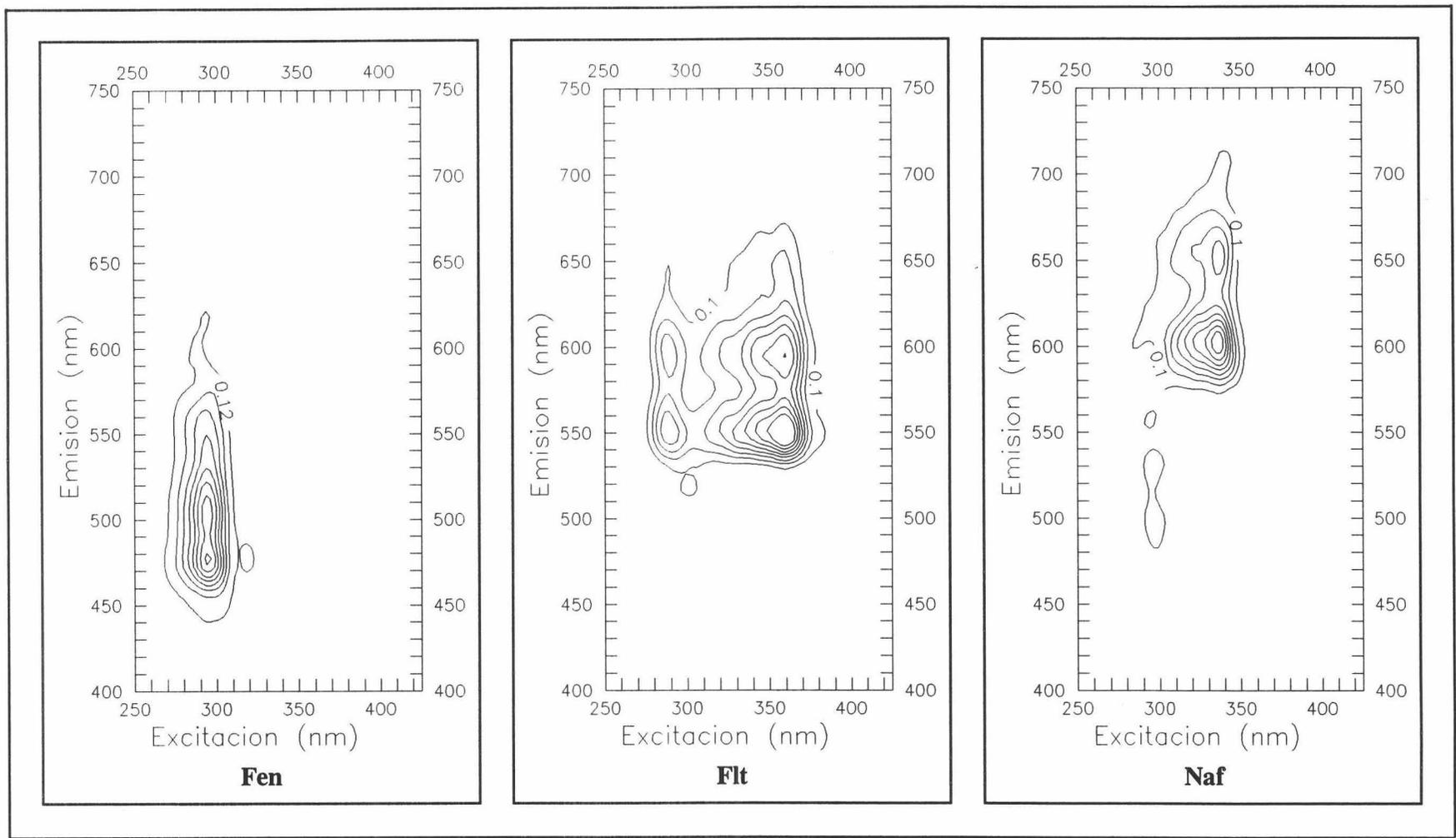


Figura nº IV-2.- (Continuación).

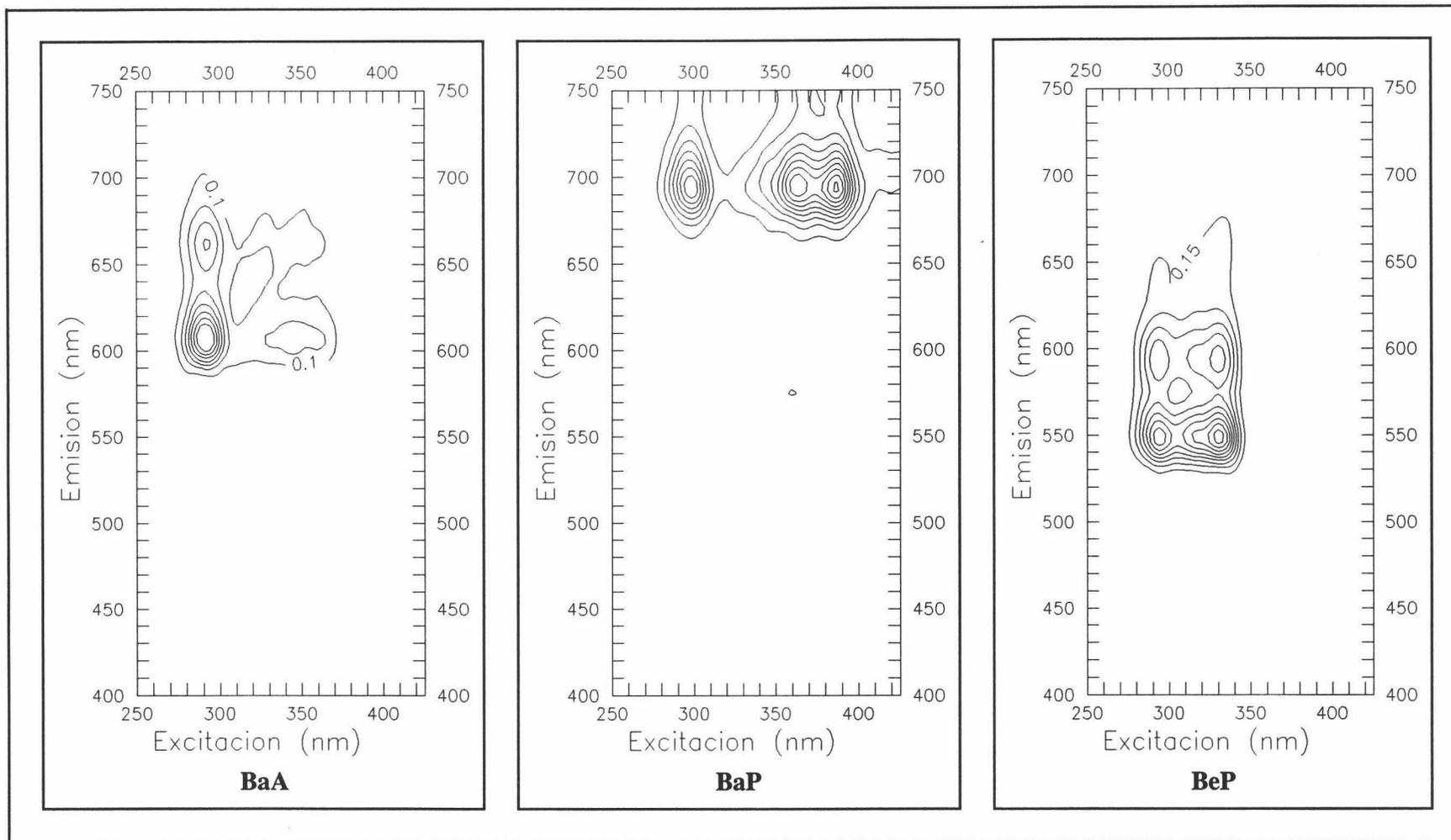


Figura nº IV-2.- (Continuación).

descrita: A distintas alícuotas de disolución madre de HAP $2'4 \cdot 10^4$ M se les añadió 600 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada de forma que las distintas muestras fuesen isofosforescentes. A estas disoluciones se les ha registrado la curva de decaimiento fosforescente en las siguientes condiciones instrumentales: Longitud de onda de onda máxima para cada HAP, barrido de 0 a 20 ms, resolución 50 μ s, repeticiones 100, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm y sensibilidad 1000 V. Registradas las curvas de decaimiento se calcula el parámetro de vida media mediante el ajuste a una exponencial de dicha curva de decaimiento llevado a cabo por el propio programa del espectrofosforímetro. El parámetro vida media calculado para cada uno de los HAP estudiados en estas condiciones experimentales se resumen en la Tabla nº IV-1.

Tabla nº IV-1.- Vida media de los distintos HAP estudiados.

HAP	$\lambda_{exc/em}$ máximo (nm)	Vida media (μ s)
Naftaleno	290/522	296
Acenafteno	298/524	1015
Fluoreno	300/460	610
Fenantreno	296/478	585
Fluoranteno	358/552	1097
Pireno	336/596	6825
Benz[a]antraceno	292/610	3017
Benzo[a]pireno	385/695	2628
Benzo[e]pireno	332/548	9120

Como se observa, Naf, Fen y Flt presentan tiempos de vida cortos, mientras que BeP y Pir tienen tiempos de vida del orden de 10 ms.

2. Comparación entre la fluorescencia y la fosforescencia.

2.1. Fluorescencia.

Comparando, de dos en dos, los distintos mapas de contorno fluorescentes registrados para los nueve HAP, los cuales se muestran en al Figura nº IV-1, se comprueban las posibilidades de desarrollo de un método de análisis fluorimétrico para

esos dos analitos de forma conjunta considerando:

- a) No viable, el caso en el que:
 - 1.- El solapamiento espectral sea casi total.
- b) Viables, los casos en los que:
 - 1.- El solapamiento sea parcial.
 - 2.- No haya solapamiento espectral.

El resultado de este estudio se refleja en la Tabla nº IV-2. Se comprueba que la mayoría de los casos estudiados son viables, no existiendo solapamiento espectral o siendo este parcial. Sin embargo, existen varios casos donde la determinación fluorimétrica no es posible ya que el solapamiento espectral es casi total. Los casos donde no es viable la determinación son: Ace-Naf, Ace-Fen, Flu-Naf, Flu-Ace, Fen-Naf, Fen-Ace, Pir-BeP, BaA-BeP y BeP-Flu.

Tabla nº IV-2.- Resolución espectral fluorescente de una mezcla de HAP.

	Naf	Ace	Flu	Fen	Flt	Pir	BaA	BaP	BeP
Naf									
Ace									
Flu									
Fen									
Flt									
Pir									
BaA									
BaP									
BeP									
	Solapamiento espectral casi total								
	Solapamiento parcial								
	No hay solapamiento espectral								

2.2. Fosforescencia.

De igual forma, comparando, de dos en dos, los distintos mapas de contorno de los espectros de fosforescencia total registrados para los nueve HAP en estudio, los cuales se muestran en la Figura nº IV-2, se comprueba cuando es posible el desarrollo de un

método de análisis fosforimétrico para esos dos analitos de forma conjunta, considerando:

- a) No viable, el caso en el que:
 - 1.- El solapamiento espectral sea casi total y no existan diferencias significativas entre las vidas medias.
- b) Viables, los casos en los que:
 - 1.- El solapamiento sea parcial o con solapamiento casi total pero que existan diferencias entre las vidas medias.
 - 2.- No haya solapamiento espectral.

El resultado de este estudio se refleja en la Tabla n° IV-3. La mayoría de los casos estudiados son viables, o bien por que no existe solapamiento espectral o bien por que este es parcial y/o poseen diferentes tiempos de vida media, existiendo sólomente dos casos donde no es viable dicho estudio resolutivo: Naf-Fen, BeP-Pir.

Tabla n° IV-3.- Resolución espectral fosforescente de una mezcla de HAP.

	Naf	Ace	Flu	Fen	Flt	Pir	BaA	BaP	BeP
Naf									
Ace									
Flu									
Fen									
Flt									
Pir									
BaA									
BaP									
BeP									
	Solapamiento espectral total y no existe diferencia entre las vidas medias								
	Solapamiento parcial o diferencias entre las vidas medias								
	No hay solapamiento espectral								

Comparando el número de casos donde no es viable la determinación conjunta fluorimétrica (ver Tabla n° IV-2) y la fosforimétrica (ver Tabla n° IV-3), se comprueba que se obtiene una mayor capacidad de resolución de muestras mediante el uso de la técnica espectrofosforimétrica, debido a que existe un nuevo parámetro de selectividad para la resolución de mezclas, el tiempo de decaimiento, t_d . Este nuevo parámetro permite

resolver problemas de interferencia espectral cuando existen diferencias significativas entre las curvas de decaimiento de los analitos que se quieren resolver, existiendo menos incompatibilidades en cuanto a la posible resolución de mezclas de éstos.

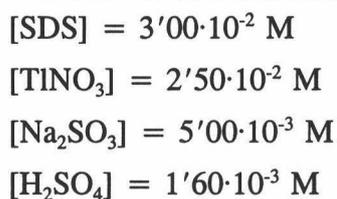
Unas conclusiones semejantes se pueden obtener al superponer los espectros fluorescentes contenidos en la Figura nº IV-1 y los espectros fosforescentes en la Figura nº IV-2. Estas superposiciones se recogen en las Figuras nº IV-3 y IV-4.

3. Desarrollo del método fosforimétrico.

El desarrollo del método fosforimétrico para la determinación conjunta de una mezcla de estos nueve HAP, consistiría en la adecuada selección de las condiciones experimentales y, muy especialmente, instrumentales a las cuales deberían de llevarse a cabo las medidas de intensidad de fosforescencia.

3.1. Selección de variables experimentales.

Las concentraciones de los reactivos, a las cuales deberían de llevarse a cabo las medidas de intensidad de fosforescencia, se establecen como la media aritmética de los óptimos calculados para los distintos HAP estudiados en la presente memoria. Estas concentraciones son:



Para mejorar la aplicabilidad de la determinación es aconsejable la utilización de microemulsiones. Para este método el agente emulsionante más aconsejable sería una mezcla de n-heptano y 1-butanol en una proporción, en la disolución madre, de al menos un 2 % para ambos. El volumen de muestra más adecuado para introducir en la cubeta es de 1'5 ml, manteniendo el mismo orden de adición hasta ahora utilizado y termostatazando la cubeta de medida a la temperatura de 25 °C. El rango dinámico lineal será necesario establecerlo para cada HAP.

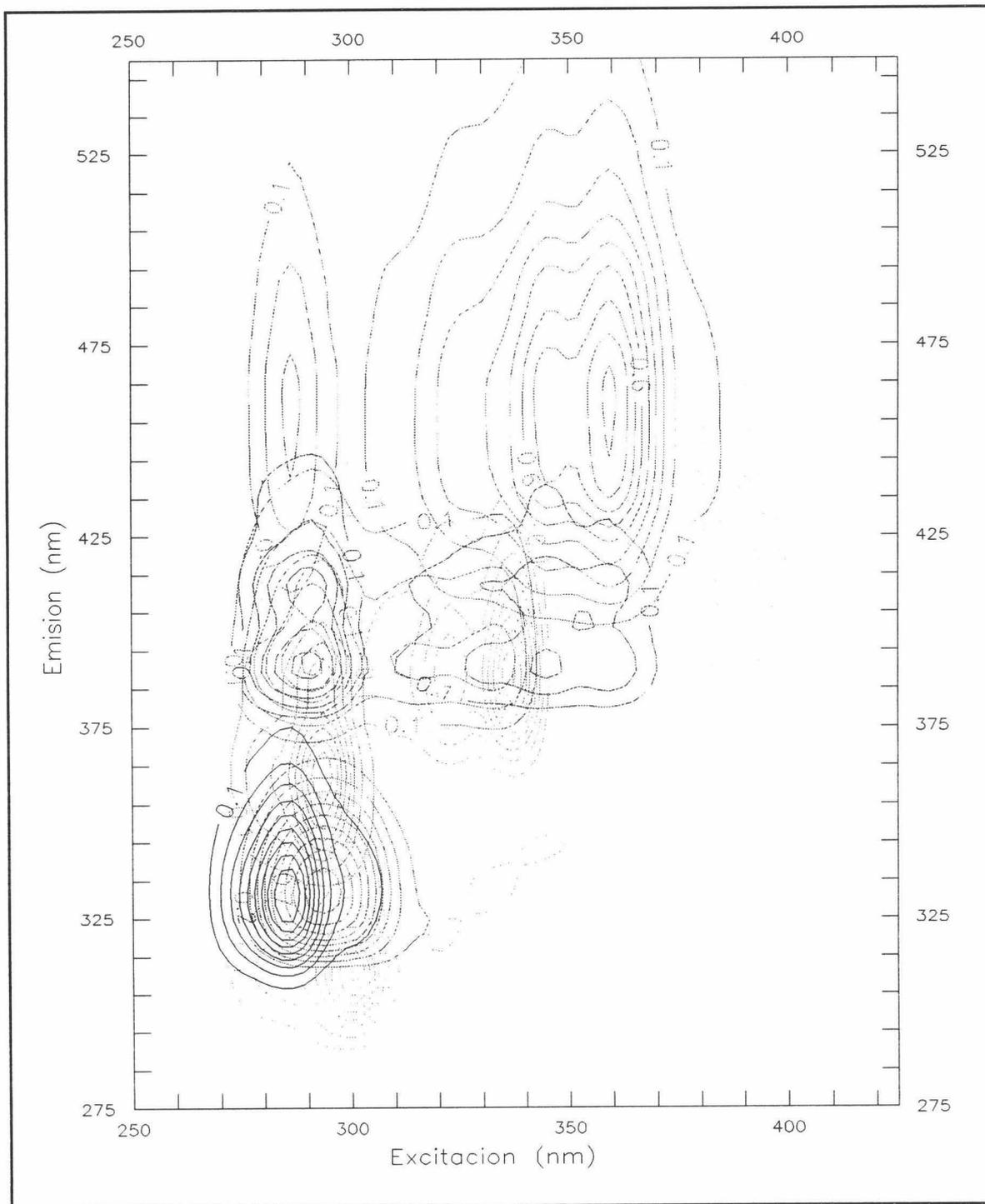


Figura nº IV-3.- Contorno de los espectros de fluorescencia del Naf (—), Ace (---), Flu (····), Fen (— · —), Flt (— · —), Pir (— · —), BaA (— · —), BaP (····) y BeP (····). [Naf] 1500 ng/ml, [Ace] 370 ng/ml, [Flu] 200 ng/ml, [Fen] 855 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 243 ng/ml, [BaA] 438 ng/ml, [BaP] 242 ng/ml, [BeP] 363 ng/ml y [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M.

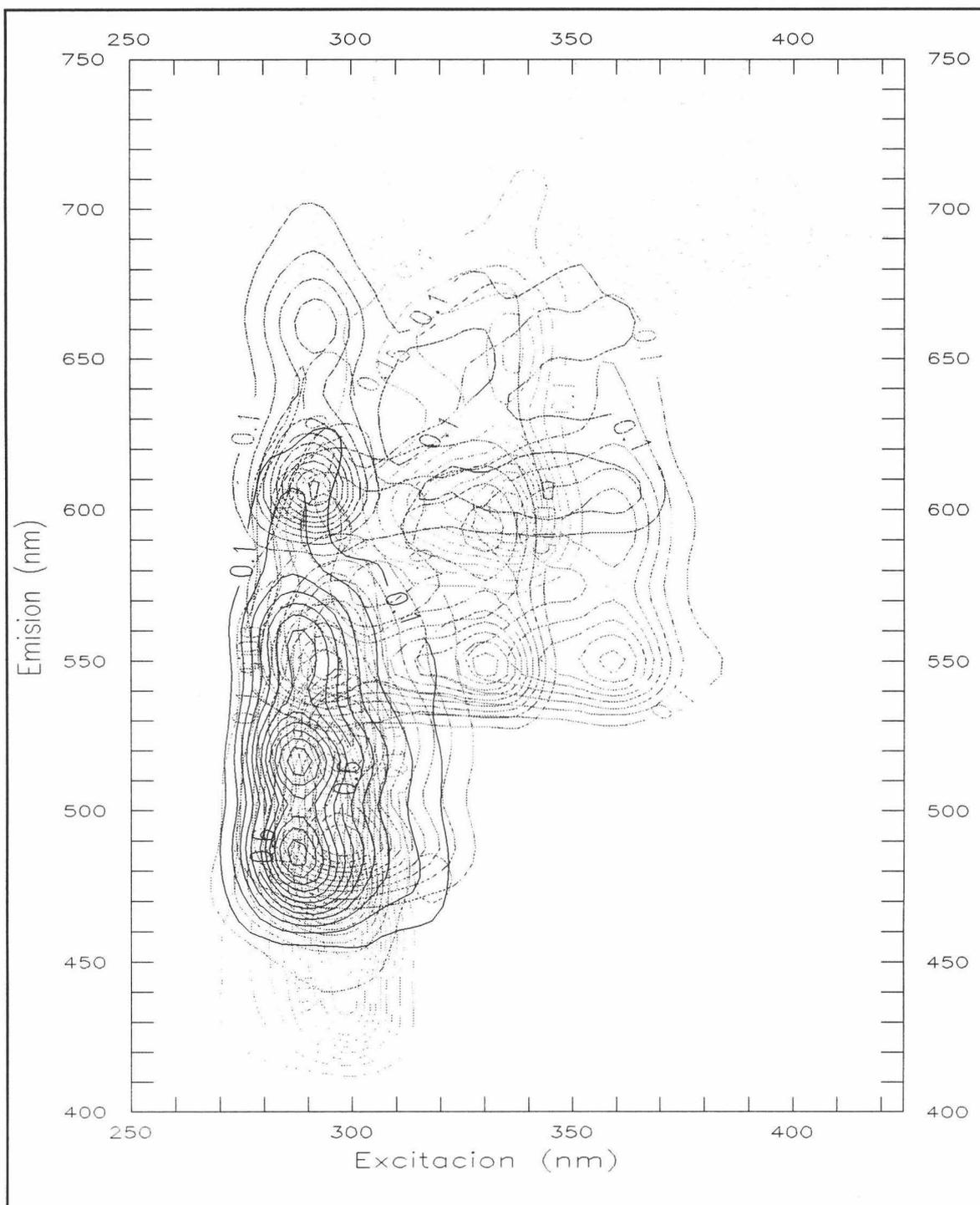


Figura nº IV-4.- Contornos de los espectros de fosforescencia del Naf (—), Ace (---), Flu (---), Fen (—), Flt (—), Pir (---), BaA (—), BaP (---) y BeP (---). [Naf] 985 ng/ml, [Ace] 155 ng/ml, [Flu] 100 ng/ml, [Fen] 257 ng/ml, [Flt] 485 ng/ml, [Pir] 365 ng/ml, [BaA] 260 ng/ml, [BaP] 1815 ng/ml, [BeP] 242 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

3.2. Selección de parámetros instrumentales.

Los parámetros instrumentales que hay que optimizar habitualmente, es decir, rendijas de excitación y emisión, m.p.f. y sensibilidad, se van a mantener en los valores hasta ahora utilizados y que son: 16/16 nm, 5 ms y 1000 V, respectivamente.

Sin duda, los parámetros relacionados con la selectividad del método son las longitudes de onda de excitación y emisión y los tiempos de decaimiento e integración. Por tanto, observando la Figura nº IV-4 se puede concluir que los valores más adecuados de estos parámetros, para el desarrollo del método espectrofotométrico, serían los que se resumen en la Tabla nº IV-2.

Tabla nº IV-2.- Parámetros instrumentales para cada HAP.

HAP	$\lambda_{exc/em}$ (nm)	$t_{d/g}$ (μs)
Naftaleno	-	-
Acenafteno	298/524	1000/1000
Fluoreno	295/450	200/1000
Fenantreno	-	-
Fluoranteno	358/552	200/2000
Pireno	340/596	8000/2000
Benz[a]antraceno	287/615	5000/2000
Benzo[a]pireno	385/695	200/2000
Benzo[e]pireno	332/548	10000/2000

Aunque la fosforescencia es una técnica más selectiva que la fluorescencia, es importante no olvidar que ambas son técnicas complementarias pudiéndose aplicar simultáneamente a una misma mezcla de analitos. A las condiciones de fosforescencia establecidas para esta u otra mezcla de HAP, se pueden registrar señales de fluorescencia midiendo en el mismo instante del pulso de la lámpara, obteniendo así una mayor información sobre el sistema que puede servir para la resolución de ciertas mezclas complejas. De hecho, en la mezcla anterior, se comprueba que el Fen que no se resuelve por técnica fosforimétrica podría resolverse mediante fluorimetría directa a una longitud de onda de excitación/emisión de 290/360 nm (véase Figura nº IV-3). Igualmente, el Naf también parece resolverse mejor por fluorescencia que por fosforescencia.





Parte B

Fitohormonas e insecticidas



1. Introducción.

Plaguicida es el término general empleado para denominar a una serie de sustancias químicas que se emplean para el control de microorganismos (bacterias, hongos, insectos, nematodos, etc...) que consumen, estropean o destruyen los productos agrícolas, bien en el campo o durante el almacenamiento. Asociados a los plaguicidas, por su función reguladora del crecimiento de las plantas, se encuentran las fitohormonas cuyo empleo tiene igual o más importancia que el de los plaguicidas debido a que controlan las malas hierbas que causan una disminución en la producción de las cosechas.

Probablemente, la consecuencia de mayor alcance derivada del amplio uso de los plaguicidas es su contribución a la contaminación y degradación del ambiente (plantas, agua, suelo), debido a su acumulación en los ecosistemas acuático y terrestre pasando a través de la cadena alimentaria a las especies animales y, por último, al hombre. Por todo ello, estas sustancias constituyen una de las preocupaciones más importantes en cuanto a su control, debido a que la persistencia de los mismos es muy elevada (Cheng, 1969).

Además, su intensa actividad biocida y su amplia dispersión en el medio ambiente, convierte a estas sustancias en el grupo más importante de productos químicos identificados como factores de riesgo ambiental. Los efectos secundarios, no intencionados, han generado la necesidad de una sistemática evaluación de su impacto y un análisis del perfil ecotoxicológico

En el análisis de plaguicidas es de uso corriente el término residuo. Su significado está asociado a plaguicida en los mismos términos que contaminante lo está a análisis ambiental. Los términos *toxicidad* y *peligrosidad* no son sinónimos ya que la toxicidad se refiere al carácter que posee un determinado compuesto bajo condiciones experimentales, mientras que la peligrosidad es el riesgo de envenenamiento por medio de dicha sustancia tóxica. La peligrosidad no depende sólo de la toxicidad del plaguicida sino de otros factores tales como el tiempo de exposición, cantidad de material, etc.. La definición dada por el diccionario a cerca de una sustancia tóxica es "*aquella que, introducida en un organismo en pequeñas cantidades, actúa químicamente sobre los tejidos causando graves prejuicios o la muerte*". Desde un punto de vista científico, esta definición debe ser

modificada "*aquellas sustancias que causan un daño en la mayoría de los casos en los que se pone en contacto con organismos vivos durante su uso común*".

Los plaguicidas, por necesidad, son sustancias tóxicas, pero la toxicidad varía de unos a otros pudiendo producirse en el hombre una enfermedad importante con tan solo la ingestión de una pequeña cantidad de sustancia o no producirse efecto alguno a pesar de ingerir grandes cantidades de dichas sustancias. Los factores que influyen en los efectos de dicha ingestión son:

- La toxicidad del producto.
- La dosis del producto, especialmente la concentración.
- Tiempo de exposición.
- Vía de entrada o absorción en el organismo.

Para el desarrollo y comercialización de un determinado plaguicida es necesario realizar una serie de experimentos en animales de laboratorio de fisiología semejante al la del ser humano; por ejemplo, ratones, ratas y conejos blancos, cerdos de guinea y perros sabuesos. Las pruebas intravenosas se suelen realizar en ratones y ratas, las dérmicas, en conejos y cerdos y la toxicidad oral aguda en ratas y perros. Todos estos experimentos son necesarios para determinar las propiedades toxicológicas de los plaguicidas y de esta información, se puede extrapolar la toxicidad para el ser humano, pudiendo estar presentes, en algunos casos, en los alimentos ingeridos por el hombre a niveles que se expresan en $\mu\text{g/ml}$.

La toxicidad de los plaguicidas se define con el término DL_{50} que significa la dosis necesaria de dicho compuesto para matar el 50 % de los animales a los cuales se les ha administrado bajo condiciones experimentales, expresado en miligramos de producto tóxico por kilogramo de peso del cuerpo del animal. La DL_{50} se mide en términos de oral (mediante alimentación o colocación directa en el estómago del animal, ratas, principalmente), dérmica (aplicada a la piel de conejos) y respiratoria (por inhalación).

Dentro del amplio conjunto de plaguicidas, se ha centrado la atención, en el grupo de compuestos derivados del naftaleno. Así, se han llevado a cabo estudios sobre: ácido 2-naftiloxicético, α -naftaleneacetamida y carbaril. Los dos primeros pertenecen al grupo de las fitohormonas mientras que el último se trata de un insecticida.

2. Generalidades.

Para comenzar el estudio de estos plaguicidas, es necesario conocer sus características generales, las cuales se han resumido de forma genérica en:

- 1.- Estructura molecular: Fórmula empírica y peso molecular.
- 2.- Nomenclatura e historia: Nombre químico dado por la IUPAC y la abreviatura con que se conoce.
- 3.- Propiedades: Principalmente se incluyen propiedades físicas tales como el punto de fusión y la solubilidad de dicha sustancia en distintos disolventes.
- 4.- Usos: Tipo de sustancia y su uso comercial.
- 5.- Toxicología: Valor de la dosis letal media (DL_{50}) y, si forma parte de formulaciones comerciales así como su categoría toxicológica.
- 6.- Formulaciones comerciales: Nombres comerciales y casas suministradoras, así como el porcentaje de producto activo objeto de estudio.
- 7.- Métodos analíticos: Recopilación de todos los métodos de determinación existentes en la bibliografía.

2.1. Generalidades del ácido 2-naftiloxiacético.

2.1.1. Estructura molecular.

El ácido 2-naftiloxiacético, cuya fórmula empírica es $C_{12}H_{10}O_3$ y cuya estructura se observa en la Figura n° B-1, posee un peso molecular de 202'0 g/mol.

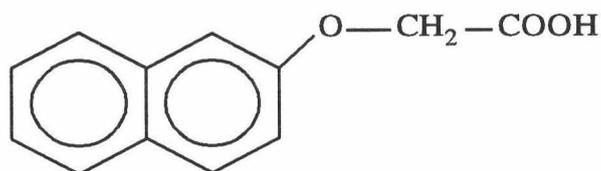


Figura n° B-1.- Estructura del ácido 2-naftiloxiacético.

2.1.2. Nomenclatura e historia.

El nombre químico dado por la IUPAC es el de ácido 2-naftil-oxi-acético. Los nombres de ácido naftiloxiacético y ácido naftoxiacético son aceptados como nombres

comunes y la abreviatura es ANOA. Su introducción comercial se debe a Synchemicals Ltd.

2.1.3. *Propiedades.*

El producto técnico forma cristales verdes. El ácido puro es un sólido cristalino incoloro cuyo punto de fusión es de 156 °C. A temperatura ambiente es ligeramente soluble en agua, soluble en etanol y dietil éter y forma sales solubles en agua con metales alcalinos.

2.1.4. *Usos.*

Son varios los productos químicos que se emplean en diferentes tipos de cultivos como hormonas reguladoras del crecimiento de las plantas, con objeto de promover una maduración temprana de la fruta. Entre estas sustancias, el ANOA ha demostrado ser muy útil para la prevención de la caída prematura de la fruta, así como para promover el crecimiento de las raíces, especialmente en manzanas, uvas, fresas y tomates.

Concretamente, en España se utiliza en tomate y berenjena para inducir la formación de frutos sin semilla y adelantar su maduración. En E.E.U.U., sin embargo, el ANOA se aplica principalmente en fresas y tomates para aumentar el tamaño de los frutos. En España se recomienda su aplicación inmediatamente después de la floración, a las horas de menos calor y con la menor luz posible. Es necesario llegar al interior de la flor sin dañar el resto de la planta, lo que se consigue con boquillas atomizadoras. La dosis normal suele oscilar entre 40-60 mg de componente activo por litro ó 25 ml por litro, en formulaciones líquidas.

2.1.5. *Toxicología.*

El principal objetivo en el análisis de este tipo de sustancias es el control de cultivos agrícolas que van a ser consumidos por el hombre. Dada su baja toxicidad, los niveles de tolerancia de estos compuestos son relativamente altos en las legislaciones de varios países. A pesar de que no son sustancias muy tóxicas, pueden ser peligrosas si se consumen en grandes cantidades. Los niveles de tolerancia, dosis y limitaciones en el uso

del ácido 2-naftiloxiacético han sido publicados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA Compendium of Registered Pesticides, 1968), presentando una LD₅₀ por ingestión oral, en ratas, de 600 mg/Kg.

2.1.6. *Formulaciones comerciales.*

Éstas incluyen: "Tomador-NT" (Inagra), solución acuosa (0'25 % p/v) y "Zeltomata" (Zeltia) que se trata de una solución acuosa conteniendo una mezcla de fitohormonas (0'13 % de ANOA y 0'013 % de ácido 1-clorofenoxipropiónico p/v). Ésta última mezcla está especialmente concebida para favorecer la polinización en tomate y berenjena y obtener frutos más precoces, de mayor peso y elevada calidad.

2.1.7. *Métodos analíticos.*

Los métodos analíticos que se utilizan en la actualidad para el análisis de este tipo de sustancias son muy variados desde bioensayos (Reeve y Crozier, 1980), inmunoensayos (Davis y col., 1985) a métodos de detección que utilizan diversas propiedades físico-químicas. Generalmente son necesarias técnicas de separación previas a la detección por métodos fotométricos (Kannangara y col., 1978), fluorimétricos (Horgan y Neill, 1979; Archer y Stokes, 1988), electroquímicos (Dumbroff y col., 1983) o radioquímicos (Kannangara y col., 1984).

Después de una minuciosa búsqueda bibliográfica sobre los métodos de determinación analítica del ácido 2-naftiloxiacético, se ha encontrado que existen pocos métodos disponibles, estando la mayor parte de ellos basados en medidas de luminiscencia molecular.

El primer método fluorimétrico descrito en la bibliografía para la determinación fluorimétrica de ANOA se debe a Mineczewaski (1956), el cual obtuvo una fluorescencia verde cuando calentaba ANOA con el reactivo de Rosenthaler y Turk (Na₂AsO₃ al 1 % en H₂SO₄). La fluorescencia cambiaba a azul cuando la disolución se hacía alcalina.

El método recomendado para el análisis de ANOA en manzanas y uvas hace uso de una reacción de derivatización (Pease y Gardiner, 1969), que consiste en extraer del

substrato el ANOA con acetato de etilo y el extracto se purifica mediante un proceso de partición líquido-líquido. Después, el compuesto se convierte en 2-aminobenzimidazol, y la determinación final se efectúa mediante medición directa de la fluorescencia.

El ANOA ha sido determinado también en tomates (Davidson, 1970), mediante el siguiente procedimiento. El ANOA se extrajo con acetona, y posteriormente el disolvente fue evaporado. Se trató con disolución acuosa de carbonato sódico y se llevó a cabo una nueva extracción en CHCl_3 en medio ácido, siendo determinado fluorimétricamente en este medio. Los autores describen por primera vez, en este trabajo, las características fluorimétricas del ácido 2-naftiloxiacético en CHCl_3 . Establecen dos máximos de excitación localizados a 282 y 325 nm y dos máximos de emisión a 354 y 680 nm, siendo el más intenso el localizado a 354 nm. La intensidad de fluorescencia del ANOA en CHCl_3 presenta un rango dinámico lineal entre 0'01 y 0'1 $\mu\text{g/ml}$. Las recuperaciones, para una concentración de ANOA de 0'4 $\mu\text{g/ml}$ fueron del 82% al 101 %.

Además, el ANOA ha sido determinado en fresas mediante extracción en acetona, utilizando detección fluorimétrica directa y, por primera vez, sincrónica-derivada combinada con primera y segunda derivadas (García Sánchez y Cruces Blanco, 1988c). Los autores dan unas longitudes de onda de excitación y emisión de 480 y 570 nm, respectivamente y estudiaron los efectos del disolvente en las características espectrales de las disoluciones de ANOA. El límite de detección encontrado en el procedimiento con la primera derivada es de 1'14 ng/ml. Las fresas se fortificaron con diferentes concentraciones de ANOA (de 10 a 90 ng/ml). Las recuperaciones son del 87'2% (rango entre el 80'16 y 98'53%) en el nivel de menor fortificación y del 98'36% (rango entre 97'54 y 99'63%) para el nivel de fortificación más alto.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la fosforimetría convencional a baja temperatura es una técnica analítica que se ha utilizado con menor profusión que la fluorimetría. El hecho de que se necesitaran temperaturas del nitrógeno líquido para la observación de fosforescencia y las dificultades provenientes de la reproducibilidad encontradas, han hecho que hasta hace muy poco tiempo, esta técnica no haya gozado de una gran popularidad.

Sin embargo, entre los grupos de sustancias que han sido estudiadas fosforimétricamente, se encuentran precisamente numerosos plaguicidas. Así, ya en 1965 (Moye y Winefordner, 1965a) estudiaron las características fosforescentes de 32 plaguicidas a baja temperatura (77 K) en disolvente EPA (dietiléter-isopentano-álcohol absoluto, 5:5:2, v/v), etanol absoluto o mezclas etanol-agua como disolventes. Su utilidad analítica quedó demostrada en algunos casos, determinándose varias de estas sustancias en diferentes matrices como alimentos y fluidos biológicos (Moye y Winefordner, 1965b). Chen, estudió asimismo las características fosforescentes de 81 plaguicidas en este mismo disolvente, entre los que se encontraba el ácido 2-naftiloxiacético (ANOA) (Chen, 1974).

El ácido 2-naftiloxiacético ha sido determinado mediante fosforescencia a baja temperatura, utilizando diferentes disolventes. Así, Sanders y Winefordner (1972), en un estudio sobre las características fosforimétricas a 77 K de 17 reguladores del crecimiento de las plantas y utilizando etanol absoluto como disolvente, encuentran que 12 de ellos presentaban emisión fosforescente analíticamente útil. Para el ANOA, localizan el máximo de excitación y emisión a 328 y 497 nm, respectivamente, y calculan que el tiempo de vida de la emisión es de 2'6 segundos. Posteriormente (Aaron y col., 1979), estudiaron las características fosforimétricas, a 77 K, de un amplio grupo de compuestos en etanol:agua (10:90) como disolvente. Establecen tres máximos de excitación a 238, 274 y 313 nm y tres máximos de emisión a 476, 503 y 530 nm, dando un valor de 2'8 segundos para el tiempo de vida media. Los máximos más intensos resultan ser los de 313 nm para la excitación y 503 nm para la emisión. Dichos valores se encuentran próximos a los establecidos anteriormente por estos mismos autores en etanol absoluto. Proponen un método de determinación fosforimétrica de ANOA, con un límite de detección de 0'3 $\mu\text{g/ml}$.

Posteriormente, el ANOA volvió a ser objeto de un estudio fosforimétrico a baja temperatura (77 K), utilizando EPA como disolvente (Trautwein y Guyon, 1983). Se dan máximos de excitación a 282 y 320 nm (siendo este último el más intenso) y de emisión a 474 y 500 nm (el más intenso). De nuevo, los máximos experimentales se encuentran próximos a los ya reseñados en la bibliografía anterior para este compuesto. En este medio, se ha propuesto un método fosforimétrico de determinación de ANOA con un límite de detección de 0'1 $\mu\text{g/ml}$.

A partir de la introducción de la fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) (Roth, 1967), surgió un nuevo interés por los métodos fosforimétricos de análisis. Inicialmente, la RTP era observada en distintos soportes sólidos, de los cuales, el papel de filtro ha resultado ser el más utilizado. Las características fosforescentes de ANOA adsorbido en papel de filtro, en medio etanol:agua (10:90), fueron comparadas con las correspondientes a baja temperatura (Aaron y *col.*, 1979). Los máximos de excitación encontrados se localizan a 238, 284 y 310 nm (el más intenso), mientras que el máximo de emisión se encuentra a 504 nm. La señal de fosforescencia a temperatura ambiente resulta ser menos intensa que a baja temperatura, habiéndose establecido el límite de detección en este medio de 8 $\mu\text{g/ml}$.

En posteriores estudios (Aaron y Winefordner, 1979), utilizaron el mismo soporte sólido para la observación de la RTP pero en presencia de NaI 1M como átomo pesado externo. La presencia de NaI favorece el cruce entre sistemas y permitió observar señales de fosforescencia más intensas de una serie de compuestos. Así, ANOA presentaba máximos de excitación a 278 y 310 nm (más intenso), y máximos de emisión a 499 (más intenso) y 529 nm, y un límite de detección de 0'1 $\mu\text{g/ml}$. Luego, mediante este procedimiento se obtuvieron señales de RTP de similar magnitud a las que se obtienen a baja temperatura. Se observó, asimismo, que el tiempo de vida de fosforescencia era algo menor a temperatura ambiente que a baja temperatura resultando ser del orden de 1'2 segundos.

El hecho de que el tiempo de vida de este compuesto, al igual que el de algunos compuestos de estructura similar como la 1-naftaleneacetamida, ácido 1-naftalenacético, ácido metil naftalenacético, benomil, sal sódica del ácido p-dimetilaminobenceno-diazosulfónico o plantrax, sean tan elevados (superiores a 1 seg), ha sido interpretado como que la fosforescencia se origina a partir de un estado triplete π , π^* (Becker, 1969).

El empleo de la fosforescencia a temperatura ambiente y en disolución es mucho más reciente y, concretamente Muñoz de la Peña y *col.* (1993) desarrollaron un método fosforimétrico para el ANOA, mediante la formación de un complejo de inclusión de la fitohormona con la β -ciclodextrina.

2.2. Generalidades de la α -naftaleneacetamida.

2.2.1. Estructura molecular.

La α -naftaleneacetamida, cuya fórmula molecular es $C_{12}H_{11}NO$ tal y como se observa en la Figura n° B-2, posee un peso molecular de 185'2 g/mol.

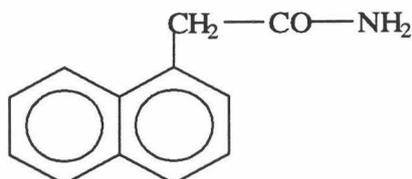


Figura n° B-2.- Estructura de la α -naftalenacetamida.

2.2.2. Nomenclatura e historia.

El nombre químico dado por la IUPAC es 2-(1-naftil)acetamida. El nombre de 1-naftalenacetamida es conocido como nombre común. También es conocida como α -naftalenacetamida, siendo su abreviatura NAD o NAmida. Fue introducida comercialmente por Amchem Products, Inc. (ahora Union Carbide Agricultural Products Co., Inc.).

2.2.3. Propiedades.

Forma cristales incoloros de punto de fusión 184 °C. Es ligeramente soluble en agua, soluble en acetona, etanol, metanol, propanol, dioxano, acetonitrilo y cloroformo e insoluble en queroseno y ciclohexano. Es estable bajo condiciones normales de almacenamiento y no es inflamable.

2.2.4. Usos.

La naftalenacetamida ha sido utilizada durante más de 40 años como regulador del crecimiento de las plantas. La aplicación justo después de la floración, induce el aclarado de la fruta y aplicada 3 ó 4 semanas antes de la recolección, previene la caída de la fruta. Se aplica, principalmente, en la mayoría de las variedades de manzano y peral. A pesar de que la naftalenacetamida causa poco daño en las hojas de los árboles no ha sido usada con mucha frecuencia. El tratamiento debe realizarse a una dosis que oscile entre 2'5-5'0 g de ingrediente activo/100 l, obteniéndose así, una zona de abscisión en el pedúnculo.

2.2.5. Toxicología.

La DL₅₀ oral para ratas es de 6400 mg/Kg y la DL₅₀ percutánea para conejos es mayor de 5000 mg/Kg, no habiéndose observado irritación en la piel o en los ojos.

2.2.6. Formulaciones comerciales.

No existen formulaciones comerciales en España recogidas en el Vademecum de productos fitosanitarios, aunque es utilizado en otros países con el nombre comercial de "Amid-Thin" (Amchem Products, Inc) como un polvo mojable conteniendo 84 g de componente activo por kilogramo de formulación.

2.2.7. Métodos analíticos.

La metodología para los residuos de NAD es poco común y hasta que Sigríst (1974) publicara un trabajo acerca de la determinación conjunta de NAD y ANA en manzanas, los métodos sensibles de análisis de residuos de NAD eran desconocidos. Este método consiste en la aplicación conjunta de NAD y ANA a manzanos para prevenir la caída del fruto justo 4 semanas antes de la recogida. Los residuos máximos encontrados en el total de la fruta empleando detección fluorimétrica, son de 0'05 µg/ml para el NAD y de 12 ng/ml para el ANA. La sensibilidad de la determinación para el NAD y ANA en los extractos de manzana es de 25 y 10 ng/ml, respectivamente, con unos porcentajes de recuperación comprendidos entre 90-103 %.

Otra cuantificación de los residuos de NAD está basada igualmente en las características fluorescentes del compuesto. Así, Cochrane (1980) emplea como técnica separativa la cromatografía líquida de alta resolución y compara la sensibilidad obtenida empleando detección fotométrica y fluorimétrica. Este método es simple, rápido y preciso y obtiene una sensibilidad de 10 ng/ml (método fluorimétrico) y de 100 ng/ml (método fotométrico), con unos porcentajes de recuperación del 83 y 89 %, respectivamente, cuando el método se aplica al análisis de residuos de NAD en manzanos.

La aplicación de la metodología sincrónica derivada a la fluorescencia nativa del NAD permitió el establecimiento de un método de análisis de residuos de esta fitohormona

en manzanas (García Sánchez y Cruces Blanco, 1988d), obteniendo unos límites de detección de 0'6 ng/ml, con unas recuperaciones entre 73-101 %.

2.3. Generalidades del carbaril.

2.3.1. Estructura molecular.

El carbaril, cuya fórmula molecular es $C_{12}H_{11}NO_2$ tal y como se observa en la Figura nº B-3, posee un peso molecular de 201'2 g/mol.

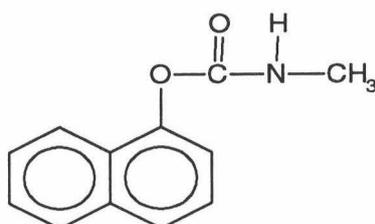


Figura nº B-3.- Estructura del carbaril.

2.3.2. Nomenclatura e historia.

El nombre químico dado por la IUPAC es 1-naftilmetil-carbamato o 1-naftalemil metilcarbamato. El nombre común más aceptado es el de carbaril o carbarilo y su abreviatura CBL. Se vende bajo el nombre comercial de Sevin, pero se emplean también varios sinónimos y nombres comerciales (ver Tabla nº B-1). Es un compuesto orgánico que se utiliza, sobre todo, como insecticida y, en menor grado, como acaricida y molusquicida. Dichas propiedades insecticidas fueron descritas por primera vez por H.L. Haynes y *col.* (1957). El producto comercial Sevin fue introducido por Union Carbide Corporation como "Insecticida Experimental 7744".

Tabla nº B-1.- Sinónimos y nombres comerciales del carbaril¹

Atoxan	N-metil-1-naftilcarbamato
Caprolin	1-naftol N-metilcarbamato
Carpolin	α -naftil-N-metilcarbamato
Compuesto 7744	1-naftil-N-metilcarbamato
Crag Sevin	Panam
Insecticida Experimental 7744	Sevidol
Gamonil	Sevin
N-metil- α -naftilcarbamato	Union Carbide 7744

¹ De la referencia NIOSH, 1976.

2.3.3. Propiedades.

El carbaril es ligeramente soluble en agua (120 mg/ml a 30 °C) y bastante soluble en ciertos disolventes orgánicos polares como la acetona, dimetilformamida, diclorometano dimetilsulfóxido y ciclohexanona. Es ligeramente soluble en hexano, benceno y metanol. El producto del proceso de fabricación del carbaril es un concentrado al 98% de pureza. Su síntesis y caracterización se puede llevar a cabo en tan solo dos horas de trabajo de laboratorio (Thadeo y Mowery, 1984) por reacción entre el metil isocianato y el 1-naftol. La reacción que tiene lugar se indica a continuación en la Figura n° B-4, donde es evidente que la trietilamina convierte el 1-naftol de un nucleófilo débil a fuerte para que el ataque del metil isocianato sea más rápido. Debido a que la amina se genera por transferencia de un protón desde el ión trietilamonio al anión 1-naftil N-metilcarbamato, sólo son necesarias cantidades catalíticas.

Este producto formado es estable por debajo de 70 °C y expuesto a la luz ambiental si se encuentra en medio neutro o alcalino. Sin embargo, se hidroliza en condiciones alcalinas (pH > 9) para formar 1-naftol, dióxido de carbono y metilamina y por tanto, es incompatible con plaguicidas fuertemente alcalinos.

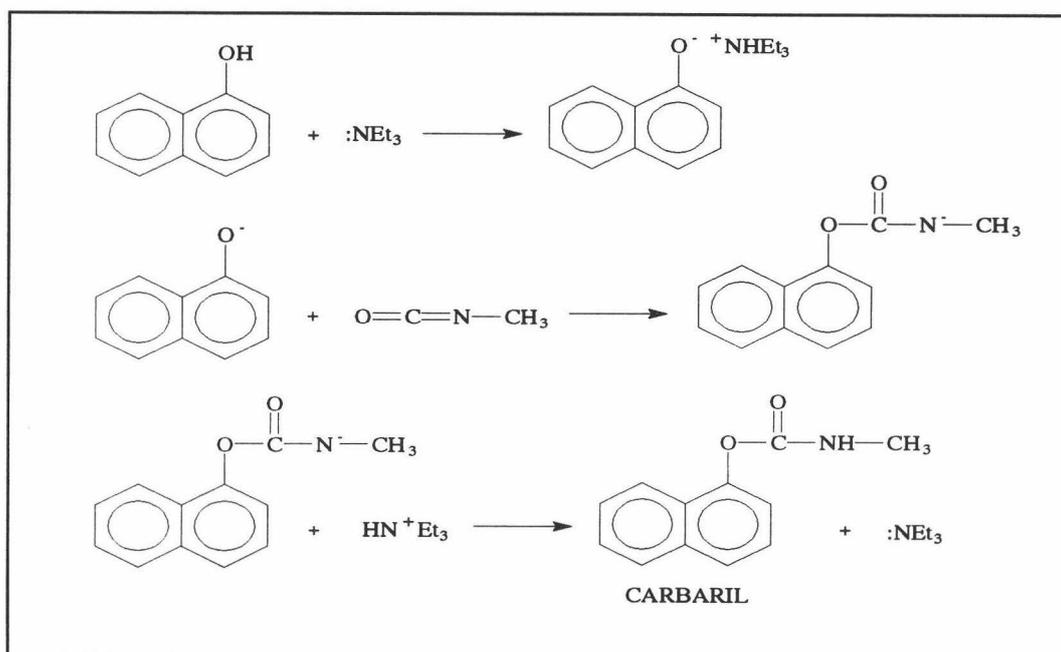


Figura n° B-4.- Reacción de obtención del carbaril.

2.3.4. Usos.

El carbaril es un insecticida de contacto que posee unas propiedades excelentes en lo que se refiere a los residuos que origina. Controla la mayoría de los insectos del algodón y se ha comprobado su efectividad en más de 40 clases diferentes de frutas, verduras y cosechas (EPA, 1980).

A las concentraciones normales de aplicación (0'25-2'0 kg de ingrediente activo por hectárea) no presenta efectos adversos en el crecimiento de las plantas o en el sabor de los alimentos. Cuando se alimentan mamíferos se observa una rápida transformación en 1-naftol, no acumulándose en los tejidos y no excretándose en la leche (OMS, 1982), lo cual permite su uso en cosechas que vayan a ser empleadas para la alimentación de estos animales. En España está recomendado en el control de orugas en frutales, florales y ornamentales, en cítricos y olivo, en la lucha contra el escarabajo de la patata en hortícolas, en los tratamientos frente a gusano verde en alfalfa y en la defensa de la vid frente a polillas, etc... También se usa para reducir el número de frutos en los manzanos muy cargados, pero nunca se debe aplicar antes de transcurridos 20 ó 25 días desde la caída de los pétalos.

Se usa sólo o en combinación con uno o mas insecticidas. Así, las mezclas con lindano potencian la actividad sobre insectos no protegidos por el propio vegetal, tales como orugas defoliadoras y frugívoras en tanto se encuentren al exterior, escarabajo de la patata, pulgones, chinches, trips, mosquito verde y otras plagas en diversos cultivos herbáceos y leñosos.

2.3.5. Toxicología.

La inhibición de la colinesterasa es el mecanismo principal por el que los insecticidas de carbamato, incluido el carbaril, surten efectos tóxicos en los mamíferos. Estos efectos se pueden clasificar de la siguiente forma:

- 1.- Efectos agudos, toxicidad oral: la DL_{50} para las ratas oscila dependiendo de los estudios realizados, entre 500 y 850 mg/kg (Carpenter y col., 1961; Gaines, 1969). Se ha observado que una dosis de carbaril de 60 mg/kg

inhibe el metabolismo de la serotonina en el encéfalo de las ratas (Hassan y Santolucito, 1971).

2.- Efectos agudos, toxicidad por inhalación: el carbaril atmosférico, con una concentración media de 390 mg/m^3 (exposición durante 4 horas) produce irritación nasal y ocular en cobayas; a 75 mg/m^3 (exposición durante 2-5 horas) en perros produce inhibición de la colinesterasa y en gatos expuestos a 80 mg/m^3 durante 6 horas presentan salivación, excitación y dificultades respiratorias (Carpenter y col., 1961).

3.- Efectos crónicos y a largo plazo, toxicidad oral: En estudios de alimentación prolongada con animales (Carpenter y col., 1961) se han registrado las concentraciones siguientes, sin efecto aparente: $8'2 \text{ mg/kg}$ peso corporal en ratas (estudio de 2 años) y $7'2 \text{ mg/kg}$ en perros (estudio de un año). La ingesta diaria aceptable de carbaril recomendada para el hombre por la OMS (1982) es de $0'01 \text{ mg/kg}$ de peso corporal.

4.- Efectos embriotóxicos y teratogénicos: El carbaril administrado a ratas en dosis orales de 100 mg/kg hace disminuir el número de crías que nacen vivas (Weil y col., 1973). Weil y col. (1972) comunicó que de 709 fetos de ratas hembras a las que se había administrado carbaril en dosis hasta 500 mg/kg de peso corporal, no se observaron efectos teratogénicos mediante examen macroscópico o microscópico. De igual forma, la administración oral de carbaril a conejas y hamsters embarazadas en dosis de hasta 250 mg/kg no produjeron efectos teratogénicos ni mortalidad fetal relacionada con la dosis.

5.- Efectos mutagénicos y carcinogénicos: Varios autores no han podido registrar efectos mutagénicos en sistemas bacterianos después de la exposición al carbaril (Elespuru, 1974; Uchiyama, 1975). En estudios realizados por estos autores se indicó que el nitrosocarbaril es un mutágeno potente en dichos sistemas pero no existen datos indicativos de que el carbaril sea transformado en nitrosocarbaril por el organismo humano. La administración durante dos años de dosis de carbaril (16 mg/kg) a ratas no dio lugar a la incidencia de tumores en comparación con animales testigos. Sin embargo, se debe tener presente la posibilidad de que, en presencia de nitritos y en condiciones de ligera acidez, se forme en las ratas el carcinógeno N-nitrosocarbaril (CIIC, 1976).

2.3.6. *Formulaciones comerciales.*

El carbaril viene preparado en forma de polvos humectables, pastillas, gránulos, polvos para aplicación en seco y en disoluciones acuosas o en disolventes orgánicos. Son muy numerosas las formulaciones utilizadas en España. Las formulaciones que contienen únicamente el carbaril poseen una toxicología que requiere un plazo de seguridad de 7 días. En cambio, aquellas en que el carbaril se encuentra en combinación con otros insecticidas para potenciar su actividad tales como el dimetoato, malatión o triclorfón, presentan una toxicidad con un plazo de seguridad que oscila entre 15 y 30 días.

2.3.7. *Aspectos generales de la química del carbaril.*

El conocimiento del comportamiento químico de la sustancia objeto de análisis es de gran importancia, sobre todo si se trata de compuestos de naturaleza orgánica relacionados con procesos biológicos que favorecen vías de degradación y que dan lugar a metabolitos de un comportamiento químico parecido aunque, a veces, de muy diferente actividad farmacológica o biológica. Cuando la propiedad química relacionada con la concentración, utilizada para la estimación de niveles de analito en el medio, es la distribución de la energía absorbida o emitida en el rango espectral de 200-800 nm, entonces cabe señalar dos características principales del comportamiento químico del reactivo en estudio, que van a afectar de modo crítico a su determinación analítica.

La primera de ellas es la posible interacción del analito en un proceso dinámico que lo transforme en otra especie pudiendo ser éste hidrolítico, oxidativo o de otro tipo. En este caso es importante conocer los aspectos cinéticos relacionados con este proceso, para controlarlos y utilizarlos adecuadamente en beneficio de la fiabilidad del análisis.

La segunda característica química que se necesita conocer y controlar es el efecto del pH sobre su comportamiento espectral. Lo más frecuente es que en el analito de carácter orgánico, existan uno o varios grupos funcionales que le confieran carácter ácido-base. De ahí que se produzcan participaciones en procesos prototrópicos que, normalmente, involucran transformaciones más o menos profundas de las correspondientes especies neutras o cargadas, según el grado de participación del grupo activo en las reorganizaciones electrónicas de la molécula total.

Cuando los datos espectrales son absorciométricos, un conocimiento preciso de la distribución de especies en función del pH y, en consecuencia, de las constantes de disociación ácida en el estado fundamental del compuesto, es suficiente para diseñar un método analítico que evite los problemas de la acidez del medio. Sin embargo, cuando se utiliza con fines analíticos el espectro de fluorescencia o fosforescencia, es esencial tomar una precaución adicional pues ahora los prototropismos desde el estado excitado pueden cambiar radicalmente las características del método analítico tales como sensibilidad, selectividad, precisión y exactitud. Hay que destacar que puede haber grandes diferencias en el espectro de emisión y rendimientos cuánticos de ambas especies, disociada y no disociada, y que se puede acceder a ellos mediante dos vías diferentes, siempre que la cinética del estado excitado sea comparable con la del equilibrio disociativo. Por esta razón, en los métodos luminiscentes de análisis es aún más importante conocer y controlar el pH (Argauer y Bontoyan, 1970; Argauer y Warthen, 1975; Cruces Blanco y García Sánchez, 1988).

En el análisis fluorimétrico o fosforimétrico de carbaril tienen lugar las dos circunstancias indicadas anteriormente porque, por una parte, el carbaril sufre un proceso de hidrólisis que le transforma en 1-naftol en un tiempo relativamente corto (10 - 100 minutos) que depende esencialmente del pH del medio; y, por otro lado, la cinética de relajación del estado singlete excitado es suficientemente lenta como para permitir que tenga lugar, durante el estado excitado la disociación prototrópica del reactivo 1-naftol. En el siguiente esquema (Figura nº B-5) se ilustra, de forma concisa, el comportamiento químico fundamental del carbaril y su metabolito:

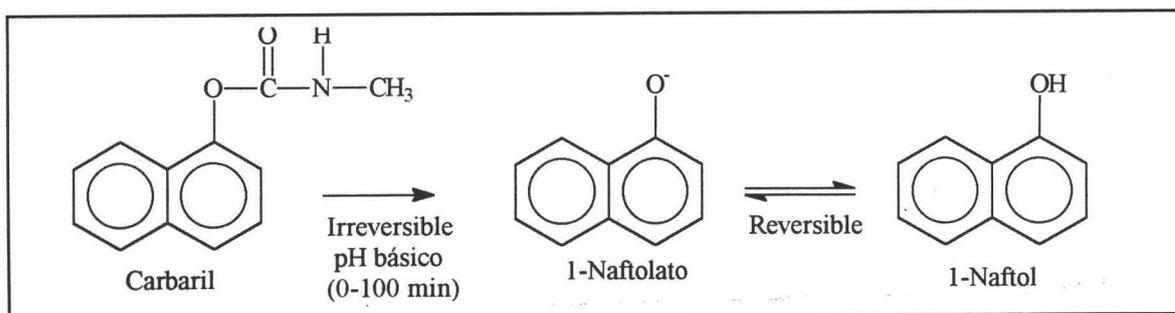


Figura nº B-5.- Equilibrio de descomposición en medio básico de carbaril.

2.3.8. Métodos analíticos.

El carbaril es uno de los plaguicidas más ampliamente usados hoy día en el mundo debido a su amplia efectividad contra gran número de insectos, además de su baja toxicidad. Por todo ello, existen numerosos métodos de determinación en la literatura, tanto del carbaril como de su principal metabolito, el 1-naftol.

Entre las numerosas técnicas empleadas para la identificación o análisis cuantitativo del carbaril, la fluorimetría ha atraído gran porcentaje de esta investigación, debido a la fluorescencia nativa que presenta el carbaril y el 1-naftol (Yoshida y *col.*, 1989). En otras ocasiones se han utilizado distintos tipos de agentes micelares (Sancenon y *col.*, 1989 y 1990) o técnicas instrumentales como la fluorimetría sincrónica-derivada (García Sánchez y Cruces Blanco, 1990) o la fluorimetría de ángulo variable (García Sánchez y *col.*, 1990)

Debido a la complejidad que muchas veces presentan las muestras a determinar, en la mayoría de los procedimientos, la detección fluorimétrica va acompañada de una técnica separativa tal como la cromatografía en capa fina (Chiba y Morley, 1964; Ernst y *col.*, 1975), cromatografía de gases (Argauer y *col.*, 1970; Wueest y Meier, 1983) o la cromatografía líquida de alta resolución (Argauer y Warthem, 1975; Krause, 1978; Lawrence y Leduc, 1978a; Krause, 1979; Krause, 1980; Deberardinis y Wargin, 1982; Jones y *col.*, 1982; Krause, 1983; Spittler y *col.*, 1986; Bagheri y Creaser, 1991).

En algunas ocasiones, para mejorar la sensibilidad de la detección en las distintas técnicas cromatográficas, el carbaril es sometido a reacciones de derivatización (Lawrence y Leduc, 1978b; She y *col.*, 1984). Sin embargo, el análisis directo es preferible a la derivatización, en aquellos casos en que sea posible, ya que supone un ahorro de tiempo y manipulación de muestra, disminuyendo el error asociado a la formación del producto.

Ha existido siempre gran interés por determinar conjuntamente el carbaril y su metabolito, el 1-naftol cuando están presentes en el mismo medio. Así, Argauer y *col.* (1970) observó que la intensidad de fluorescencia del 1-naftol era superior a la del carbaril en pH alcalino o neutro, en hexano y metanol. Posteriormente, Larkin y Day (1979) pudieron determinar simultáneamente ambos compuestos en un medio metanol/agua (10:90 v/v) utilizando la diferencia de longitudes de onda máximas en los espectros de

fluorescencia. En este caso se observó que la intensidad de fluorescencia relativa del carbaril era mayor que la del 1-naftol, lo que impulsa a la determinación espectrofluorimétrica del carbaril en disolución acuosa neutra, de una forma más sensible.

Inmediatamente después de la introducción en el mercado de este insecticida en 1957 surgieron métodos de determinación basados en reacciones colorimétricas con distintos reactivos tales como la aminoantipirina (UCC, 1957), el fluoborato p-nitrobenzenodiazonio (Miskus y *col.*, 1959) o el $K_3Fe(CN)_6$ en medio básico (Padalikar y *col.*, 1988). Posteriormente, y debido a que los compuestos intensamente fluorescentes son también compuestos que absorben fuertemente en el ultravioleta, la detección fotométrica ha seguido utilizándose como una alternativa a la fluorescencia (Benson y Finocchiaro, 1965; McDermott, 1970; Colvin y *col.*, 1974; Rangaswamy y Majumder, 1974; Sparacino y Hines, 1976; Hargreaves y Melksham, 1983; Appaiah y *col.*, 1983; Sastry y *col.*, 1986; Sastry y *col.*, 1987; Yañez-Sedeno y *col.*, 1988; Raju y Gupta, 1989; Salvador y *col.*, 1990; Raju y *col.*, 1992). Estos métodos compiten en rapidez y sensibilidad en aquellos casos en que no se disponga de detectores fluorescentes. Bezuidenhout y Van Dyk (1981) compararon los métodos cromatográficos y fotométricos de determinación del CBL, resultando mejores los fotométricos.

En España, en la relación de métodos oficiales (B.O.E., 1977) de análisis de productos fitosanitarios y fertilizantes, el método propuesto para la determinación de carbaril está basado en la transformación de éste en metilamina por calefacción en medio alcalino, que arrastrada por una corriente de nitrógeno, se recoge sobre una disolución de ácido bórico y se valora con ácido clorhídrico. Este método es lento, poco sensible y está sujeto a considerables inconvenientes en las diferentes etapas del procedimiento operatorio, por lo que es necesario encontrar métodos más operativos.

En el caso del carbaril se ha observado en la literatura la importancia no sólo de los métodos analíticos de determinación de residuos del insecticida en numerosas cosechas (Chaput, 1988; Gupta y Singh, 1987; Bushway, 1988; Raju y Gupta, 1989) sino la importancia en cuanto al análisis del producto comercial (Argauer y Warthen, 1975) y de sus formulaciones comerciales (Argauer y *col.*, 1970; McDermott y Duvall, 1970; Colvin y *col.*, 1974; Weyer, 1974, McDermott, 1980; García Sánchez y Cruces Blanco, 1990).

Esto se debe a que la calidad del producto depende de la pureza del precursor, el 1-naftol que si va acompañado de 2-naftol da lugar al isómero 2-naftilmetilcarbamato que es altamente tóxico. De nuevo en este caso la espectrofluorimetría (Argauer y Warthen, 1975) permite determinar 1- y 2-naftol en mezclas en una proporción 500:1, usándola en combinación con la CLAR. García Sánchez y Cruces Blanco (1987), utilizaron la espectrofotometría derivada para estudiar conjuntamente ambos analitos.

Zweig y Harvey (1982) recomiendan el método de McDermott (1980) para el análisis de carbaril en formulaciones comerciales, el de Lawrence y Leduc (1978a) para el análisis en alimentos y el de Pieper (1979) para cosechas, agua y suelo, tratándose, en todos los casos, de métodos que emplean como técnica separativa la CLAR y detección fotométrica a 254, 264 y 280 nm, respectivamente.

Existen en la bibliografía también métodos de análisis del carbaril, en los que se aplica la determinación fosforimétrica. De Lima y *col.* (1986) estudiaron el efecto de distintos agentes micelares que contenían distintos átomos pesados en la fosforescencia a temperatura ambiente el carbaril, realizando la experiencia en soportes de papel de filtro, al igual que Campiglia y De Lima (1987).

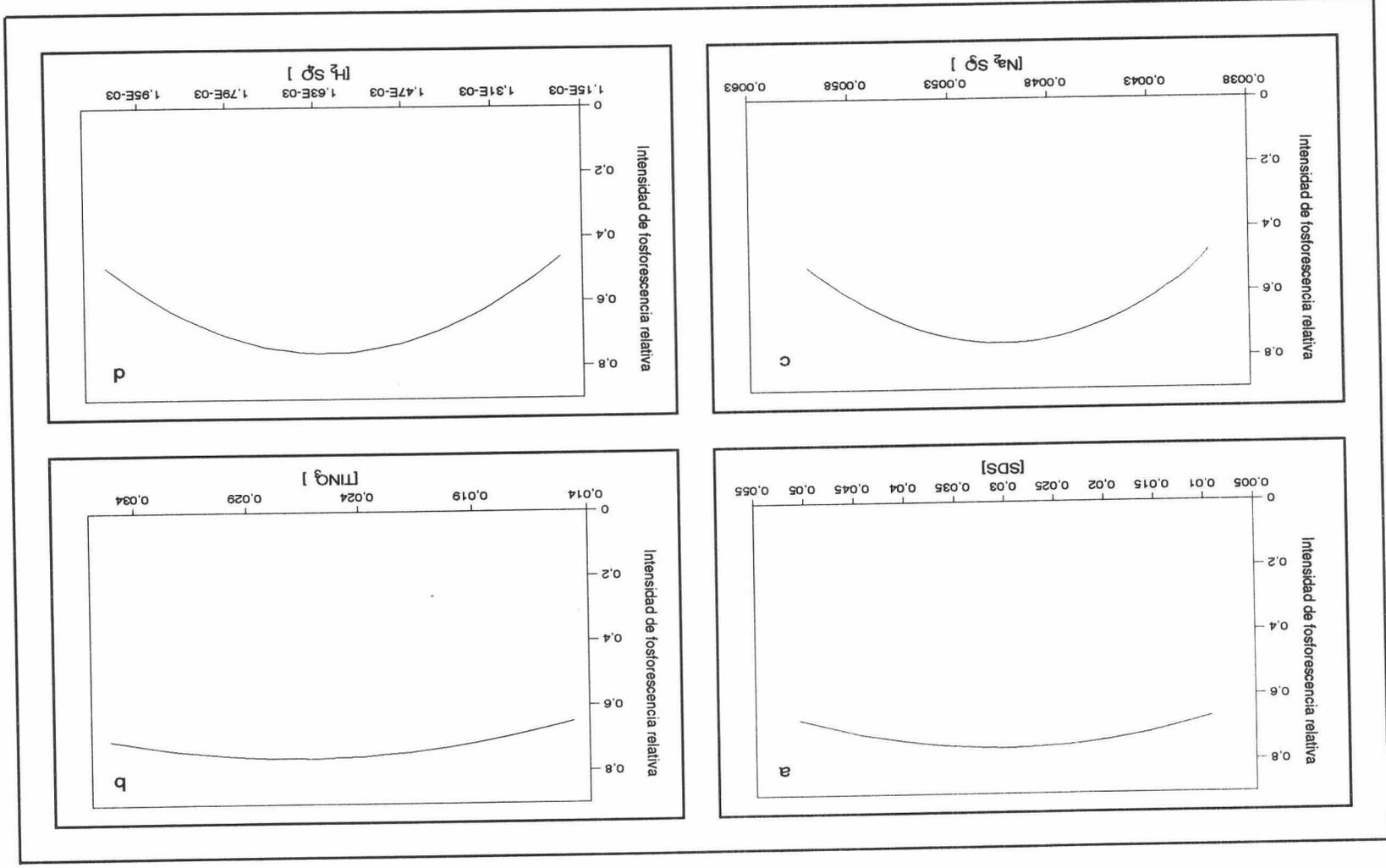
En resumen, los métodos más numerosos de determinación del carbaril son métodos basados en detección fotométrica y fluorimétrica, presentando ambos ventajas por ser métodos sencillos, rápidos y sensibles, características necesarias para una determinación de un plaguicida a niveles de trazas. Para una mejor comparación de los métodos citados se hace una ordenación cronológica de los mismos indicando el límite de detección o el último punto de la recta de regresión (ver Tabla nº B-2).

Tabla nº B-2 .- Métodos analíticos del carbaril

Colorimétrico	5 µg	Miskus y <i>col.</i> , (1959)
CCF-colorimétrico	0'02 µg/ml	Chiba y Morley, (1964)
Colorimetría	0'12 µg/ml	Benson y Finocchiaro, (1965)
CG-fluorescencia	0'05 µg/ml	Argauer y Bontoyan, (1970)
Fluorescencia	0'1 µg/ml	Argauer y <i>col.</i> , (1970)
Colorimetría	-	McDermott y Duvall, (1970)
Fluorimetría	0'2 µg/ml	Ott y <i>col.</i> , (1971)
Colorimetría	0'2 µg/ml	Rangaswamy y Majumder, (1974)

CGL-ionización de llama	50 µg/ml	Weyer, (1974)
Fotometría	-	Colvin y col., (1974)
CLAR-fluorimetría	-	Argauer y Warthen, (1975)
CCP-captura electrónica	0'05 µg/ml	Ernst y col., (1975)
CLAR-fotometría	-	Sparacino y Hines, (1976)
CG-captura electrónica	25 ng/ml	Nagasawa y col., (1977)
CLAR-fluorescencia	26 ng	Krause, (1978)
CLAR-fluorescencia	30 ng/ml	Lawrence y Leduc, (1978a)
CLAR-fluorescencia	10 ng/ml	Krause (1979)
Fluorimetría	0'2 µg/ml	Larkin y Day, (1979)
CLAR-fotometría	0'1 µg/ml	Pieper, (1979)
CLAR-fotometría	-	McDermott, (1980)
CLAR-fluorimetría	0'05 µg/ml	Krause, (1980)
CG-captura electrónica	0'5 µg/ml	Albi, (1981)
CLAR-electroquímico	3'8 ng/ml	Bushway, (1981)
Fluorescencia	4'0 µg/ml	Aaron y Some, (1982)
CLAR-fluorimétrico	40 ng/ml	Deberardinis y Wargin, (1982)
CLAR-fotometría	-	Jones y col., (1982)
Fotometría	0'3 µg/ml	Appaiah y col., (1983)
Fluorimetría	0'2 µg/ml	Román Ceba y col., (1983)
CLAR-fotometría	0'1 mg/kg	Hargreaves y Melksham, (1983)
CLAR-fluorimetría	0'02 µg/ml	Krause, (1983)
CG-detección termométrica	5 ng/ml	Wueest y Meier, (1983)
CL-fluorimetría	-	She y col., (1984)
Fosforimetría	1 ng	Vanelli y Schulman, (1984)
CL-fluorimetría	0'05 µg/ml	Krause (1985)
Fotométrico	12 µg/ml	Sastry y col. (1986)
CLAR-fluorimétrico	0'15 µg/ml	Spittler y col. (1986)
CLAR-detector N-P	0'1 ng/ml	Nakamoto y Page, (1986)
Fosforimétrico	-	De Lima y col., (1986)
Fotométrico	-	Sastry y col., (1987)
Colorimétrico	-	Gupta y Singh, (1987)
Fotométrico	0'2 µg/ml	García Sánchez y Cruces Blanco, (1987)
CLAR-fotométrico	0'05 µg/ml	Kawai, (1987)
Cromatografía de exclusión	-	Roos y col., (1987)
Fosforimétrico	0'18 ng	Campiglia y De Lima, (1987)
CLAR-fotométrico	70 µg/ml	Bushway y col., (1988)
CLAR-electroquímico	1'5 ng/ml	Kawai y col., (1988)
Colorimétrico	-	Padalikar y col., (1988)
Fotométrico	0'08 µg/ml	Yañez-Sedeno y col., (1988)
CLAR-fotométrico	0'05 mg/Kg	Brayan y col., (1988)
CLAR-electroquímico	10 ng/ml	Krause, (1988)
AIF-fotométrico	-	Quintero y col., (1988)
Valoración-micro Kjeldahl	-	Khan, (1988)
Cromatografía por capilares de fluido		

Figura n° V-5.- Variación de la intensidad de fosforescencia con la [SDS] (a), $[TiNO_3]$ (b), $[Na_2SO_3]$ (c) y la $[H_2SO_4]$ (d) sin microemulsiones. $[ANOA]$ 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas exc/em 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

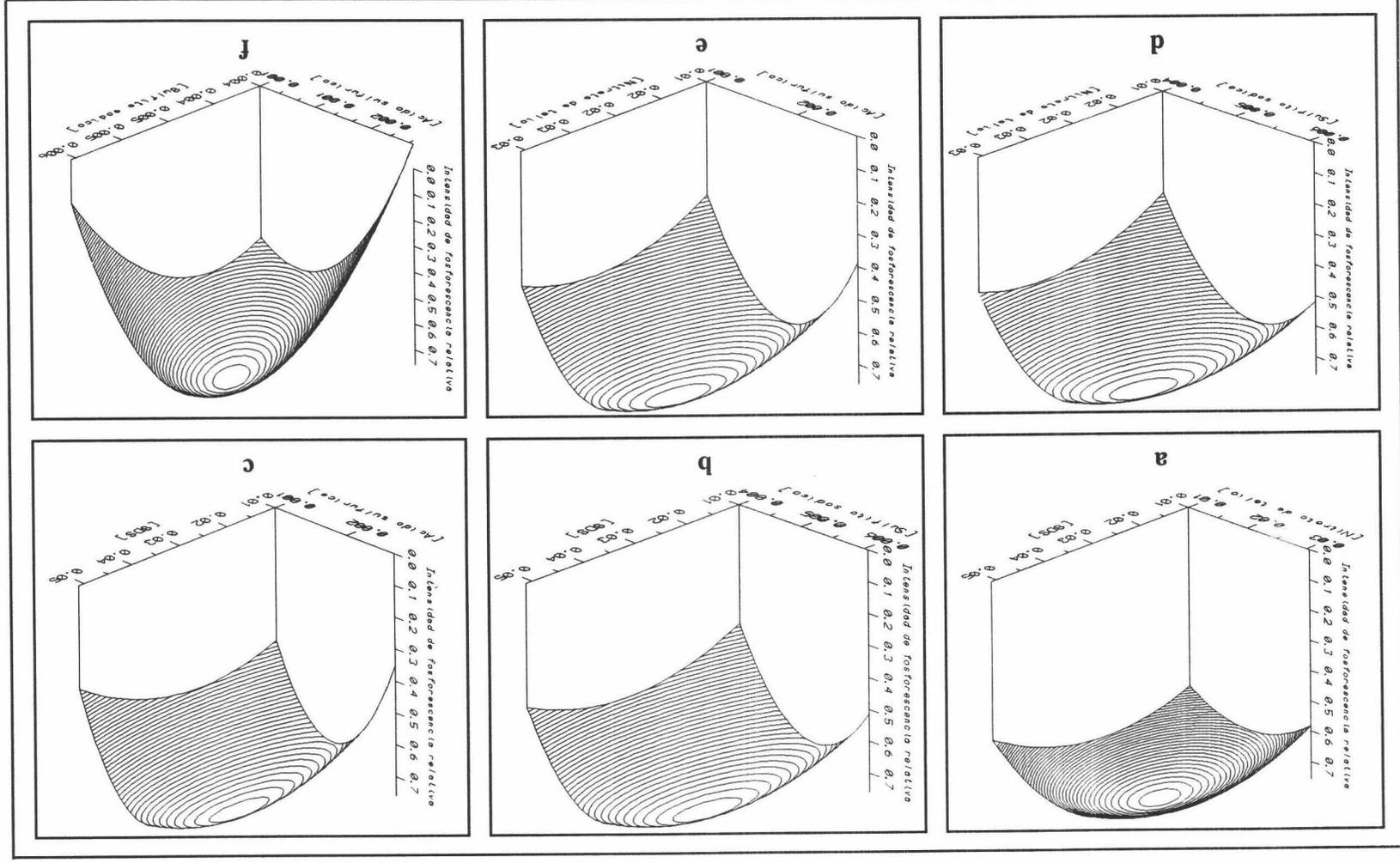


supercrítico-fotométrico	3'8 ng	France y Voorhees, (1988)
AIF-fotométrico	-	Quintero y col., (1989)
CLAR-fotométrico	0'45 ng	Zhang y col., (1989)
CLAR-fotométrico	8'5 µg/Kg	Pang y Wang, (1989)
CLAR-fotométrico	Nivel ng/ml	Lin y col., (1989)
Fluorimetría	0'01 µg/ml	Yoshida y col., (1989)
Fotometría	0'05 µg/ml	Raju y Gupta, (1989)
Fluorimétrico	1'4 ng/ml	Sancenon y col., (1989)
Enzimático	0'1 µg/l	Galgani y Bocquene, (1989)
Espectrometría de masas	0'5 µg/ml	Susuki y col., (1990)
Extracción en fase sólida	1 ng/ml	Brooks y col., (1990)
CLAR-fotométrico	0'02 µg/l	Marvin y col., (1990a)
CLAR-fluorimétrico	0'1 µg/l	Yasuda y col., (1990)
CLAR-fotométrico	460 pg/ml	Marvin y col., (1990c)
Fluorimétrico	0'9 ng/ml	García Sánchez y Cruces Blanco, (1990)
CLAR-fotométrico	Nivel ng/ml	Marvin y col., (1990b)
Detector de captura electrónica	0'05 µg/ml	Mattern y col., (1990)
Fluorimétrico	0'2 ng/ml	Sancenon y col., (1990)
Fluorimetría de ángulo variable	51 ng/ml	García Sánchez y col., (1990)
Colorimétrico	-	Rathore y Saxena, (1990)
CLAR-fotométrico	0'5 ng/ml	Strait y col., (1991)
CLAR	70 µg	Rathore y col., (1991)
Fluorimétrico	6 ng/ml	Ayala y col., (1991)
Enzimático	4'3 ng/ml	Quintero y col., (1991)
AIF-fotométrico	0'1 µg/ml	Fernández-Band y col., (1991)
CG-detección N-P	0'03 mg/Kg	Kendrick y col., (1991)
Fotometría	4 ng/ml	Salvador y col., (1990)
CCF	1 µg	Mali y col., (1990)
CLAR-fluorimétrica	2'5 ng	Bagheri y Creaser, (1991)
Extr. en fase sólida-fotométrico	-	Beyers y col., (1991)
CLAR-fotométrico	-	Raju, (1991)
Fotométrico	0'8 µg/ml	Espinosa-Mansilla y col., (1992)
CLAR	0'11 µg/l	Murino y col., (1991)
CLAR- detector N-P	0'05 µg/ml	Kim y col., (1991)
CLAR	-	Brayan y col., (1992)
CLAR-fotométrico	5 ng/ml	Tena y col., (1992)
Electroquímico	0'2 µg/ml	Kumaran y Tran-Minh, (1992)
CLAR-fotométrico	89 µg/ml	Gazda y col., (1992)
Fotométrico	-	Raju y col., (1992)
CLAR	-	Rathore y Sharma, (1992)
CLAR-fotométrico	-	Driss y col., (1993)
CLAR-fosforimetría	0'02 µg/ml	Massey y col., (1995)
Fosforimétrico	0'04 µg/ml	Yansheng y col., (1995)

Capítulo V

Determinación fosforimétrica del Ácido β -Naftiloxiacético

Figura n° V-7.- Variación de la intensidad de fosforescencia con [SDS] y [TNO₃] (a), [SDS] y [Na₂SO₃] (b), [SDS] y [H₂SO₄] (c), [TNO₃] y [Na₂SO₃] (d), [TNO₃] y [H₂SO₄] (e) y [Na₂SO₃] y [H₂SO₄] (f). [ANOA] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas exc/em 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.



1. Características espectroscópicas.

1.1. Características fluorescentes.

Se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente utilizando una disolución $2'48 \cdot 10^{-6}$ M en ANOA y $1'6 \cdot 10^{-5}$ M en TX-100. Se siguió la metodología que se describe a continuación: *Se fijó el monocromador de excitación a 280 nm, con rendijas de excitación y emisión de 4 nm, la sensibilidad en 590 V y la velocidad de barrido de los monocromadores en 8 nm/s. Se registró el espectro de emisión que presenta un máximo a 346 nm. Fijada la longitud de onda de este máximo en el monocromador de emisión, se registró el espectro de excitación en las mismas condiciones instrumentales, obteniendo varios máximos de excitación a 282 y 326 nm, siendo el primero más intenso, eligiendo, por tanto, 282 y 346 como longitudes de onda de excitación y emisión fluorescentes del ANOA.* Dichos espectros se encuentran representados en la Figura nº V-1.

1.2. Características fosforescentes.

Se procedió de igual forma al establecimiento de los espectros de excitación y emisión fosforescentes del ANOA en presencia de TX-100, TlNO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 . El procedimiento utilizado para la obtención de las características fosforescentes fue el siguiente: *Se preparó una disolución madre $4'95 \cdot 10^{-4}$ M de ANOA disolviendo 2'5 mg en 25 ml de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M; a una alícuota de 50 μl de disolución madre se le añadió 800 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 3000 μl de TlNO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, teniendo una concentración final de ANOA de $2'5 \cdot 10^{-6}$ M. Se fijó la longitud de onda de excitación en 282 nm y se registró el espectro de emisión con una velocidad de barrido de los monocromadores de 2 nm/s, la sensibilidad del detector en 1100 V, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm respectivamente, un tiempo de decaimiento de 100 μs y un tiempo de integración de 500 μs , obteniendo dos máximos a 500 y 540 nm, siendo el primero más intenso. Fijando este máximo de emisión en el monocromador respectivo, siempre en las mismas condiciones instrumentales, se registró el espectro de excitación obteniendo dos máximos a 282 y 326 nm.* El espectro de fosforescencia obtenido en estas condiciones se presenta en la Figura nº V-2.

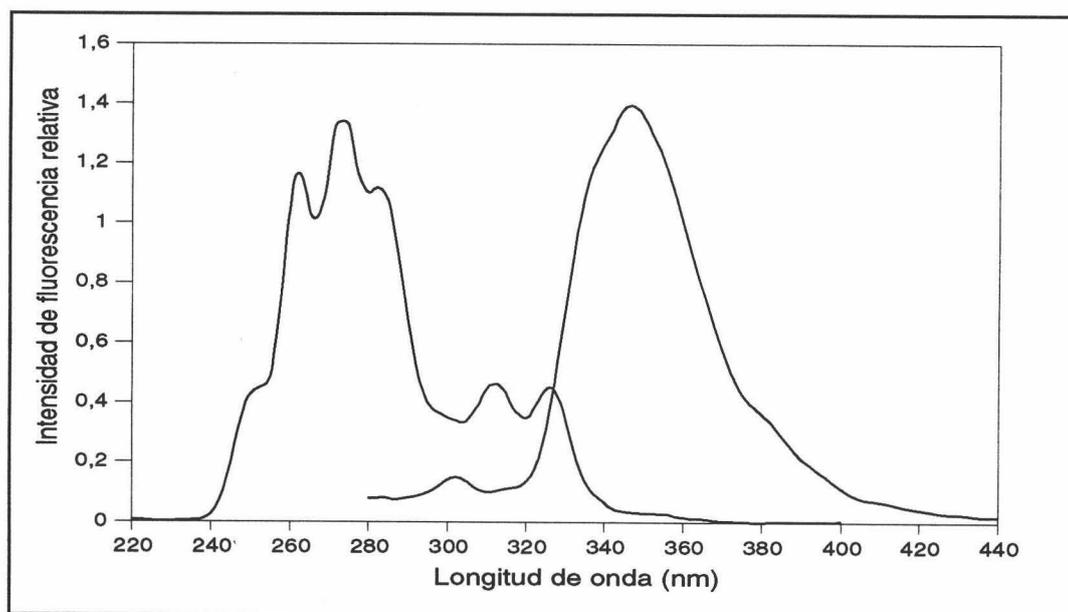


Figura n° V-1.- *Espectros de excitación y emisión de fluorescencia. [ANOA] 500 ng/ml y [TX-100] $1'6 \cdot 10^{-5}$ M.*

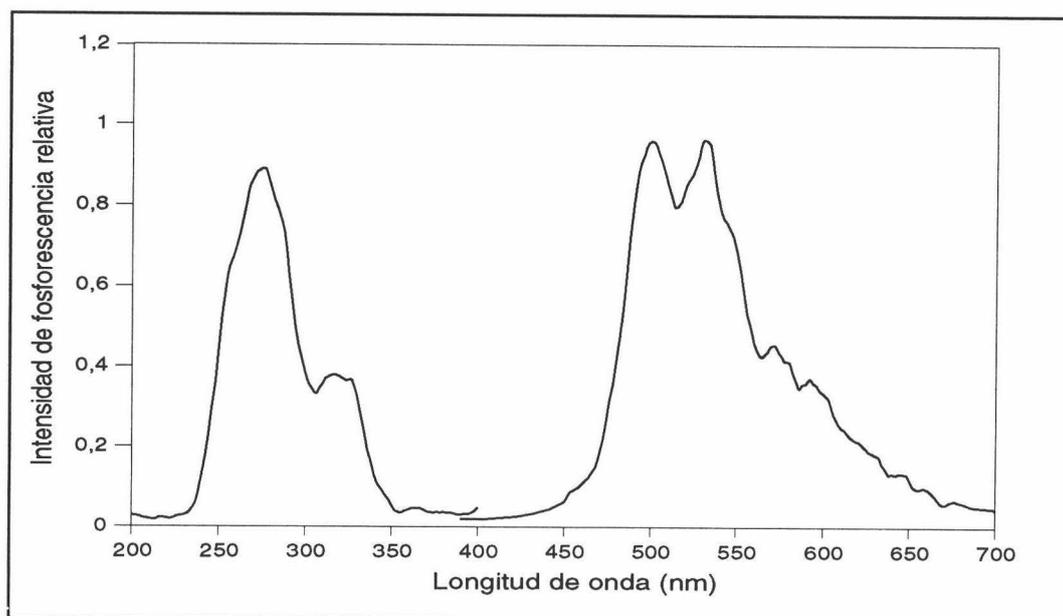


Figura n° V-2.- *Espectros de excitación y emisión fosforescentes. [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'6 \cdot 10^{-5}$ M, [TlNO₃] $7'5 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'0 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'6 \cdot 10^{-3}$ M.*

Luego, las longitudes de onda fosforescentes de medida para el resto del trabajo experimental fueron:

$$\lambda_{\text{exc}}: 282 \text{ nm y } \lambda_{\text{em}}: 500 \text{ nm}$$

Para una mejor observación de la emisión fosforescente se ha registrado el espectro de fosforescencia total del ANOA. A una muestra preparada de la forma anteriormente descrita, se le ha registrado el espectro de fosforescencia total en las siguientes condiciones experimentales: *Emisión entre 400 y 750 nm, excitación entre 230 y 350 nm, con una velocidad de barrido de 4 nm/s y un paso de monocromador de 2 nm y 4 nm para el de emisión y excitación respectivamente, una sensibilidad de 1100 V, un tiempo de decaimiento de 100 μs y un tiempo de integración de 500 μs .* El espectro de fosforescencia total obtenido en estas condiciones, junto con su respectivo mapa de contorno se encuentra representado en la Figura n° V-3.

1.2.1. Curva de decaimiento.

Para un mayor conocimiento de las características fosforescentes del ANOA, se procedió al registro de la curva de decaimiento de la emisión fosforescente. Para ello, a una alícuota de 50 μl de disolución madre $4'95 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ se le añadió 800 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, 3000 μl de TlNO_3 $0'25 \text{ M}$, 500 μl de Na_2SO_3 $0'1 \text{ M}$ y 800 μl de H_2SO_4 $0'02 \text{ M}$, enrasando hasta 10 ml con agua destilada, teniendo una concentración final de ANOA de $2'5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. La curva de decaimiento se registró a $\lambda_{\text{exc/em}}$ de 282/500 nm, rendijas $_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, entre 0 a 2000 μs , con una resolución de 50 μs , 100 repeticiones y sensibilidad 1100 V. La representación gráfica se presenta en la Figura n° V-4.

El ajuste de dicha curva de decaimiento a una exponencial, llevado a cabo por el propio programa del espectrofosfórimetro conduce al cálculo del parámetro vida media, para el ANOA en este tipo de sistemas, siendo el valor calculado de:

$$\text{Vida media: } 450 \mu\text{s}$$

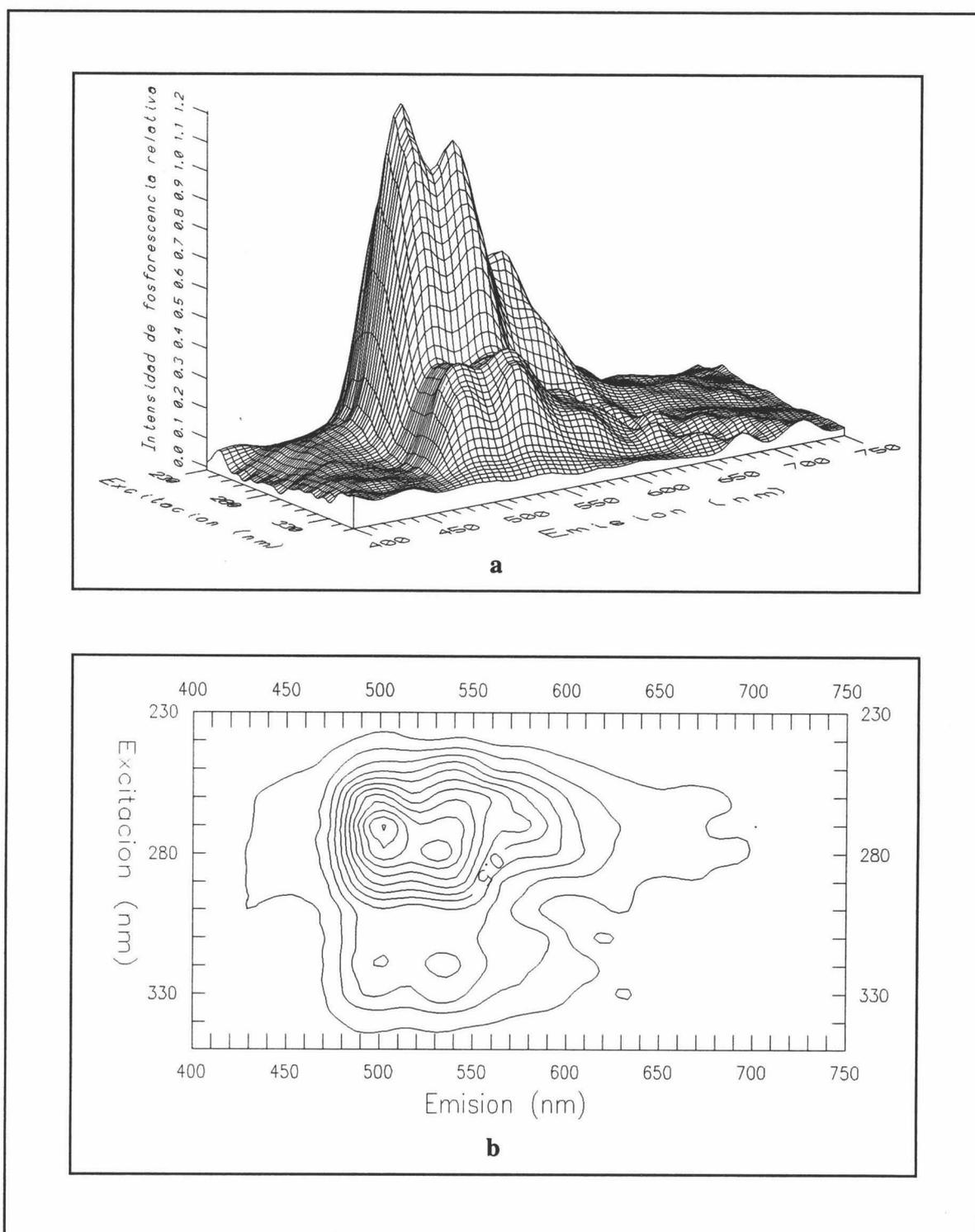


Figura nº V-3.- Espectro de fosforescencia total (a) y mapa de contorno (b). [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'6 \cdot 10^{-5}$ M, [TiNO₃] $7'5 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'0 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'6 \cdot 10^{-3}$ M.

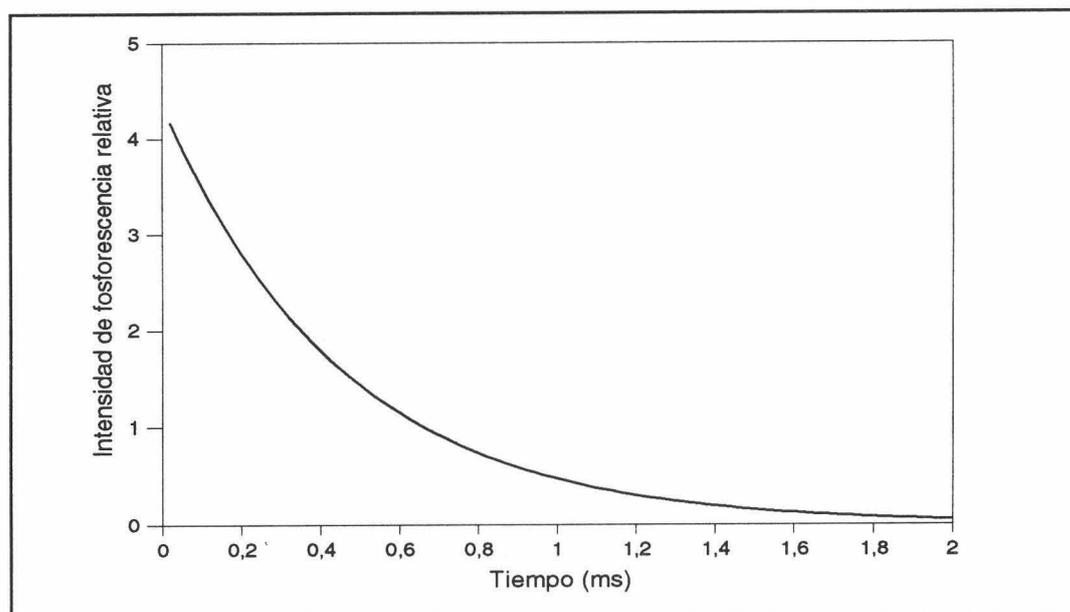


Figura nº V-4. *Curva de decaimiento.* [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'6 \cdot 10^{-5}$ M, [TINO₃] $7'5 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'0 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'6 \cdot 10^{-3}$ M.

2. Selección de variables experimentales.

2.1. Optimización conjunta de agente micelar, TINO₃, Na₂SO₃ y H₂SO₄.

Cuando no es estrictamente necesaria la utilización de las microemulsiones, son varios los medios micelares aplicables a un determinado analito con cierto carácter polar. Así, para el caso del ANOA, existen varias posibilidades para el desarrollo de un método fosforimétrico, relacionadas con la utilización de uno u otro agente micelar en presencia de TINO₃, Na₂SO₃ y H₂SO₄. Los distintos sistemas posibles son:

- a) Sistema: ANOA - SDS - TINO₃ - Na₂SO₃ (con y sin microemulsiones)
- b) Sistema: ANOA - TX-100 - TINO₃ - Na₂SO₃
- c) Sistema: ANOA - Brij-35 - TINO₃ - Na₂SO₃

En el transcurso de este apartado se optimizarán individualmente cada una de estas cuatro posibilidades, comparando posteriormente los resultados alcanzados y eligiendo una de ellas, como la metodología óptima para el desarrollo del método espectrofotométrico para el ANOA.

a) *Sistema ANOA - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄ (con y sin microemulsiones).*

En este apartado, se estudiará el sistema ANOA - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄ en presencia y ausencia de microemulsiones. La optimización de las variables experimentales que influyen sobre la intensidad de fosforescencia, se llevó a cabo mediante la utilización de un diseño compuesto hipercúbico estrellado. El óptimo experimental, en este sistema, no es muy diferente al de los analitos estudiados en los capítulos anteriores, por lo que se empleó el mismo diseño que se ha estado utilizando. Para ello, se prepararon dos series de muestras según los siguientes procedimientos:

- Serie 1: *A una alícuota de 50 µl de disolución madre de ANOA 4'95·10⁻⁴ M en SDS 0'5 M se le adicionaron volúmenes variables de SDS 0'5 M, TlNO₃ 0'25 M, Na₂SO₃ 0'1 M y H₂SO₄ 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta un volumen final de 10 ml.*
- Serie 2: *A una alícuota de 50 µl de disolución madre de ANOA 4'95·10⁻⁴ M en microemulsión de n-heptano/1-butanol al 1 % en SDS 0'5 M se le adicionaron volúmenes variables de SDS 0'5 M, TlNO₃ 0'25 M, Na₂SO₃ 0'1 M y H₂SO₄ 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta un volumen final de 10 ml.*

Se colocaron 1'5 ml de muestra en la cubeta de medida y se registró la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, t_{alg} 100/500 µs, m.p.f. 5 ms y sensibilidad del detector 1100 V.

La matriz del diseño experimental utilizado para ambas series de muestras, junto con las intensidades de fosforescencia alcanzadas y el pH de las disoluciones preparadas se muestran en la Tabla n° V-1.

Los resultados alcanzados con la aplicación del diseño para el analito ANOA utilizando el agente micelar SDS sin y con microemulsiones son parecidos. Al observar las tablas del análisis de la varianza para este sistema sin y con microemulsiones (Tabla n° V-2 y V-3, respectivamente), se comprueba que, en ambos casos, la intensidad de fosforescencia depende de forma cuadrática con las concentraciones de TlNO₃, Na₂SO₃ y H₂SO₄ en el rango experimental que comprende el diseño. En el caso de la utilización de

microemulsiones ninguno de los coeficientes correspondientes a la concentración de SDS es significativo por lo que se concluye que la intensidad de fosforescencia no depende de ésta en el rango de concentraciones comprendido en el diseño. El único término cruzado significativo, en ambos casos, relaciona las concentraciones de Na_2SO_3 y H_2SO_4 .

En cuanto al ajuste del modelo de segundo grado propuesto es aceptable para los dos casos estudiados, tal y como se deduce del valor del nivel de significación del fallo de ajuste en los análisis de la varianza correspondientes. El coeficiente de determinación para ambos casos, sin y con microemulsiones, vale 0'8866 y 0'8665, respectivamente.

Las valoraciones de los diseños desarrollados anteriormente, es decir, el cálculo de los coeficientes del polinomio de cuatro variables al cual se ajusta el sistema, las coordenadas del óptimo para los cuatro factores experimentales y los signos que adquieren los distintos hessianos calculados, se presentan en las Tablas nº V-4 y V-5. Dichas valoraciones ofrecen la posibilidad de conocer la variación de la intensidad de fosforescencia con cada una de las variables optimizadas. Mediante la utilización de los coeficientes del ajuste polinómico se puede conocer y representar gráficamente la variación de la intensidad de fosforescencia con cada uno de los factores, de forma univariante, esto es, la intensidad de fosforescencia frente a la concentración de SDS, TINO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 (Figura nº V-5 y V-6) y de forma bivariante, la intensidad de fosforescencia frente a las concentraciones de SDS y TINO_3 , SDS y Na_2SO_3 , SDS y H_2SO_4 , TINO_3 y Na_2SO_3 , TINO_3 y H_2SO_4 y a las de Na_2SO_3 y H_2SO_4 a los óptimos de las otras variables, respectivamente (Figura nº V-7 y V-8).

A la vista de estos resultados, para el resto del trabajo experimental, se han seleccionado las siguientes concentraciones de trabajo para el sistema en estudio sin y con microemulsiones, respectivamente:

$$\begin{aligned}[\text{SDS}] &= 3'01 \cdot 10^{-2} \text{ M} \\ [\text{TINO}_3] &= 2'66 \cdot 10^{-2} \text{ M} \\ [\text{Na}_2\text{SO}_3] &= 5'04 \cdot 10^{-3} \text{ M} \\ [\text{H}_2\text{SO}_4] &= 1'61 \cdot 10^{-3} \text{ M}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}[\text{SDS}] &= 2'82 \cdot 10^{-2} \text{ M} \\ [\text{TINO}_3] &= 2'54 \cdot 10^{-2} \text{ M} \\ [\text{Na}_2\text{SO}_3] &= 5'05 \cdot 10^{-3} \text{ M} \\ [\text{H}_2\text{SO}_4] &= 1'62 \cdot 10^{-3} \text{ M}\end{aligned}$$

Tabla n° V-1.- *Diseño experimental para el sistema ANOVA - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 sin y con microemulsiones.*

Punto	Variables experimentales				pH	$I_{Fosf.}^1$	$I_{Fosf.}^2$
	[SDS] ($\cdot 10^{-2}$)	[$TiNO_3$] ($\cdot 10^{-2}$)	[Na_2SO_3] ($\cdot 10^{-3}$)	[H_2SO_4] ($\cdot 10^{-3}$)			
1	3'00(0)	2'50(0)	5'00(0)	1'60(0)	6'64	0'75	0'72
2	2'00(-1)	2'00(-1)	4'50(-1)	1'80(1)	6'44	0'52	0'54
3	2'00	3'00(1)	4'50	1'80	6'27	0'55	0'55
4	2'00	2'00	4'50	1'40(-1)	6'67	0'69	0'71
5	4'00(1)	3'00	4'50	1'40	6'70	0'72	0'67
6	2'00	2'00	5'50(1)	1'40	6'88	0'50	0'57
7	4'00	2'00	5'50	1'40	6'93	0'54	0'54
8	4'00	3'00	4'50	1'80	6'51	0'57	0'54
9	4'00	2'00	4'50	1'40	6'75	0'62	0'60
10	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'75	0'72
11	4'00	2'00	5'50	1'80	6'93	0'70	0'68
12	2'00	3'00	5'50	1'40	6'84	0'60	0'58
13	4'00	3'00	5'50	1'40	6'90	0'60	0'55
14	4'00	2'00	4'50	1'80	6'57	0'52	0'50
15	2'00	3'00	4'50	1'40	6'62	0'69	0'64
16	2'00	3'00	5'50	1'80	6'59	0'70	0'68
17	4'00	3'00	5'50	1'80	6'68	0'72	0'70
18	2'00	2'00	5'50	1'80	6'70	0'69	0'66
19	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'75	0'72
20	0'94(-2'058)	2'50	5'00	1'60	6'60	0'62	0'64
21	3'00	3'52(2'058)	5'00	1'60	6'61	0'65	0'61
22	5'06(2'058)	2'50	5'00	1'60	6'66	0'63	0'63
23	3'00	1'47(-2'058)	5'00	1'60	6'75	0'62	0'61
24	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'76	0'72
25	3'00	2'50	5'00	1'19(-2'058)	6'90	0'42	0'45
26	3'00	2'50	5'00	2'01(2'058)	6'40	0'45	0'49
27	3'00	2'50	3'97(-2'058)	1'60	6'44	0'45	0'44
28	3'00	2'50	6'03(2'058)	1'60	6'84	0'45	0'44
29	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'75	0'72

¹ Intensidad de fosforescencia del sistema ANOVA en SDS sin microemulsiones.

² Intensidad de fosforescencia del sistema ANOVA en SDS con microemulsiones (n-heptano/1-pentanol).

Tabla n° V-2.- ANOVA (ANOVA - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 sin microemulsiones).

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0000998	1	0'0000998	0'13	0'7406
a ₂	0'0039714	1	0'0039714	5'16	0'0856
a ₃	0'0014752	1	0'0014752	1'92	0'2385
a ₄	0'0001094	1	0'0001094	0'14	0'7292
a ₁₂	0'0007563	1	0'0007563	0'98	0'3877
a ₁₃	0'0000562	1	0'0000562	0'07	0'8030
a ₁₄	0'0018063	1	0'0018063	2'35	0'2004
a ₂₃	0'0007562	1	0'0007562	0'98	0'3877
a ₂₄	0'0000562	1	0'0000562	0'07	0'8030
a ₃₄	0'0770062	1	0'0770062	100'01	0'0006
a ₁₁	0'0152736	1	0'0152736	19'84	0'0112
a ₂₂	0'0123282	1	0'0123282	16'01	0'0161
a ₃₃	0'1178428	1	0'1178428	153'04	0'0002
a ₄₄	0'1311261	1	0'1311261	170'29	0'0002
Fallo de ajuste	0'0342105	10	0'0034210	4'44	0'0818
Error Puro	0'0030800	4	0'0007700		
Total	0'3290551	28			

Tabla n° V-3.- ANOVA (ANOVA - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 con microemulsiones).

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0011891	1	0'0011891	1'83	0'2476
a ₂	0'0004945	1	0'0004945	0'76	0'4411
a ₃	0'0018022	1	0'0018022	2'77	0'1712
a ₄	0'0002137	1	0'0002137	0'33	0'6028
a ₁₂	0'0018063	1	0'0018063	2'78	0'1708
a ₁₃	0'0007563	1	0'0007563	1'16	0'3415
a ₁₄	0'0010563	1	0'0010563	1'63	0'2714
a ₂₃	0'0000062	1	0'0000062	0'01	0'9276
a ₂₄	0'0003062	1	0'0003062	0'47	0'5371
a ₃₄	0'0588062	1	0'0588062	90'47	0'0007
a ₁₁	0'0013038	1	0'0013038	2'01	0'2296
a ₂₂	0'0045554	1	0'0045554	7'01	0'0571
a ₃₃	0'0789120	1	0'0789120	121'40	0'0004
a ₄₄	0'0591709	1	0'0591709	91'03	0'0007
Fallo de ajuste	0'0258050	10	0'0025805	3'97	0'0980
Error Puro	0'0026000	4	0'0006500		
Total	0'2127034	28			

Tabla nº V-4.- Valoración del diseño del sistema ANOVA - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 (sin microemulsiones).

Coeficientes		
$a_1 = 3'6817$		
$a_2 = 56'9378$		
$a_3 = 1568'05$		
$a_4 = 1877'7$		
$a_{12} = 137'5$		
$a_{13} = -375$	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
$a_{14} = 5312'5$	$[SDS] = 3'01 \cdot 10^{-2} M$	$A_1 < 0$
$a_{23} = -2750$	$[TiNO_3] = 2'65 \cdot 10^{-2} M$	$A_2 > 0$
$a_{24} = -1875$	$[Na_2SO_3] = 5'04 \cdot 10^{-3} M$	$A_3 < 0$
$a_{34} = 693750$	$[H_2SO_4] = 1'61 \cdot 10^{-3} M$	$A_4 > 0$
$a_{11} = -232'436$		Es un máximo
$a_{22} = -835'299$		
$a_{33} = -258252$		
$a_{44} = -1'70262 \cdot 10^6$		
$a = -5'493$		

Tabla nº V-5.- Valoración del diseño experimental para el sistema ANOVA - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 (con microemulsiones).

Coeficientes		
$a_1 = -15'3099$		
$a_2 = 11'662$		
$a_3 = 1112'98$		
$a_4 = 412'239$		
$a_{12} = 212'5$		
$a_{13} = 1375$	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
$a_{14} = 4062'5$	$[SDS] = 2'55 \cdot 10^{-2} M$	$A_1 < 0$
$a_{23} = 250$	$[TiNO_3] = 2'50 \cdot 10^{-2} M$	$A_2 > 0$
$a_{24} = 4375$	$[Na_2SO_3] = 5'04 \cdot 10^{-3} M$	$A_3 < 0$
$a_{34} = 606250$	$[H_2SO_4] = 1'61 \cdot 10^{-3} M$	$A_4 > 0$
$a_{11} = -67'9119$		Es un máximo
$a_{22} = -507'759$		
$a_{33} = -211331$		
$a_{44} = -1'14374 \cdot 10^6$		
$a = -2'38011$		

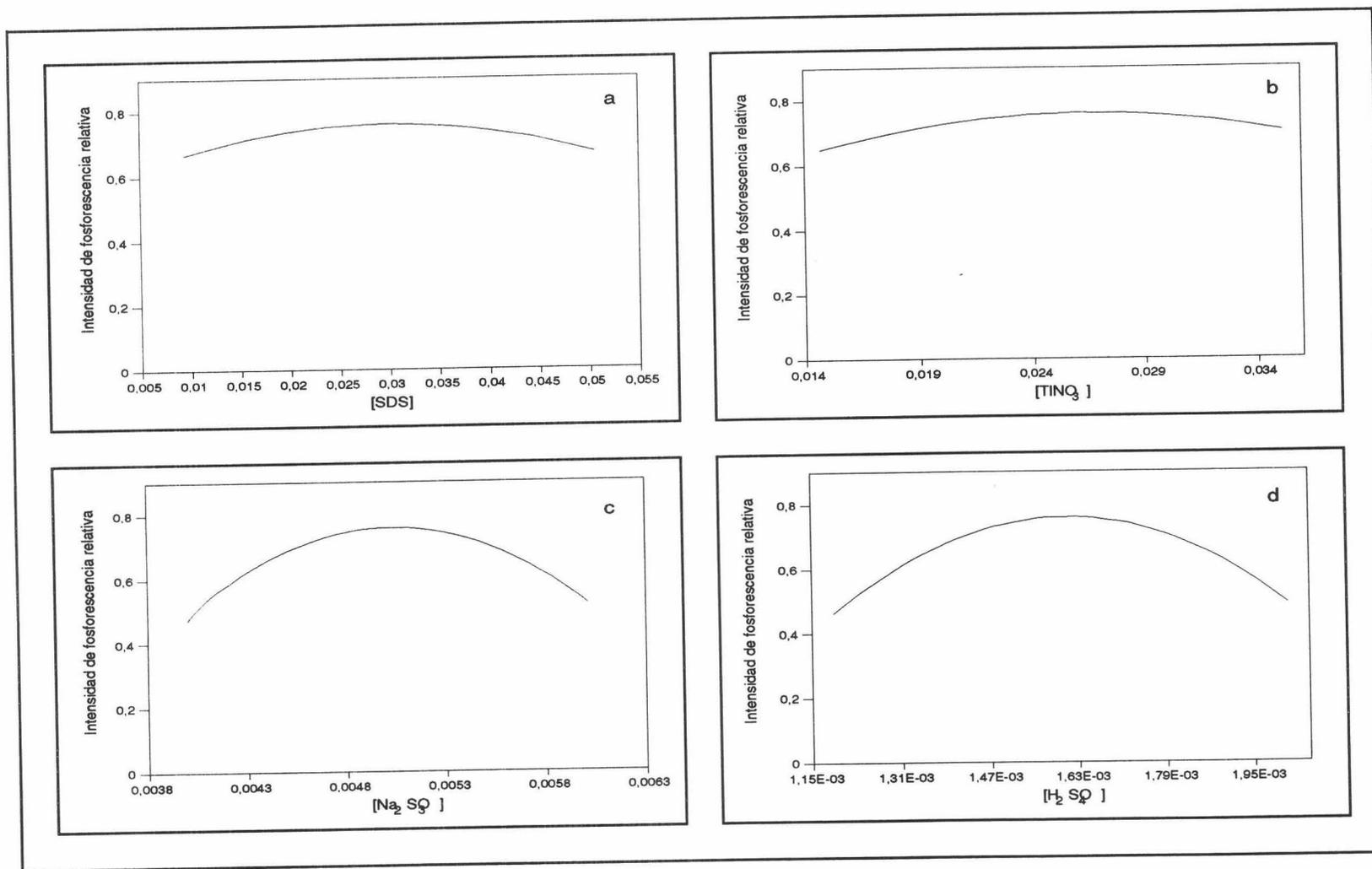


Figura n° V-5.- Variación de la intensidad de fosforescencia con la [SDS] (a), [TiNO₃] (b), [Na₂SO₃] (c) y la [H₂SO₄] (d) sin microemulsiones. [ANOA] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

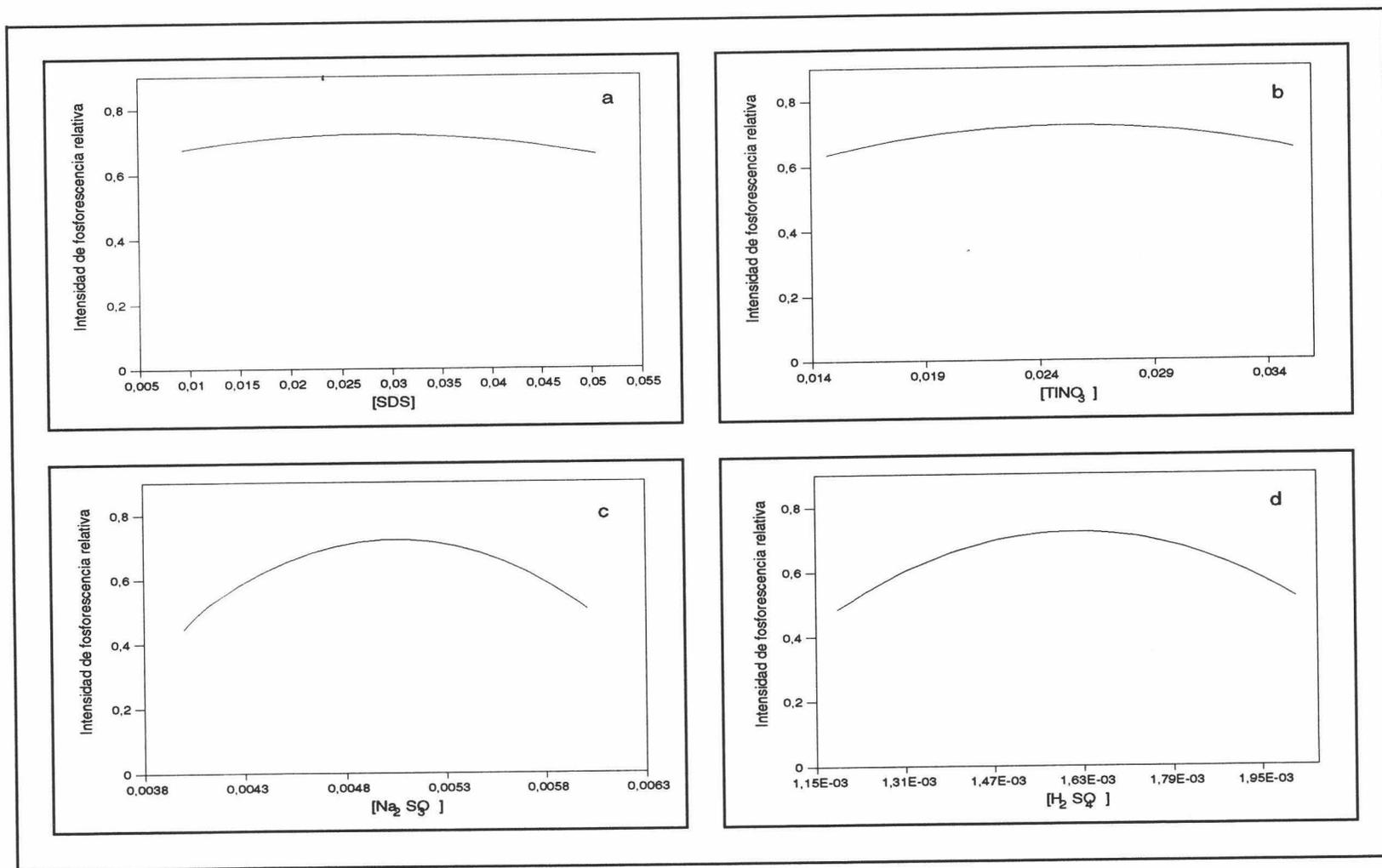


Figura n° V-6.- Variación de la intensidad de fosforescencia con la [SDS] (a), [$TiNO_3$] (b), [Na_2SO_3] (c) y la [H_2SO_4] (d) en microemulsión de n-heptano/1-butanol. [ANOA] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

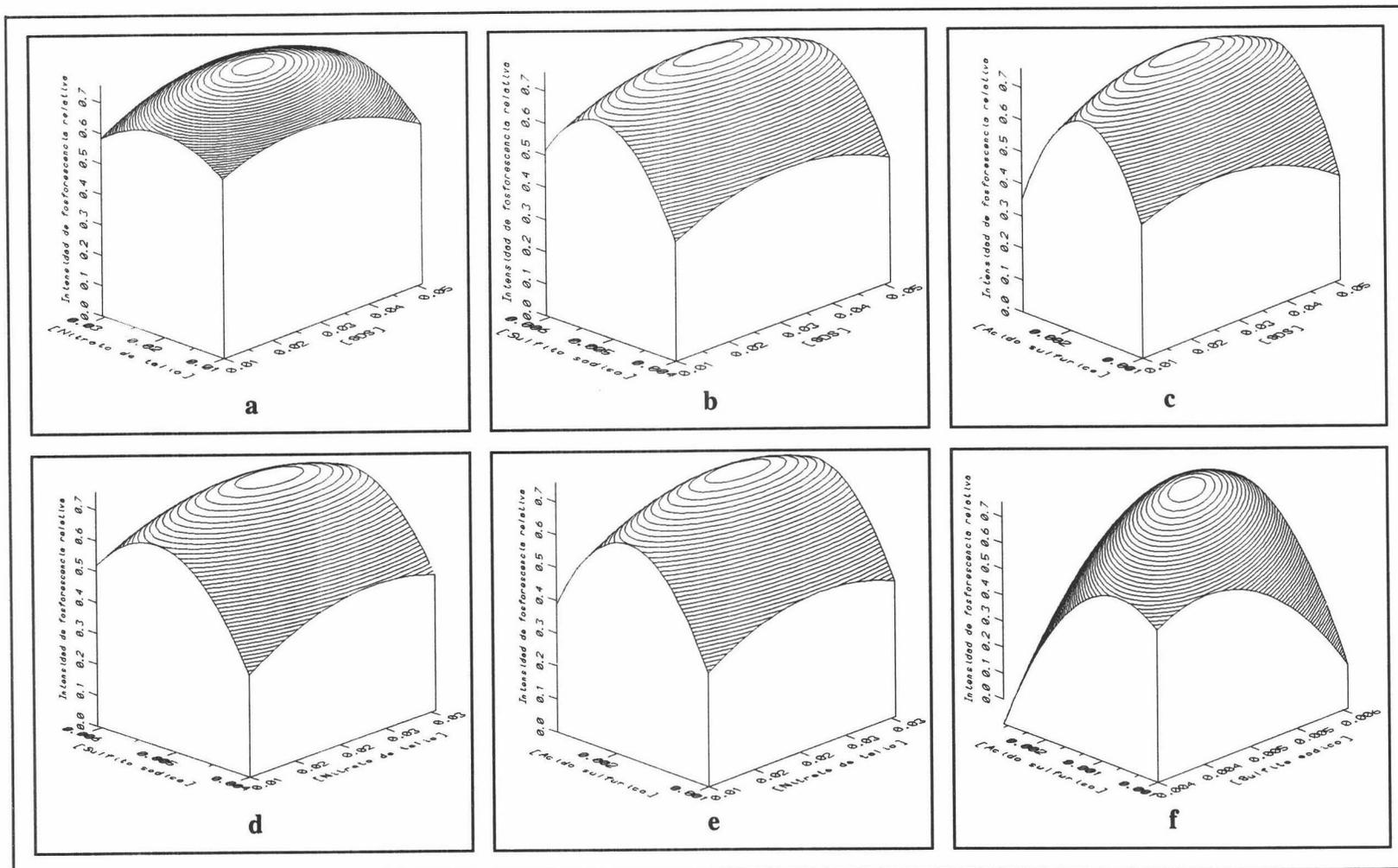


Figura n° V-7.- Variación de la intensidad de fosforescencia con [SDS] y [TiNO₃] (a), [SDS] y [Na₂SO₃] (b), [SDS] y [H₂SO₄] (c), [TiNO₃] y [Na₂SO₃] (d), [TiNO₃] y [H₂SO₄] (e) y [Na₂SO₃] y [H₂SO₄] (f). [ANOVA] 500 ng/ml, λ_{exc/em} 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, t_{d/g} 100/500 μs y sensibilidad 1100 V.

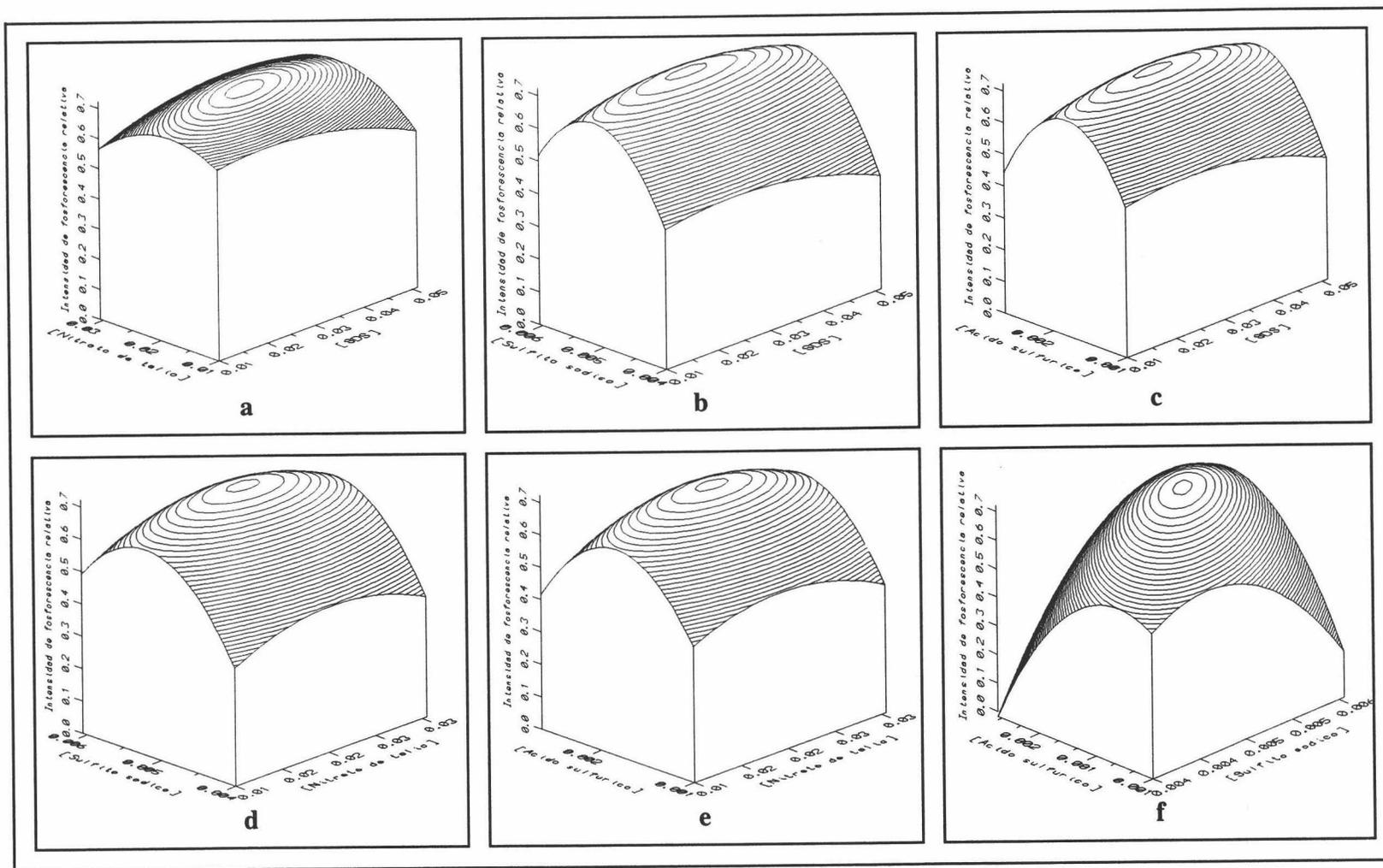


Figura n° V-8.- Variación de la intensidad de fosforescencia con $[SDS]$ y $[TlNO_3]$ (a), $[SDS]$ y $[Na_2SO_3]$ (b), $[SDS]$ y $[H_2SO_4]$ (c), $[TlNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TlNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). $[ANO_4]$ 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

En el caso de la utilización de microemulsiones, se seleccionó el tipo de agente emulsionante a las condiciones experimentales del óptimo calculado. Se han probado seis tipos, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: *Se prepararon una serie de disoluciones madre mezclando 100 μl de una disolución $4'95 \cdot 10^{-2}$ M de ANOA en hidrocarburo (n-pentano, n-hexano o n-heptano) con 100 μl de co-surfactante (1-butanol, 1-pentanol o 1-hexanol) y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A una alícuota de 50 μl de estas disoluciones madre se le añadieron 564 μl de SDS 0'5 M, 1016 μl de TlNO_3 0'25 M, 505 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 810 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml. Los resultados alcanzados se han comparado con los obtenidos para este mismo sistema (SDS - TlNO_3 - Na_2SO_3 - H_2SO_4), pero sin utilizar microemulsiones. Éstos se reflejan en la Tabla nº V-6.*

Tabla nº V-6.- Selección del agente emulsionante.

Agente emulsionante	$I_{\text{Fosf.}}$
Sin microemulsión	1'058
N-pentano/1-butanol	0'837
N-pentano/1-pentanol	0'901
N-hexano/1-butanol	0'994
N-hexano/1-pentanol	0'991
N-heptano/1-butanol	1'035
N-heptano/1-pentanol	0'854

$^1\lambda_{\text{exc/em}}$ 282/500 nm, $\text{rendijas}_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 100/500 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V

Al observar esta tabla se comprueba que no existen diferencias significativas entre los diferentes agentes emulsionantes y, además, el empleo de microemulsiones no mejora los resultados de intensidad de fosforescencia.

b) Sistema ANOA - TX-100 - TlNO_3 - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .

En principio, la metodología a seguir para la optimización de las variables experimentales debería ser similar a la utilizada para los sistemas anteriormente estudiados, es decir, un diseño experimental de cuatro variables donde éstas se optimizaran conjuntamente, la concentración de agente micelar se variara entorno a la c.m.c. y la

concentración de $TiNO_3$ en torno a los valores utilizados hasta ahora al igual que la de Na_2SO_3 y de H_2SO_4 . Sin embargo, un diseño experimental planteado de esta forma no conduce a resultados satisfactorios, ya que de hecho, ni siquiera se observan señales de fosforescencia. Este hecho, obliga a reconducir la optimización de una forma totalmente diferente a como se estaba desarrollando hasta ahora.

La aparición de señales fosforescentes en sistemas micelares está ligada a tres fenómenos distintos:

- Aumento de la rigidez del medio, por la presencia de un agente micelar.
- Cruce intersistemas, favorecido por la presencia de un átomo pesado.
- Eliminación del O_2 , mediante el uso de un desoxigenante.

Este último parece ser común a cualquier tipo de agente micelar, mientras que los dos primeros están interrelacionados y dependen del tipo de agente micelar. Por otro lado, el hecho de que en los rangos de concentración estudiados no se observara ninguna señal de fosforescencia hizo pensar en la posibilidad de buscar el óptimo mediante la utilización de un método secuencial o método simplex.

En primer lugar, se comenzó por la localización del mínimo de la señal de fluorescencia en estas condiciones de trabajo de fosforescencia. La desactivación fluorescente y fosforescente compiten entre sí, por lo que era lógico suponer que un mínimo de fluorescencia, signifique un máximo de fosforescencia. Para llevar a cabo esta metodología se utilizó el siguiente procedimiento operatorio: *a 50 μ l de disolución madre de ANOA $4'95 \cdot 10^{-4}$ M en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M se le añaden cantidades variables de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M y de $TiNO_3$ $0'25$ M, así como 505 μ l de Na_2SO_3 $0'1$ M y 805 μ l H_2SO_4 $0'02$ M enrasando con agua destilada hasta 10 ml.* El desarrollo del simplex bidimensional para el ANOA mediante medidas de fluorescencia se muestra en la Tabla nº V-7.

La representación gráfica del simplex bidimensional para el ANOA llevado a cabo mediante medidas de fluorescencia se muestra en la Figura nº V-9.

Tabla nº V-7.- *Desarrollo del simplex bidimensional para el sistema ANOA - TX-100 - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄ mediante medidas de fluorescencia.*

Punto	Coord. x	Coord. y	$\frac{[TX-100]}{f_x=8'0 \cdot 10^{-4}}$	$\frac{[TlNO_3]}{f_y=10^{-2}}$	I _{Fluor.} ¹
a	3'191	1'931	2'55·10 ⁻³	1'93·10 ⁻³	4'00
b	2'225	2'190	1'78·10 ⁻³	2'18·10 ⁻³	3'72
c	2'932	2'897	2'35·10 ⁻³	4'12·10 ⁻³	3'61
Primer triángulo abc					
Desecho a: b, c.					
d	1'966	3'155	1'57·10 ⁻³	3'56·10 ⁻³	3'10
Nuevo triángulo bcd					
Desecho b: c, d.					
e	2'673	3'863	2'14·10 ⁻³	3'86·10 ⁻³	3'20
Nuevo triángulo cde					
Desecho c: d, e.					
f	1'707	4'121	1'37·10 ⁻³	4'12·10 ⁻³	2'65
Nuevo triángulo def					
Desecho e: d, f.					
g	1'000	3'414	8'00·10 ⁻⁴	3'41·10 ⁻²	2'70
Nuevo triángulo dfg					
Desecho d: f, g.					
h	0'741	4'380	5'92·10 ⁻⁴	4'38·10 ⁻²	2'50
Nuevo triángulo fgh					
Desecho g: f, h.					
i	1'448	5'087	1'16·10 ⁻³	5'09·10 ⁻²	2'20
Nuevo triángulo fhi					
Desecho f: h, i.					
j	0'482	5'346	3'86·10 ⁻⁴	5'34·10 ⁻²	2'00
Nuevo triángulo hij					
Desecho h: i, j.					
k	1'189	6'053	9'52·10 ⁻⁴	6'05·10 ⁻²	1'95
Nuevo triángulo ijk					
Desecho i: j, k.					
l	0'224	6'312	1'79·10 ⁻⁴	6'31·10 ⁻²	1'60
Nuevo triángulo jkl					
Desecho j: k, l.					
m	0'931	7'019	7'45·10 ⁻⁴	7'02·10 ⁻²	1'01
Nuevo triángulo klm					
Desecho k: l, m.					

⁽¹⁾ $\lambda_{exc/em}$ 282/346 nm, rendijas 4/4 nm y sensibilidad 600 V

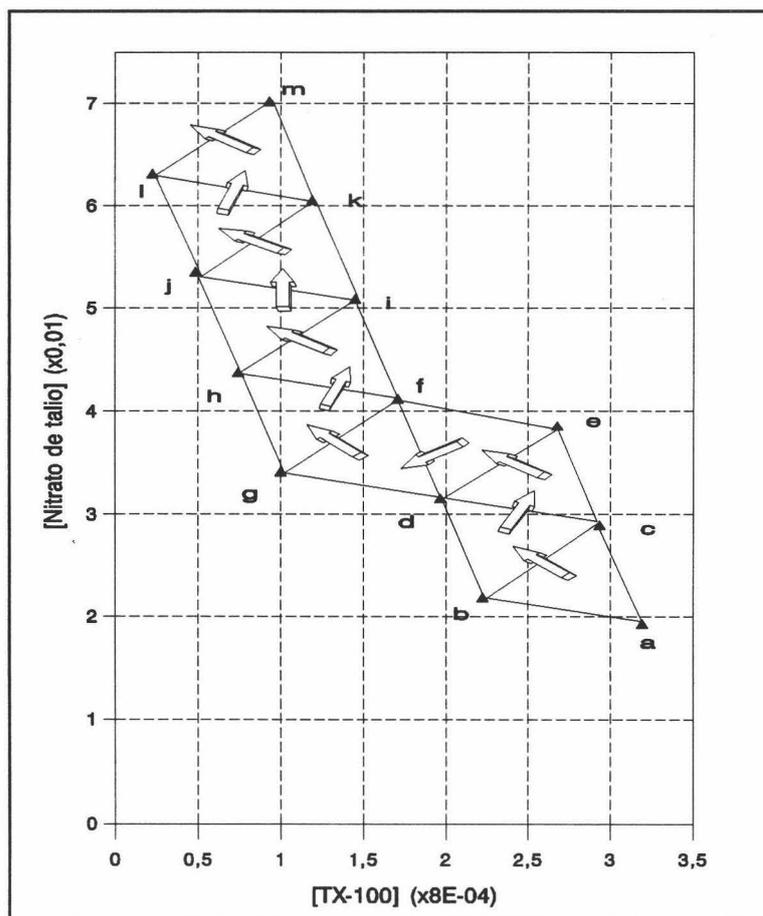


Figura n° V-9.- Simplex bidimensional para el sistema ANOA - TX-100 - $TlNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 mediante medidas de fluorescencia. [ANOA] 500 ng/ml, $[Na_2SO_3]$ $5'05 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'61 \cdot 10^{-3}$ M.

El desarrollo del simplex bidimensional mediante medidas de fluorescencia conduce a valores de concentración de TX-100 muy inferiores a su c.m.c. y de $TlNO_3$ del orden de $0'07$ M, donde son observables señales de fosforescencia. En estas nuevas condiciones experimentales se procedió al desarrollo de otro simplex bidimensional, en este caso mediante medidas de fosforescencia. El procedimiento experimental utilizado fue el siguiente: a $50 \mu l$ de disolución madre de ANOA $4'95 \cdot 10^{-4}$ M en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M se le añaden cantidades variables de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M y de $TlNO_3$ $0'25$ M, así como $505 \mu l$ de Na_2SO_3 $0'1$ M y $805 \mu l$ H_2SO_4 $0'02$ M enrasando con agua destilada hasta 10 ml. Dicho desarrollo se muestra en la Tabla n° V-8.

Tabla n° V-8.- Desarrollo del simplex bidimensional para el sistema ANOA - TX-100 - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄ mediante medidas de fosforescencia.

Punto	Coord. x	Coord. y	[TX-100] fx=4'0·10 ⁻⁶	[TlNO ₃] fy=10 ⁻²	I _{Fosf.} ¹
a	8'051	6'103	3'22·10 ⁻⁵	6'10·10 ⁻²	0'42
b	8'312	7'069	3'32·10 ⁻⁵	7'07·10 ⁻²	0'46
c	7'346	6'810	2'94·10 ⁻⁵	6'81·10 ⁻²	0'55
Primer triángulo abc					
Desecho a: b, c.					
d	7'605	7'776	3'04·10 ⁻⁵	7'76·10 ⁻²	0'51
Nuevo triángulo bcd					
Desecho b: c, d.					
e	6'639	7'518	2'65·10 ⁻⁵	7'50·10 ⁻²	0'58
Nuevo triángulo cde					
Desecho d: c, e.					
f	6'380	6'552	2'55·10 ⁻⁵	6'55·10 ⁻²	0'64
Nuevo triángulo cef					
Desecho c: e, f.					
g	5'673	7'259	2'27·10 ⁻⁵	7'26·10 ⁻²	0'76
Nuevo triángulo efg					
Desecho e: f, g.					
h	5'414	6'293	2'17·10 ⁻⁵	6'29·10 ⁻²	0'72
Nuevo triángulo fgh					
Desecho f: g, h.					
i*	4'707	7'010	1'88·10 ⁻⁵	5'09·10 ⁻²	1'08
Nuevo triángulo ghi					
Desecho h: g, i.					
j	4'966	7'966	1'99·10 ⁻⁵	7'96·10 ⁻²	1'00
Nuevo triángulo gij					
Desecho g: i, j.					
k*	4'002	7'707	1'60·10 ⁻⁵	7'71·10 ⁻²	1'10
Nuevo triángulo jik					
Desecho j: i, k.					
l*	3'741	6'741	1'50·10 ⁻⁵	6'74·10 ⁻²	1'09
Nuevo triángulo ikl					
Desecho i: k, l.					
m	3'034	7'448	1'21·10 ⁻⁵	7'45·10 ⁻²	1'03
Mismo triángulo ikl					
Desecho k: i, l.					
n	4'448	6'034	1'80·10 ⁻⁵	6'03·10 ⁻²	1'01

¹ λ_{exc/em} 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, t_{d/g} 100/500 μs, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V

La representación del simplex desarrollado para el ANOA mediante medidas de fosforescencia se muestra en la Figura n° V-10.

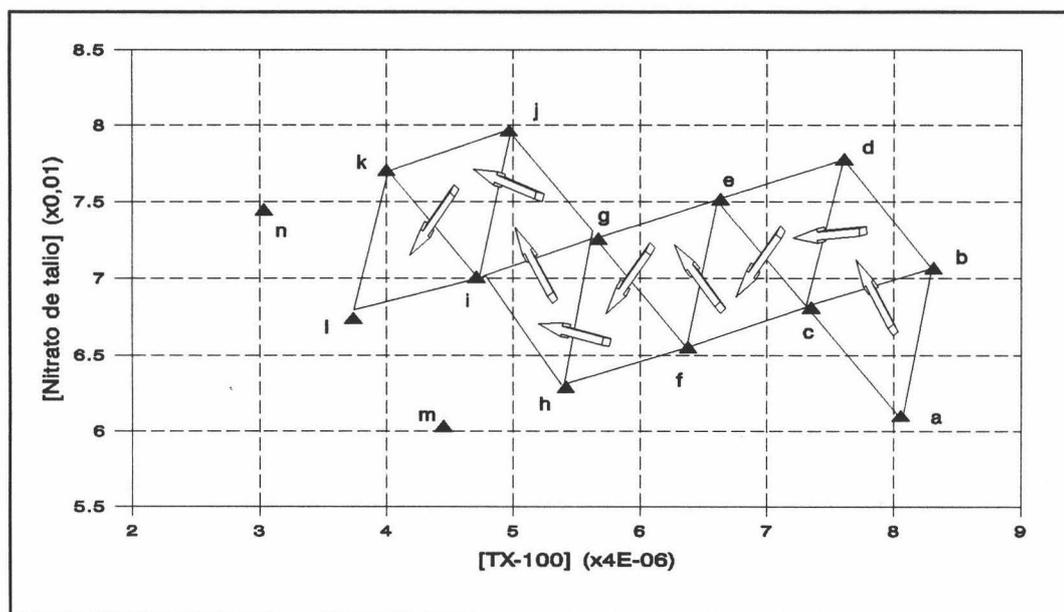


Figura n° V-10.- Simplex bidimensional del sistema ANOA -TX-100 - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 mediante medidas de fosforescencia. $[ANOA]$ 500 ng/ml, $[Na_2SO_3]$ $5'05 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'61 \cdot 10^{-3}$ M.

Observando el simplex desarrollado, se puede comprobar que el óptimo de TX-100, se obtiene a concentraciones muy inferiores a la c.m.c., del orden de 0'07 c.m.c., lo cual indica que, la interacción entre el TX-100 y el ANOA, es una interacción monomérica, favorecida, sin duda, por la disposición espacial del ANOA (sustitución β en el naftaleno) y del TX-100. La concentración de $TiNO_3$ es, en este caso, de dos a tres veces superior que para el agente micelar SDS.

Conocido el rango óptimo de concentraciones de TX-100 y de $TiNO_3$, y suponiendo que las concentraciones óptimas de Na_2SO_3 y de H_2SO_4 son semejantes a las obtenidas para el agente micelar SDS, se procedió a plantear un diseño experimental para estas cuatro variables experimentales.

Para llevar a cabo el diseño experimental se utilizó el siguiente procedimiento: a

una alícuota de 50 μl de disolución madre de ANOA $4'95 \cdot 10^{-4}$ M en TX-100 $2 \cdot 10^{-4}$ M se le adicionaron volúmenes variables de TX-100 $2 \cdot 10^{-4}$ M, TINO_3 0'25 M, Na_2SO_3 0'1 M y de H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La intensidad de fosforescencia se registró a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 282/500 nm, $\text{rendijas}_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 100/500 μs , m.p.f. 30 ms y sensibilidad del detector a 1100 V. El desarrollo del diseño experimental se muestra en la Tabla n° V-9.

Al observar la tabla del análisis de la varianza (Tabla n° V-10), se comprueba que en la región experimental que comprende el diseño, la relación entre la intensidad de fosforescencia y las concentraciones de TX-100, TINO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 , es cuadrática, no siendo significativos los coeficientes que las relacionan de forma lineal. El único término cruzado que es significativo para este sistema es el que relaciona la intensidad de fosforescencia con las concentraciones de Na_2SO_3 y H_2SO_4 . El modelo de segundo orden propuesto se ajusta aceptablemente con un nivel de significación para el fallo de ajuste del 10'15 % y un coeficiente de determinación de 0'9096.

La valoración del diseño experimental (Tabla n° V-11) permite conocer la variación de la intensidad de fosforescencia con cada una de las variables optimizadas mediante la utilización del diseño experimental, de forma univariante, la intensidad de fosforescencia frente a las concentraciones de TX-100, TINO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 (Figura n° V-11) y de forma bivariante, es decir, la intensidad de fosforescencia frente a las concentraciones de TX-100 y TINO_3 , TX-100 y Na_2SO_3 , TX-100 y H_2SO_4 , TINO_3 y Na_2SO_3 , TINO_3 y H_2SO_4 y a las de Na_2SO_3 y H_2SO_4 a los óptimos de las otras variables en cada caso, respectivas (Figura n° V-12).

Para el resto del trabajo experimental, se seleccionaron las siguientes concentraciones de trabajo:

$$[\text{TX-100}] = 1'53 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$[\text{TINO}_3] = 6'74 \cdot 10^{-2} \text{ M}$$

$$[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 5'02 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1'60 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Tabla n° V-9.- *Diseño experimental del sistema ANOVA - TX-100 - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Punto	Variables experimentales				pH	I _{Fosf.} ¹
	[TX-100] (·10 ⁻⁵)	[TlNO ₃] (·10 ⁻²)	[Na ₂ SO ₃] (·10 ⁻³)	[H ₂ SO ₄] (·10 ⁻³)		
1	1'50(0)	6'63(0)	5'00(0)	1'60(0)	7'35	1'07
2	1'20(-1)	6'00(-1)	5'50(1)	1'40(-1)	6'82	0'60
3	1'80(1)	7'25(1)	5'50	1'40	7'25	0'64
4	1'80	7'25	5'50	1'80(1)	7'38	0'88
5	1'20	7'25	5'50	1'80	6'60	0'85
6	1'20	6'00	5'50	1'80	7'26	0'80
7	1'80	6'00	5'50	1'80	7'29	0'80
8	1'80	7'25	4'50(-1)	1'80	7'30	0'62
9	1'20	6'00	4'50	1'40	6'60	0'80
10	1'50	6'63	5'00	1'60	7'35	1'00
11	1'80	7'25	4'50	1'40	6'51	0'88
12	1'80	6'00	4'50	1'40	7'45	0'84
13	1'20	7'25	5'50	1'40	6'83	0'70
14	1'20	6'00	4'50	1'80	7'29	0'58
15	1'80	6'00	4'50	1'80	7'61	0'64
16	1'20	7'25	4'50	1'40	7'76	0'80
17	1'80	6'00	5'50	1'40	7'69	0'66
18	1'20	7'25	4'50	1'80	7'08	0'70
19	1'50	6'63	5'00	1'60	7'35	1'04
20	1'50	6'63	3'97(-2'058)	1'60	6'89	0'64
21	1'50	7'91(2'058)	5'00	1'60	7'22	0'89
22	1'50	5'34(-2'058)	5'00	1'60	7'32	0'89
23	1'50	6'63	6'03(2'058)	1'60	7'35	0'68
24	1'50	6'63	5'00	1'60	7'35	1'02
25	0'88(-2'058)	6'63	5'00	1'60	7'88	0'92
26	2'12(2'058)	6'63	5'00	1'60	6'04	0'94
27	1'50	6'63	5'00	1'19(-2'058)	7'67	0'75
28	1'50	6'63	5'00	2'01(2'058)	7'22	0'72
29	1'50	6'63	5'00	1'60	7'35	0'98

¹ $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 100/500 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V

Tabla n° V-10.- *Análisis de la varianza.*

Coeficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0011972	1	0'0011972	0'98	0'3879
a ₂	0'0050060	1	0'0050060	4'10	0'1128
a ₃	0'0009481	1	0'0009481	0'78	0'4367
a ₄	0'0005102	1	0'0005102	0'42	0'5596
a ₁₂	0'0022562	1	0'0022562	1'85	0'2455
a ₁₃	0'0003062	1	0'0003062	0'25	0'6477
a ₁₄	0'0007563	1	0'0007563	0'62	0'4830
a ₂₃	0'0003063	1	0'0003063	0'25	0'6477
a ₂₄	0'0007563	1	0'0007563	0'62	0'4830
a ₃₄	0'1425062	1	0'1425062	116'81	0'0004
a ₁₁	0'0310603	1	0'0310603	25'46	0'0073
a ₂₂	0'0512821	1	0'0512821	42'03	0'0029
a ₃₃	0'2654298	1	0'2654298	217'57	0'0001
a ₄₄	0'1772776	1	0'1772776	145'31	0'0003
Fallo de ajuste	0'0473864	10	0'0047386	3'88	0'1015
Error Puro	0'0048800	4	0'0012200		
Total	0'5783172	28			

Tabla n° V-11.- *Valoración del diseño experimental para el sistema ANOVA - TX-100 - TINO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Coeficientes		
a ₁ = 187694		
a ₂ = 140'456		
a ₃ = 2329'3		
a ₄ = 1400'96		
a ₁₂ = -633333		
a ₁₃ = -2'91667·10 ⁶	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
a ₁₄ = -1'14583·10 ⁷	[TX-100] = 1'53·10 ⁻⁵ M	A ₁ < 0
a ₂₃ = 1400	[TINO ₃] = 6'74·10 ⁻² M	A ₂ > 0
a ₂₄ = 5500	[Na ₂ SO ₃] = 5'02·10 ⁻³ M	A ₃ < 0
a ₃₄ = 943750	[H ₂ SO ₄] = 1'60·10 ⁻³ M	A ₄ > 0
a ₁₁ = -3'68293·10 ⁹		Es un máximo
a ₂₂ = -1090'32		
a ₃₃ = -387585		
a ₄₄ = -1'9797·10 ⁶		
a = -12'0935		

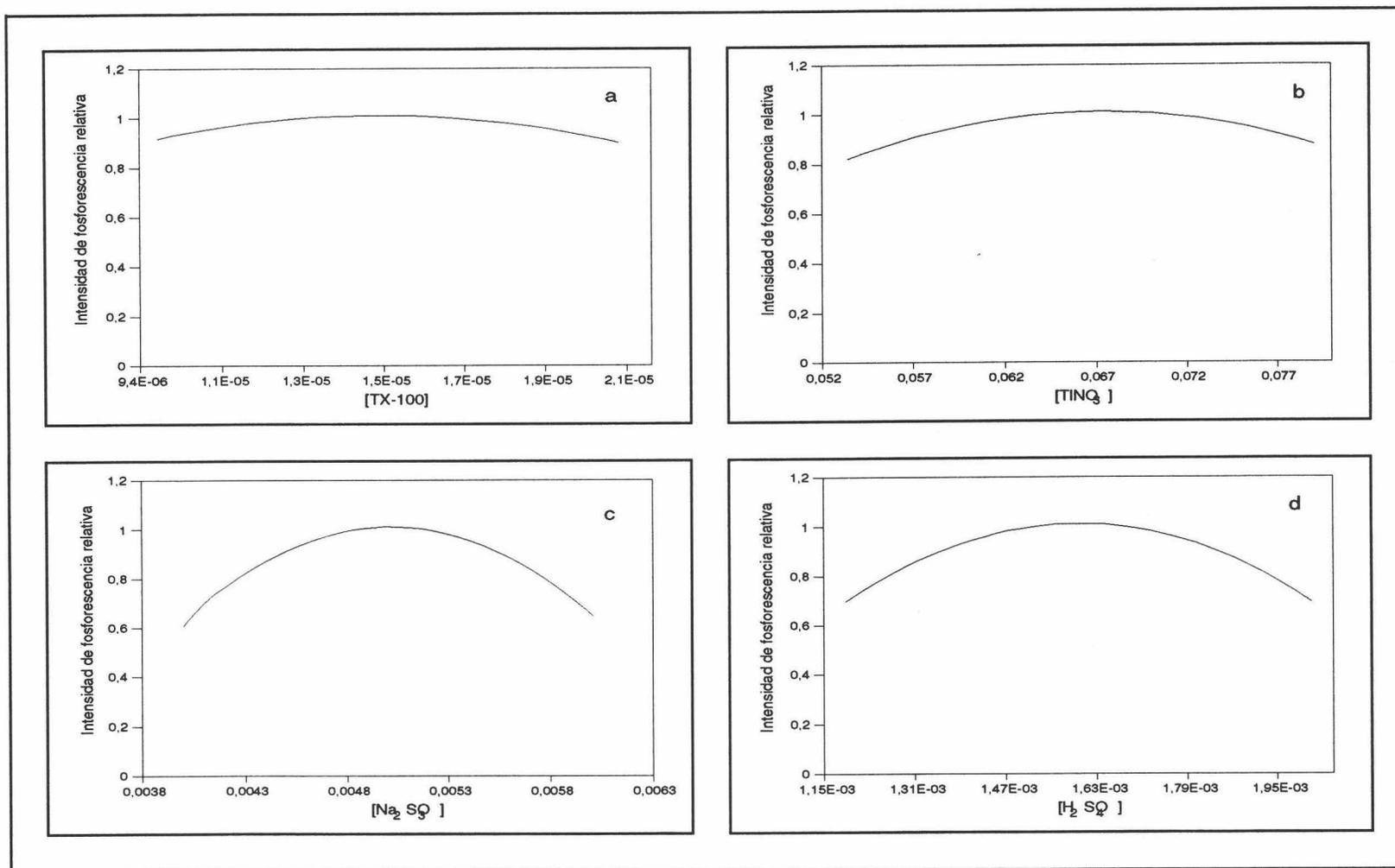


Figura n° V-11.- Variación de la intensidad de fosforescencia del ANOA con la [TX-100] (a), [TINO₃] (b), [Na₂SO₃] (c) y la [H₂SO₄] (d). [ANOA] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 30 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

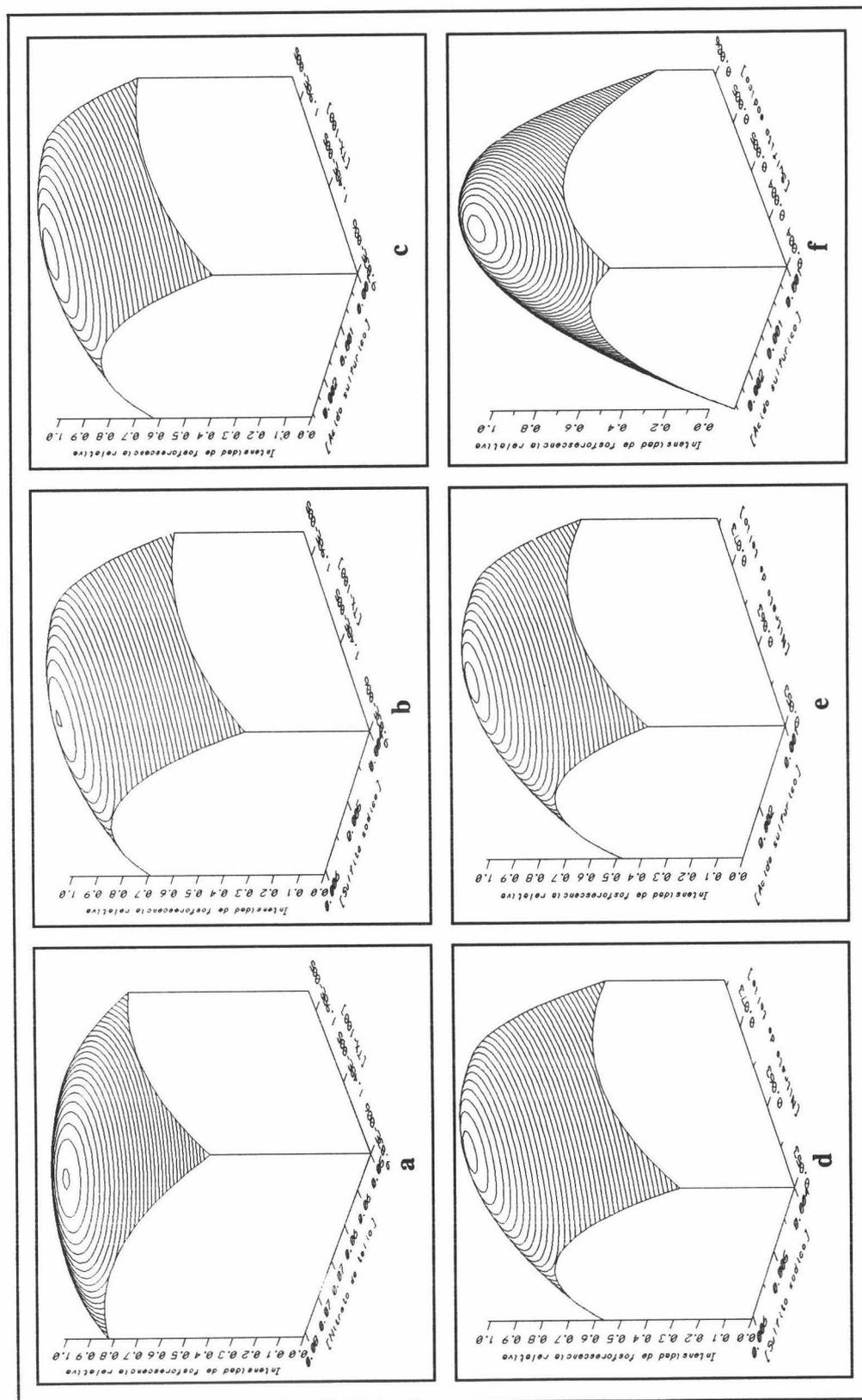


Figura n° V-12.- Variación de la intensidad de fosforescencia con [TX-100] y [TINO₃] (a), [TX-100] y [Na₂SO₃] (b), [TX-100] y [H₂SO₄] (c), [TINO₃] y [Na₂SO₃] (d), [TINO₃] y [H₂SO₄] (e) y [Na₂SO₃] y [H₂SO₄] (f). [ANOA] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 30 ms, t_{dlg} 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

c) *Sistema ANOA - Brij-35 - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .*

Al tratarse de un nuevo agente micelar no iónico, el estudio de este sistema se llevó a cabo de una forma similar al caso anterior. En primer lugar, se procedió a la optimización conjunta mediante un simplex de las concentraciones de Brij-35 y $TiNO_3$, manteniendo fijas las concentraciones de Na_2SO_3 y de H_2SO_4 en $5 \cdot 10^{-3}$ y en $1'6 \cdot 10^{-3}$ M, respectivamente. Las concentraciones de trabajo para el agente micelar se modificaron alrededor de la c.m.c., mientras que las de $TiNO_3$ fueron del orden de 0'07 M.

A diferencia del caso anterior, en este sistema las señales de fosforescencia eran observables a esas condiciones experimentales, por lo que se procedió a la optimización de las concentraciones de Brij-35 y $TiNO_3$ mediante un método simplex registrando señales de fosforescencia. Para ello, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: *a 50 μ l de disolución madre de ANOA $4'95 \cdot 10^{-5}$ M en Brij-35 $7'0 \cdot 10^{-4}$ M se le añaden cantidades variables de Brij-35 $7'0 \cdot 10^{-4}$ M, de $TiNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml.* El desarrollo del simplex bidimensional se muestra en la Tabla nº V-12 y su representación gráfica en la Figura nº V-13.

Una vez, localizado el óptimo para estos dos reactivos, se procedió al desarrollo de un diseño experimental de cuatro variables para llevar a cabo la optimización conjunta de las concentraciones de Brij-35, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 , de forma análoga a lo desarrollado hasta ahora. El procedimiento utilizado fue: *a una alícuota de 50 μ l de disolución madre de ANOA $4'95 \cdot 10^{-5}$ M en Brij-35 $7 \cdot 10^{-4}$ M se le adicionaron volúmenes variables de Brij-35 $7 \cdot 10^{-4}$ M, $TiNO_3$ 0'25 M, Na_2SO_3 0'1 M y H_2SO_4 0'02 M, enrasando hasta 10 ml con agua destilada. La intensidad de fosforescencia se registró a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 100/500 μ s, m.p.f. 30 ms y sensibilidad 1100 V.* El diseño desarrollado para este sistema en estudio se muestra en la Tabla nº V-13 y correspondiente ANOVA se presenta en la Tabla nº V-14. Del análisis de la varianza se concluye que la relación entre la intensidad de fosforescencia y las concentraciones de los cuatro reactivos es cuadrática, siendo el coeficiente que relaciona las concentraciones de Na_2SO_3 - H_2SO_4 significativo. Por otro lado, el coeficiente de determinación vale 0'9576, con un nivel de significación para el fallo de ajuste de 77'04 %.

Tabla n° V-12.- *Desarrollo del simplex bidimensional para el sistema ANOA - Brij-35 - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Punto	Coord. x	Coord. y	$\frac{[\text{Brij-35}]}{f_x=3'5 \cdot 10^{-5}}$	$\frac{[\text{TlNO}_3]}{f_y=2'5 \cdot 10^{-2}}$	$I_{\text{Fosf.}}^1$
a	1'000	1'000	$3'50 \cdot 10^{-5}$	$2'50 \cdot 10^{-2}$	0'152
b	2'000	1'000	$7'00 \cdot 10^{-5}$	$2'50 \cdot 10^{-2}$	0'245
c	1'500	1'866	$5'25 \cdot 10^{-5}$	$4'66 \cdot 10^{-2}$	0'284
Primer triángulo abc					
Desecho a: b, c.					
d	2'500	1'866	$8'75 \cdot 10^{-5}$	$4'66 \cdot 10^{-2}$	0'454
Nuevo triángulo bcd					
Desecho b: c, d.					
e	2'000	2'732	$7'00 \cdot 10^{-5}$	$6'83 \cdot 10^{-2}$	0'348
Nuevo triángulo cde					
Desecho c: d, e.					
f	3'000	2'732	$1'05 \cdot 10^{-4}$	$6'83 \cdot 10^{-2}$	0'600
Nuevo triángulo def					
Desecho e: d, f.					
g	3'500	1'866	$1'23 \cdot 10^{-4}$	$4'66 \cdot 10^{-2}$	0'582
Nuevo triángulo dfg					
Desecho d: f, g.					
h	4'000	2'732	$1'40 \cdot 10^{-4}$	$6'83 \cdot 10^{-2}$	0'715
Nuevo triángulo fgh					
Desecho g: f, h.					
i	3'500	3'598	$1'23 \cdot 10^{-4}$	$9'00 \cdot 10^{-2}$	0'975
Nuevo triángulo fhi					
Desecho f: h, i.					
j	4'500	3'598	$1'57 \cdot 10^{-4}$	$9'00 \cdot 10^{-2}$	0'857
Nuevo triángulo hij					
Desecho h: i, j.					
k	4'000	4'464	$1'40 \cdot 10^{-4}$	$1'12 \cdot 10^{-1}$	1'103
Nuevo triángulo ijk					
Desecho j: i, k.					
l	3'000	4'464	$1'05 \cdot 10^{-4}$	$1'12 \cdot 10^{-1}$	1'154
Nuevo triángulo ikl					
Desecho i: k, l.					
m	3'500	5'330	$1'23 \cdot 10^{-4}$	$1'33 \cdot 10^{-1}$	1'126
Nuevo triángulo klm					
Desecho k: l, m.					
n	2'500	5'330	$8'75 \cdot 10^{-5}$	$1'33 \cdot 10^{-1}$	1'084
Mismo triángulo klm					
Desecho l: k, m.					
ñ	4'500	5'330	$1'58 \cdot 10^{-4}$	$1'33 \cdot 10^{-1}$	1'076

¹ $\lambda_{\text{exc/em}}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{u/g}$ 100/500 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1275 V

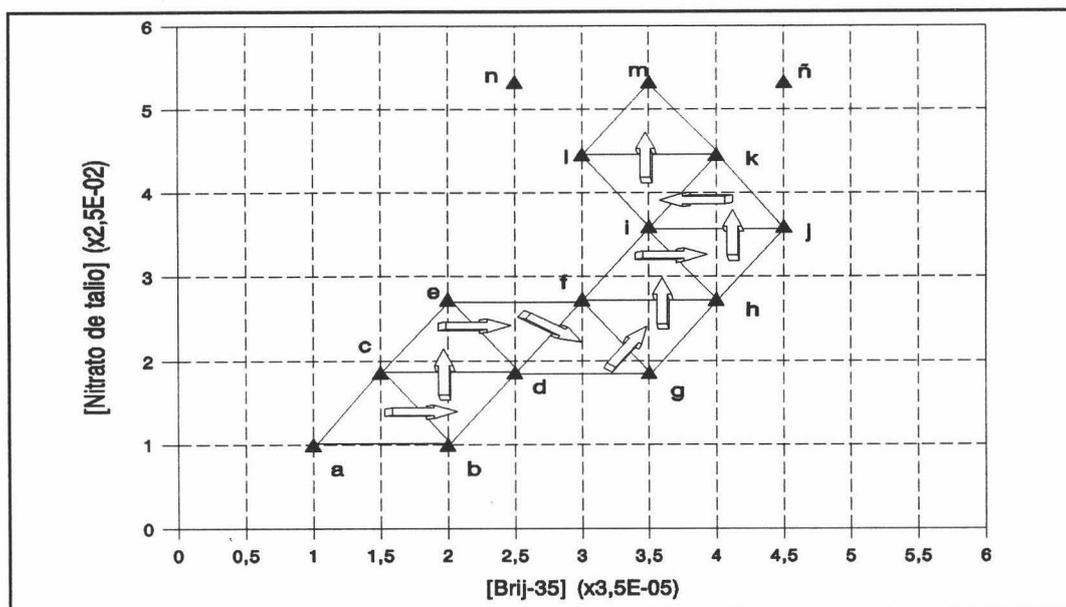


Figura n° V-13.- Simplex bidimensional del sistema ANOA -Brij-35 - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 . [ANOA] 500 ng/ml, $[Na_2SO_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

La valoración del diseño experimental (Tabla n° V-15), permite observar la variación de la intensidad de fosforescencia de cada una de las variables optimizadas, de forma univariante (Figura n° V-14) y de forma bivariante (Figura n° V-15). Los resultados alcanzados, utilizando Brij-35 como agente micelar, son semejantes a los del apartado anterior, si bien en este caso, la concentración de $TiNO_3$ es, en este caso más crítica, presentando un óptimo algo más inestable. Las concentraciones de Na_2SO_3 y H_2SO_4 mantienen las mismas tendencias que cuando se utilizó TX-100 o SDS como agente micelar.

Para el resto del trabajo experimental, se han seleccionado las siguientes concentraciones de trabajo:

$[Brij-35] = 8'80 \cdot 10^{-5}$ M
$[TiNO_3] = 8'18 \cdot 10^{-2}$ M
$[Na_2SO_3] = 5'00 \cdot 10^{-3}$ M
$[H_2SO_4] = 1'60 \cdot 10^{-3}$ M

Tabla n° V-13.- *Desarrollo del diseño experimental para el sistema ANOA Brij-35 - $TlNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 .*

Punto	Variables experimentales				pH	$I_{Fosf.}^1$
	[Brij-35]	[$TlNO_3$]	[Na_2SO_3]	[H_2SO_4]		
	($\cdot 10^{-5}$)	($\cdot 10^{-2}$)	($\cdot 10^{-3}$)	($\cdot 10^{-3}$)		
1	8'75(0)	8'13(0)	5'00(0)	1'60(0)	7'35	0'35
2	9'80(1)	7'50(-1)	5'50(1)	1'80(1)	6'82	0'25
3	7'70(-1)	7'50	5'50	1'80	7'25	0'25
4	9'80	7'50	4'50(-1)	1'40(-1)	7'38	0'24
5	9'80	7'50	5'50	1'40	6'60	0'15
6	7'70	8'75(1)	4'50	1'40	7'26	0'23
7	9'80	7'50	4'50	1'80	7'29	0'16
8	9'80	8'75	5'50	1'40	7'30	0'17
9	9'80	8'75	4'50	1'80	6'60	0'17
10	8'75	8'13	5'00	1'60	7'35	0'30
11	7'70	8'75	4'50	1'80	6'51	0'17
12	7'70	7'50	4'50	1'40	7'45	0'25
13	7'70	8'75	5'50	1'80	6'83	0'26
14	7'70	7'50	4'50	1'80	7'29	0'15
15	9'80	8'75	5'50	1'80	7'61	0'27
16	9'80	8'75	4'50	1'40	7'76	0'27
17	7'70	8'75	5'50	1'40	7'69	0'15
18	7'70	7'50	5'50	1'40	7'08	0'18
19	8'75	8'13	5'00	1'60	7'35	0'32
20	8'75	9'41(2'058)	5'00	1'60	6'89	0'24
21	8'75	8'13	5'00	1'19(-2'058)	7'22	0'19
22	8'75	6'84(-2'058)	5'00	1'60	7'32	0'24
23	6'59(-2'058)	8'13	5'00	1'60	7'35	0'26
24	8'75	8'13	5'00	1'60	7'35	0'31
25	10'9(2'058)	8'13	5'00	1'60	7'88	0'25
26	8'75	8'13	3'97(-2'058)	1'60	6'04	0'19
27	8'75	8'13	5'00	2'01(2'058)	7'67	0'16
28	8'75	8'13	6'03(2'058)	1'60	7'22	0'18
29	8'75	8'13	5'00	1'60	7'35	0'34

¹ $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 100/500 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V

Tabla n° V-14.- *Análisis de la varianza.*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0000154	1	0'0000154	0'04	0'8610
a ₂	0'0001471	1	0'0001471	0'34	0'5959
a ₃	0'0000154	1	0'0000154	0'04	0'8610
a ₄	0'0000193	1	0'0000193	0'04	0'8447
a ₁₂	0'0006250	1	0'0006250	1'45	0'2944
a ₁₃	0'0001000	1	0'0001000	0'23	0'6597
a ₁₄	0'0000000	1	0'0000000	0'00	1'0000
a ₂₃	0'0000250	1	0'0000250	0'06	0'8237
a ₂₄	0'0002250	1	0'0002250	0'52	0'5168
a ₃₄	0'0324000	1	0'0324000	75'35	0'0010
a ₁₁	0'0094425	1	0'0094425	21'49	0'0098
a ₂₂	0'0132179	1	0'0132179	30'74	0'0052
a ₃₃	0'0338620	1	0'0338620	78'75	0'0009
a ₄₄	0'0386399	1	0'0386399	89'86	0'0007
Fallo de ajuste	0'0025548	10	0'0002555	0'59	0'7704
Error Puro	0'0017200	4	0'0004300		
Total	0'1007862	28			

Tabla n° V-15.- *Valoración del diseño experimental para el sistema ANOVA - Brij-35 - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Coeficientes		
a ₁ = 23418'8		
a ₂ = 79'2101		
a ₃ = 740'113		
a ₄ = 459'415		
a ₁₂ = 95238'1		
a ₁₃ = -476190	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
a ₁₄ = 3'24249·10 ⁻⁵	[Brij-35] = 8'80·10 ⁻⁵ M	A ₁ < 0
a ₂₃ = -400	[TlNO ₃] = 8'18·10 ⁻² M	A ₂ > 0
a ₂₄ = 3000	[Na ₂ SO ₃] = 5'00·10 ⁻³ M	A ₃ < 0
a ₃₄ = 450000	[H ₂ SO ₄] = 1'60·10 ⁻³ M	A ₄ > 0
a ₁₁ = -1'64002·10 ⁸		Es un máximo
a ₂₂ = -553'545		
a ₃₃ = -138436		
a ₄₄ = -924252		
a = -6'157		

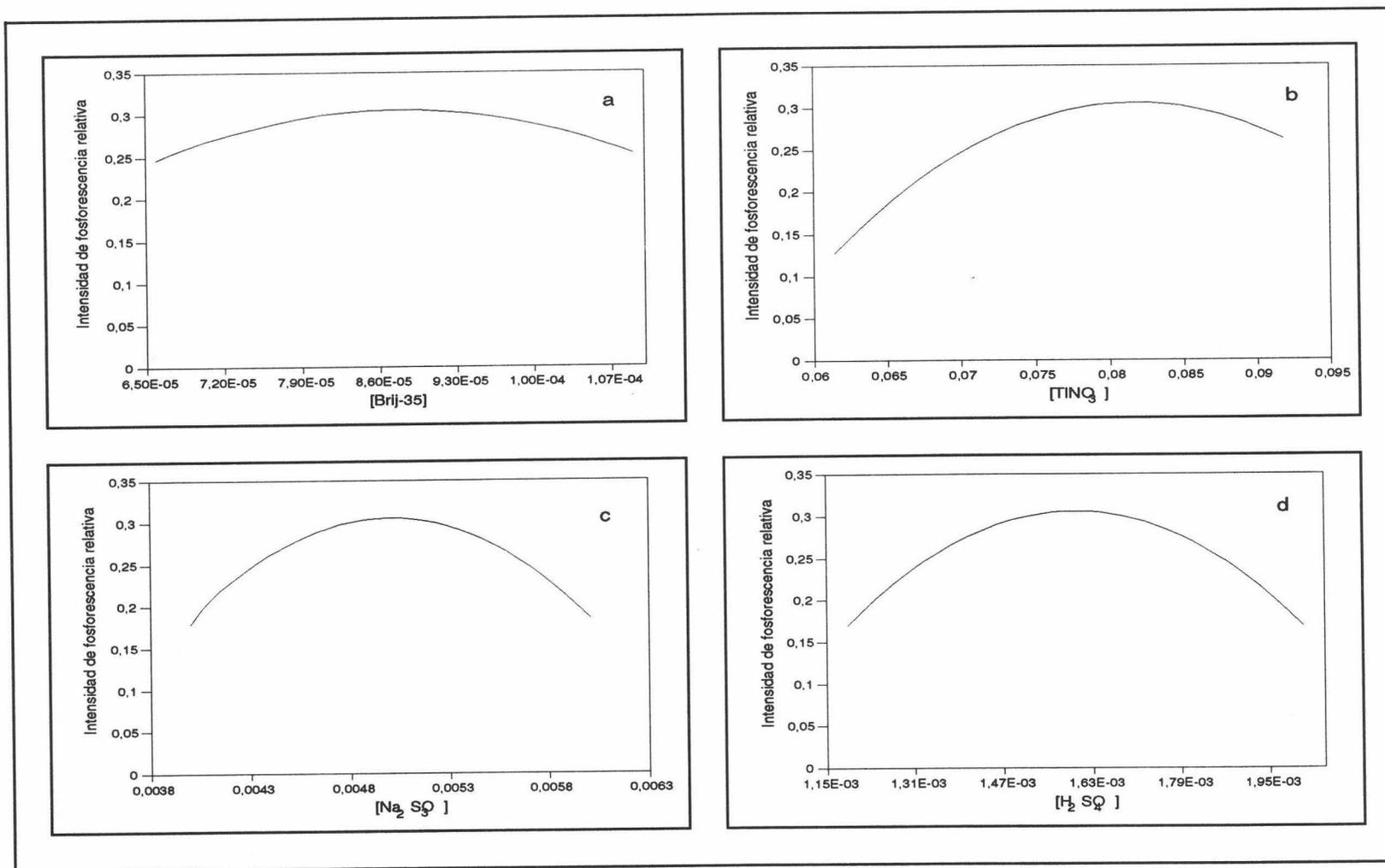


Figura n° V-14.- Variación de la intensidad de fosforescencia del ANOA con la [Brij-35] (a), [TiNO₃] (b), [Na₂SO₃] (c) y la [H₂SO₄] (d). [ANOA] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 30 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

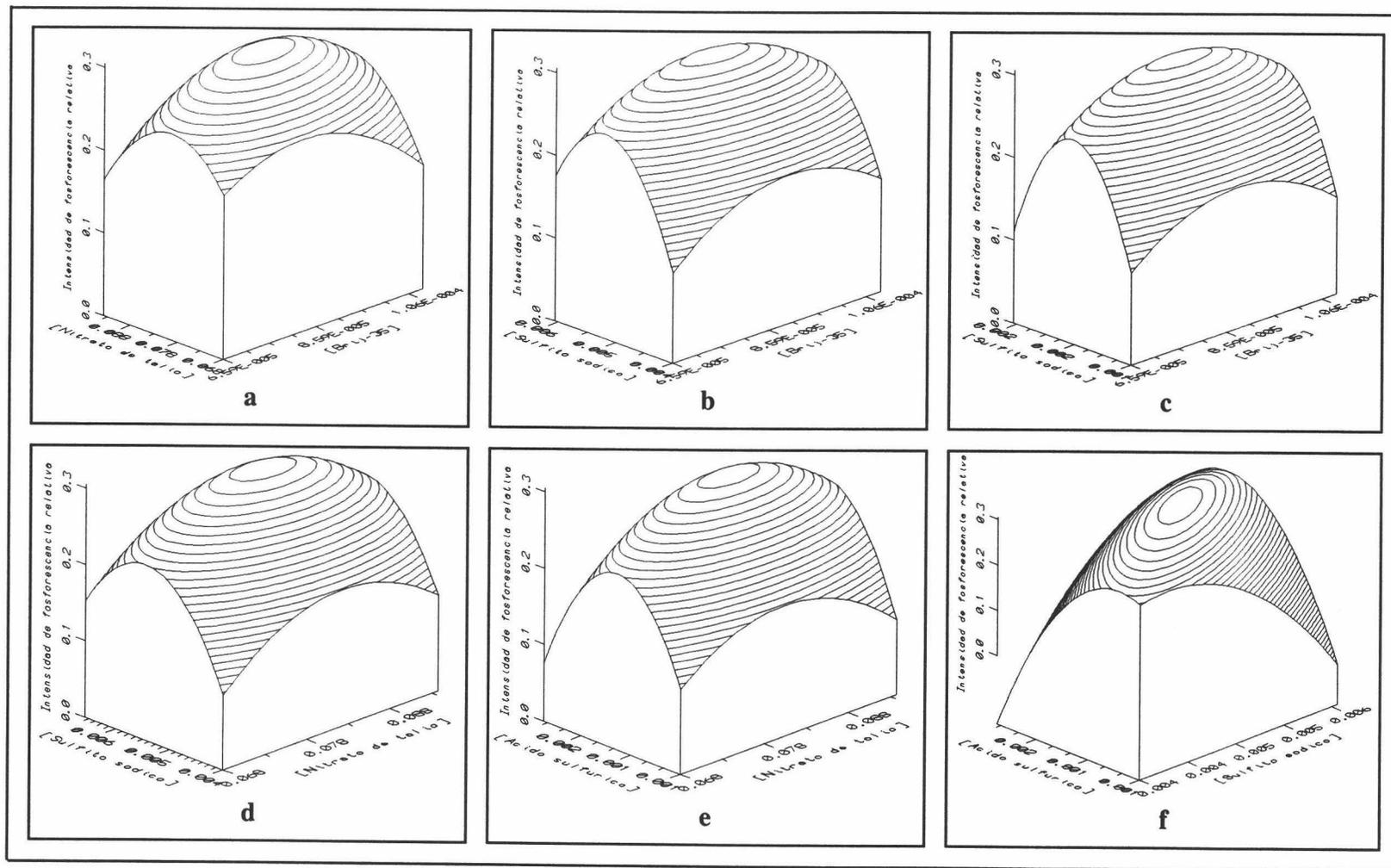


Figura n° V-15.- Variación de la intensidad de fosforescencia con [Brij-35] y $[TiNO_3]$ (a), [Brij-35] y $[Na_2SO_3]$ (b), [Brij-35] y $[H_2SO_4]$ (c), $[TiNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TiNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). [ANOVA] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 30 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

2.1.1. Selección del sistema de trabajo.

Establecidas las concentraciones óptimas de los reactivos experimentales para cada uno de los sistemas estudiados, se procedió a la selección del mejor sistema para el desarrollo del método fosforimétrico para el ANOA. Para ello se prepararon tres muestras utilizando los siguientes procedimientos operatorios:

- Muestra 1: A 50 μl de una disolución madre de ANOA $4'95 \cdot 10^{-4}$ M en SDS 0'5 M, se le añadieron 602 μl de SDS 0'5 M, 1060 μl de TlNO_3 0'25 M, 503 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 805 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml.
- Muestra 2: A 50 μl de una disolución madre de ANOA $4'95 \cdot 10^{-4}$ M en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, se le añadieron 762 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 μl de TlNO_3 0'25 M, 502 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml.
- Muestra 3: A 50 μl de una disolución madre de ANOA $4'95 \cdot 10^{-4}$ M en Brij-35 $7'0 \cdot 10^{-4}$ M, se le añadieron 1257 μl de Brij-35 $7'0 \cdot 10^{-4}$ M, 3268 μl de TlNO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml.

Se procedió al registro de los espectros de emisión de cada una de las muestras a las siguientes condiciones instrumentales: λ_{exc} 282 nm, emisión de 430 a 700 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, t_{dig} 100/500 μs , m.p.f. 30 ms y sensibilidad 1100 V. Dichos espectros se presentan en la Figura nº V-16. De esta figura se deduce que la mayor intensidad de fosforescencia, para unas mismas condiciones instrumentales, se obtiene para el sistema ANOA - TX-100 - TlNO_3 - Na_2SO_3 - H_2SO_4 , por lo que resultó ser el más apropiado para el resto del trabajo experimental.

Igualmente, al comparar las curvas de decaimiento fosforescente de las muestras preparadas anteriormente, los resultados son muy similares. Dichas curvas se registraron a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, entre 0 a 2000 μs , con una resolución de 50 μs , 100 repeticiones y sensibilidad 1100 V. La representación gráfica se presenta en la Figura nº V-17.

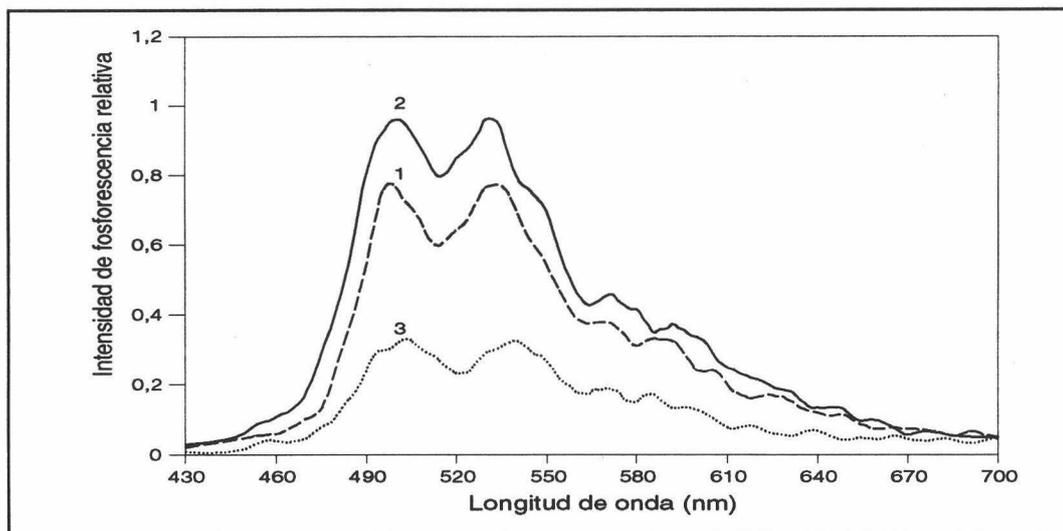


Figura n° V-16.- *Espectros de emisión:* (1) [ANOA] 500 ng/ml, [SDS] $3'01 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'66 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'04 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'61 \cdot 10^{-3}$ M; (2) [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, [TlNO₃] $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M; (3) [ANOA] 500 ng/ml, [Brij-35] $8'80 \cdot 10^{-5}$ M, [TlNO₃] $8'18 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

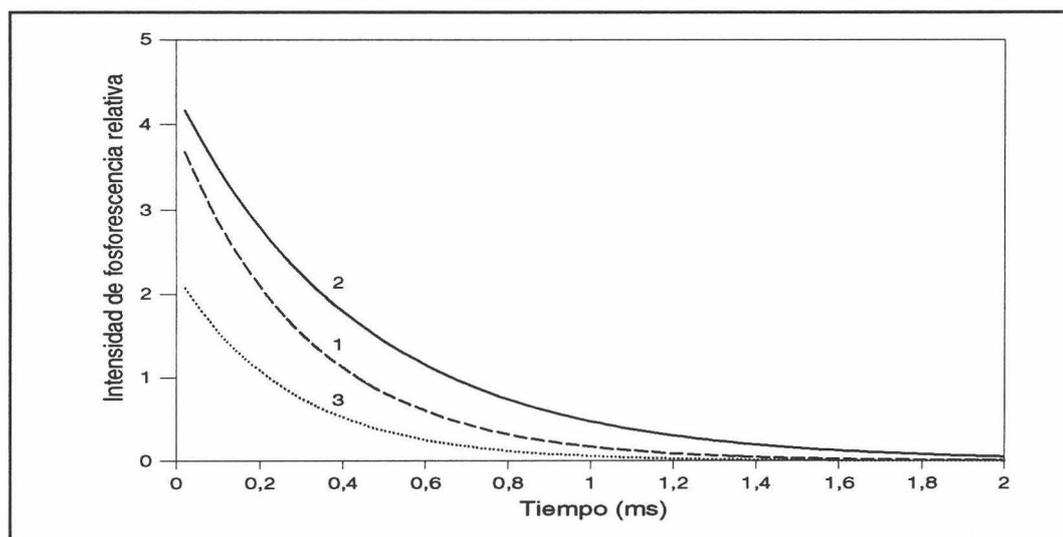


Figura n° V-17.- *Curvas de decaimiento fosforescente:* (1) [ANOA] 500 ng/ml, [SDS] $3'01 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'66 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'04 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'61 \cdot 10^{-3}$ M; (2) [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, [TlNO₃] $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M; (3) [ANOA] 500 ng/ml, [Brij-35] $8'80 \cdot 10^{-5}$ M, [TlNO₃] $8'18 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

El ajuste de dichas curvas de decaimiento a una exponencial conduce al cálculo del parámetro vida media para el ácido β -naftiloxicético en este tipo de sistemas cuyo valor es de 318, 450 y 275 μs para el sistema ANOA/SDS, ANOA/TX-100 y ANOA/Brij-35 respectivamente.

2.2. Optimización del volumen de muestra.

El estudio consistió en el registro de la intensidad de fosforescencia con el tiempo de dos muestras preparadas siguiendo el procedimiento operatorio que se describe a continuación: A una alícuota de 50 μl de disolución madre $4'95 \cdot 10^{-4}$ de ANOA en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M se le añadió 762 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 μl de TlNO_3 0'25 M, 502 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada. De esta muestra se introdujeron dos volúmenes dentro de la cubeta de medida, 1'5 y 4 ml respectivamente, que son los volúmenes mínimo y máximo que se pueden introducir registrando la intensidad de fosforescencia emitida a $\lambda_{\text{exc/em}}$ de 282/500 nm, rendijas $_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 100/500 μs y sensibilidad 1100 V. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura nº V-18.

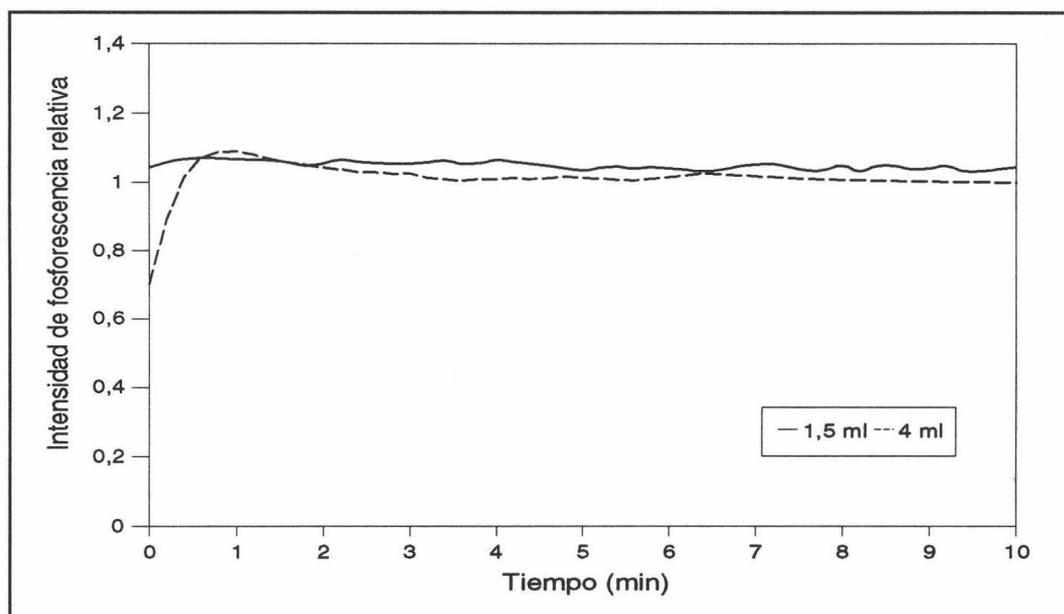


Figura nº V-18.- *Influencia del volumen de muestra. [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, [TlNO_3] $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, [Na_2SO_3] $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y [H_2SO_4] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

A pesar de que existe una pequeña diferencia en el tiempo de estabilización de la señal fosforescente al utilizar 4 ml de muestra, ésta no es significativa, por lo que se puede concluir que el volumen de muestra en este sistema afecta muy poco a la señal, a diferencia de los sistemas estudiados anteriormente. Este hecho se debe a que el método propuesto se desarrolla en concentraciones de agente micelar muy por debajo de la c.m.c. (0'07 c.m.c.) y a que la concentración óptima de TINO_3 es mayor que para los métodos propuesto anteriormente, con lo cual se favorece la aparición de la señal fosforescente. Por tanto, para el resto del trabajo experimental, se consideró óptimo el siguiente volumen de muestra:

Volumen muestra: 1'5 ml

2.3. Influencia del orden de adición.

Se estudiaron distintos órdenes de adición de los distintos reactivos que intervienen en el sistema, no observándose diferencias significativas entre ellos. Para llevar a cabo este estudio, se mezclaron en distintos órdenes: Una alícuota de 50 μl de disolución madre $4'95 \cdot 10^{-4}$ de ANOA en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 762 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 μl de TINO_3 0'25 M, 502 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada. A estas muestras se les registró la intensidad de fosforescencia emitida a $\lambda_{\text{exc/em}}$ de 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 100/500 μs y sensibilidad 1100 V. Los resultados se recogen en la Tabla nº V-16.

Tabla nº V-16.- Influencia del orden de adición.

Orden de adición	$I_{\text{Fosf.}}$
ANOA + TX-100 + TINO_3 + H_2SO_4 + Na_2SO_3 + H_2O	1'05
ANOA + TINO_3 + TX-100 + Na_2SO_3 + H_2SO_4 + H_2O	1'03
ANOA + TINO_3 + H_2SO_4 + Na_2SO_3 + TX-100 + H_2O	1'03
ANOA + H_2SO_4 + TINO_3 + TX-100 + Na_2SO_3 + H_2O	1'02
ANOA + TX-100 + H_2SO_4 + TINO_3 + Na_2SO_3 + H_2O	1'06
TINO_3 + H_2SO_4 + TX-100 + Na_2SO_3 + ANOA + H_2O	1'03
TX-100 + Na_2SO_3 + H_2SO_4 + ANOA + TINO_3 + H_2O	1'05
TINO_3 + ANOA + H_2SO_4 + Na_2SO_3 + TX-100 + H_2O	1'00

El orden de adición elegido para el resto del trabajo experimental fue:

ANOA + TX-100 + TINO_3 + Na_2SO_3 + H_2SO_4 + H_2O

2.4. Influencia de la temperatura.

Para llevar a cabo este estudio, a una muestra preparada siguiendo el procedimiento del apartado anterior, se le registró la variación de la intensidad de fosforescencia con la temperatura a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, t_{dlg} 100/500 μs , m.p.f. 30 ms y sensibilidad 1100 V. Este estudio se muestra en la Figura n° V-19.

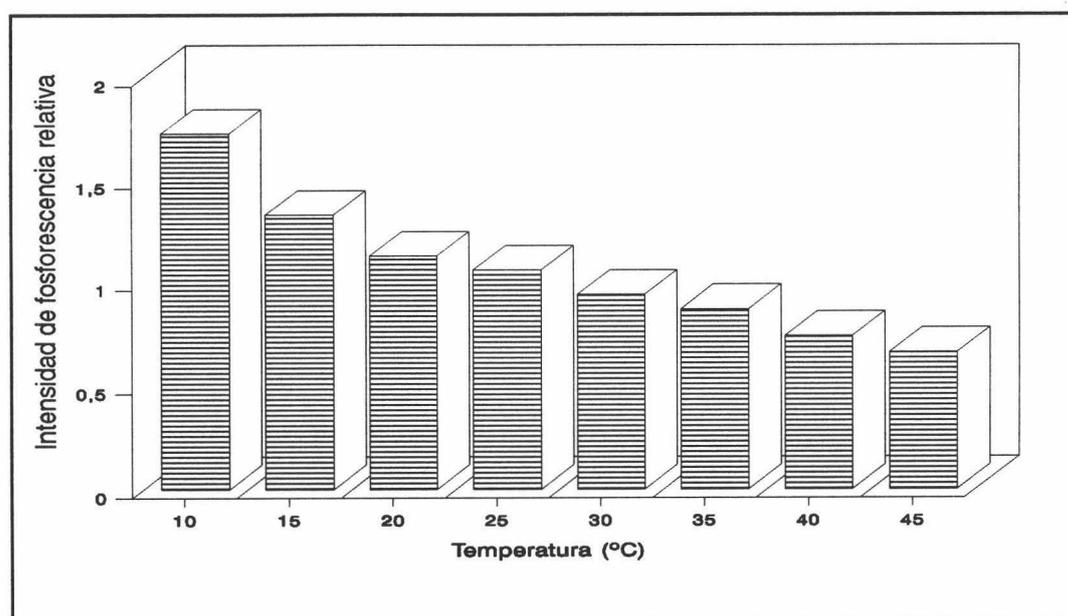


Figura n° V-19.- *Influencia de la temperatura en la intensidad de fosforescencia. [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, [TINO₃] $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

La intensidad de fosforescencia depende de la temperatura ambiente, por ello es necesario controlarla de una forma precisa. Por tanto, para el resto del trabajo experimental la cubeta de medida se termostató a una temperatura de:

Temperatura: 25 °C

2.5. Estabilidad con el tiempo.

Una variable importante a la hora de establecer un método es el tiempo de estabilidad de la señal fosforescente. Para llevar a cabo esta experiencia, se utilizó el siguiente procedimiento operatorio: A una alícuota de 50 μl de disolución madre $4'95 \cdot 10^{-4}$ de ANOA en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M se le añadió 762 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 μl de TINO_3 0'25 M, 502 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, de esta muestra se introdujeron 1'5 ml dentro de la cubeta de medida registrando la intensidad de fosforescencia emitida a $\lambda_{\text{exc/em}}$ de 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 100/500 μs y sensibilidad 1100 V. La curva de intensidad de fosforescencia en función del tiempo se muestra en la Figura n° V-20.

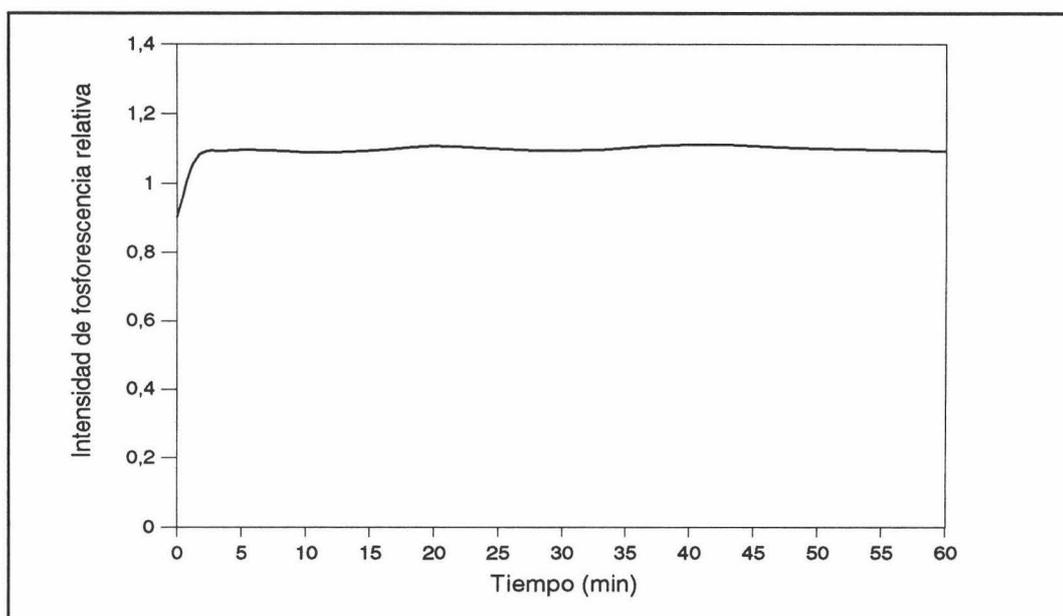


Figura n° V-20.- Estabilidad con el tiempo. [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, [TINO_3] $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, [Na_2SO_3] $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y [H_2SO_4] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

Como se observa en esta figura, la señal analítica, tras un tiempo de aproximadamente 2 minutos, permanece estable al menos durante una hora, tiempo suficiente para realizar las medidas analíticas.

2.6. Influencia de la concentración de analito.

El estudio de la influencia de la concentración de analito permite determinar de una forma precisa el rango dinámico lineal donde se puede desarrollar el método. Para realizar este estudio se adicionaron a distintas alícuotas de disolución madre $4'95 \cdot 10^{-4}$ de ANOA en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 762 μ l de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 μ l de $TiNO_3$ $0'25$ M, 500 μ l de Na_2SO_3 $0'1$ M y H_2SO_4 $0'02$ M, enrasando a 10 ml con agua destilada, de forma que la concentración variara entre 0 y 875 ng/ml. De estas muestras se introdujeron 1'5 ml dentro de la cubeta de medida registrando la intensidad de fosforescencia emitida a $\lambda_{exc/em}$ de 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 100/500 μ s, m.p.f. 30 ms y sensibilidad 1100 V. La representación gráfica de este estudio se refleja en la Figura n° V-21.

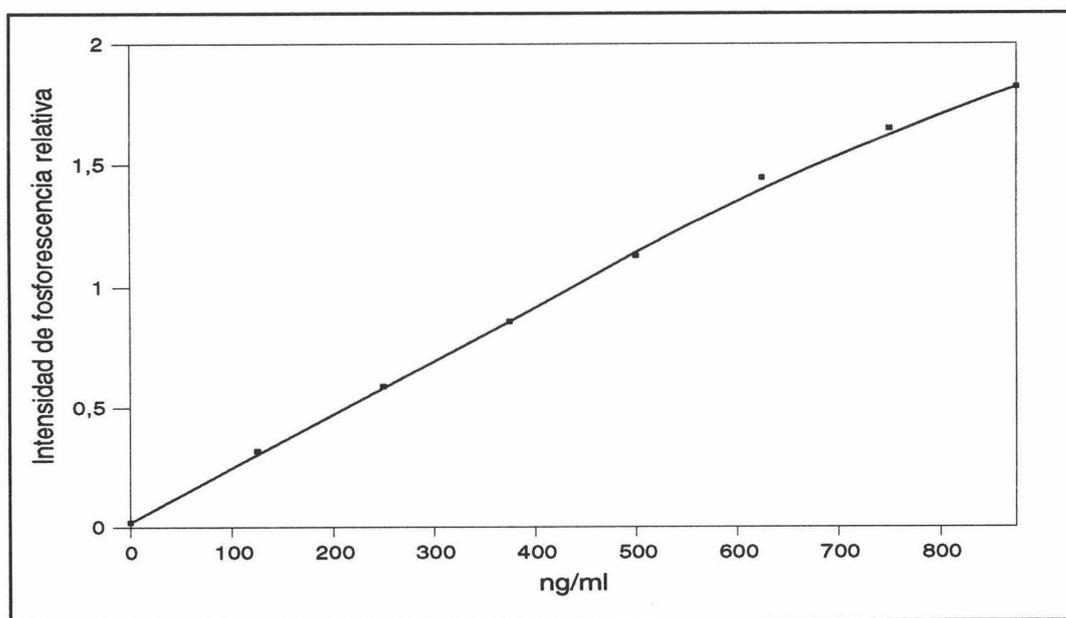


Figura n° V-21.- Influencia de la concentración de analito. $[TX-100]$ $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, $[TiNO_3]$ $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

De este estudio se deduce que existe un amplio rango de linealidad para la señal analítica frente a la concentración de ANOA, que comprende desde una concentración de 0 a 625 ng/ml, a partir de la cual la variación de la respuesta con la concentración deja de ser lineal.

Rango dinámico lineal: 0-625 ng/ml

3. Selección de parámetros instrumentales.

Optimizadas las variables experimentales se procedió a establecer los parámetros instrumentales que afectan a la emisión fosforescente. Entre ellos se pueden destacar:

- 1.- Mínimo período de flash de la lámpara de pulso (m.p.f.)
- 2.- Longitud de onda de excitación
- 3.- Incremento de longitud de onda de los espectros sincrónicos
- 4.- Características espectroscópicas

3.1. Optimización del mínimo período de flash.

Para llevar a cabo la optimización del m.p.f. se utilizó la siguiente metodología: Se preparó una muestra conteniendo 500 ng/ml de ANOA, $1'53 \cdot 10^{-5}$ M de TX-100, $6'74 \cdot 10^{-2}$ M de $TlNO_3$, $5'02 \cdot 10^{-3}$ M de Na_2SO_3 y $1'60 \cdot 10^{-3}$ M de H_2SO_4 ; de esta muestra se introdujeron 1'5 ml en la cubeta de medida, iluminándola continuamente con una lámpara de pulso a distintos períodos de pulso. La emisión fosforescente es registrada en función del tiempo a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 100/500 μs y sensibilidad 1100 V. Dicho estudio se refleja en la Figura n° V-22.

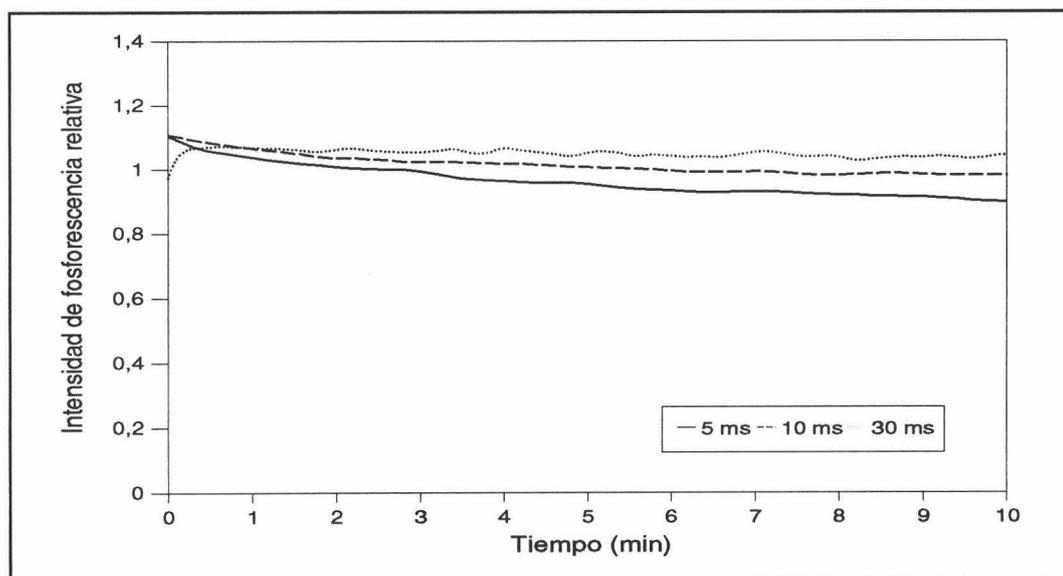


Figura n° V-22.- Optimización del m.p.f.. [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, [$TlNO_3$] $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, [Na_2SO_3] $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y [H_2SO_4] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

La cinética de estabilización de la señal es muy rápida por lo que no sería necesario trabajar a la máxima velocidad de pulso. Sin embargo, es conveniente realizar este estudio puesto que como se observa en la Figura nº V-22, a la velocidad de la lámpara de pulso de 5 ms, se produce un pequeño decaimiento de la señal con el tiempo. Por ello es aconsejable trabajar a velocidades más pequeñas aunque con ello se pierda algo reproducibilidad en la señal. Por lo tanto para el resto del trabajo experimental se seleccionó un período para la lámpara de pulso de:

m.p.f.: 30 ms

3.2. Optimización de la longitud de onda de excitación.

La otra posibilidad de disminuir los tiempos de medida utilizando distintas longitudes de onda de excitación, no fue necesario para este tipo de sistema puesto que, a las condiciones experimentales e instrumentales hasta ahora establecidas, los tiempos de medida son prácticamente instantáneos, por lo que se utilizó, en todos los casos, la longitud de onda de 282 nm, como longitud de onda de excitación.

3.3. Optimización del incremento de longitud de onda.

La optimización del incremento de longitud de onda es necesario para el posterior desarrollo de métodos sincrónicos y sincrónico-derivados. Para llevar a cabo esta optimización: *A una alícuota de 50 µl de disolución madre $4.95 \cdot 10^{-4}$ de ANOA en TX-100 $2.0 \cdot 10^{-4}$ M se le añadió 762 µl de TX-100 $2.0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 µl de $TiNO_3$ 0.25 M, 502 µl de Na_2SO_3 0.1 M y 800 µl H_2SO_4 0.02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, registrando distintos barridos sincrónicos con rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 100/500 µs, m.p.f. 30 ms y sensibilidad 1100 V. El barrido de incrementos de longitud de onda se realizó entre 210 y 280 nm, a intervalos de 10 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura nº V-23.*

Se comprueba que el pico más intenso se obtiene para un incremento de longitud de onda de 230 nm, sin embargo en todos los casos se obtiene un hombro debido a que tanto el espectro de excitación como de emisión tienen dos máximos. Por tanto se eligió

como incremento de longitud de onda óptimo para el desarrollo de los métodos sincrónico y sincrónico-derivados un valor de:

$$\Delta\lambda: 230 \text{ nm}$$

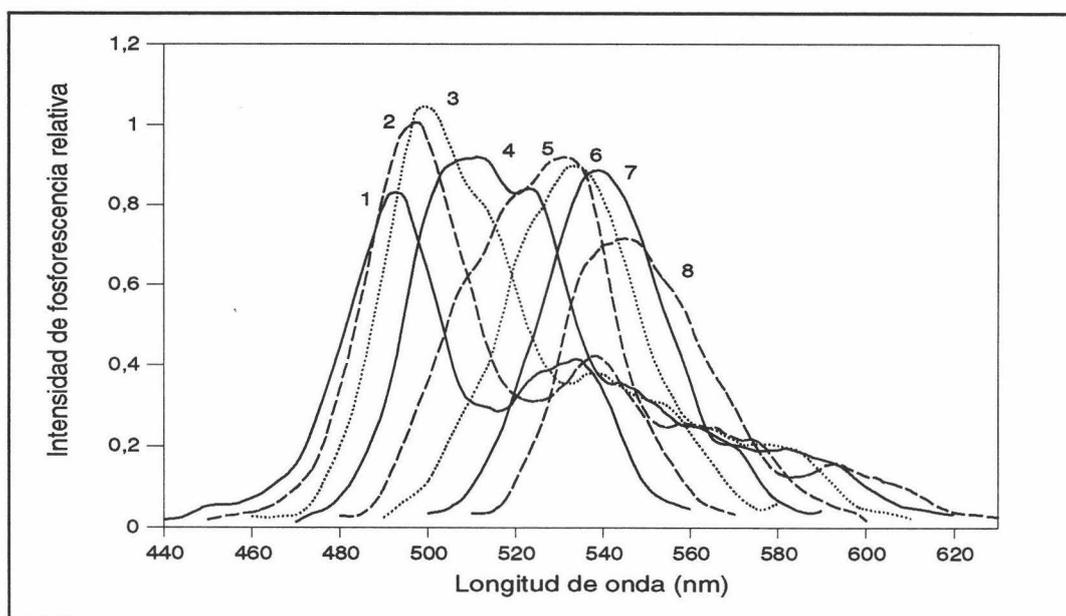


Figura n° V-23.- *Optimización del incremento de longitud de onda para espectros sincrónicos. (1) 210, (2) 220, (3) 230, (4) 240, (5) 250, (6) 260, (7) 270 y (8) 280 nm. [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, [TINO₃] $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

3.4. Características espectroscópicas.

Conocido el incremento de longitud de onda óptimo, se registraron los distintos espectros de emisión, sincrónicos y sincrónico-derivados característicos del ANOA en estas condiciones experimentales. Para ello, a una alícuota de 50 μl de disolución madre $4'95 \cdot 10^{-4}$ de ANOA en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M se le añadió 762 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 μl de TINO₃ 0'25 M, 502 μl de Na₂SO₃ 0'1 M y 800 μl H₂SO₄ 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, de esta muestra se introdujeron 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se le registraron los espectros de emisión, sincrónicos y sincrónico-derivados a las siguientes condiciones instrumentales: rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 100/500 μs , m.p.f. 30 ms y sensibilidad 1100 V. Éstos se presentan en la Figura n° V-24 junto a los espectros

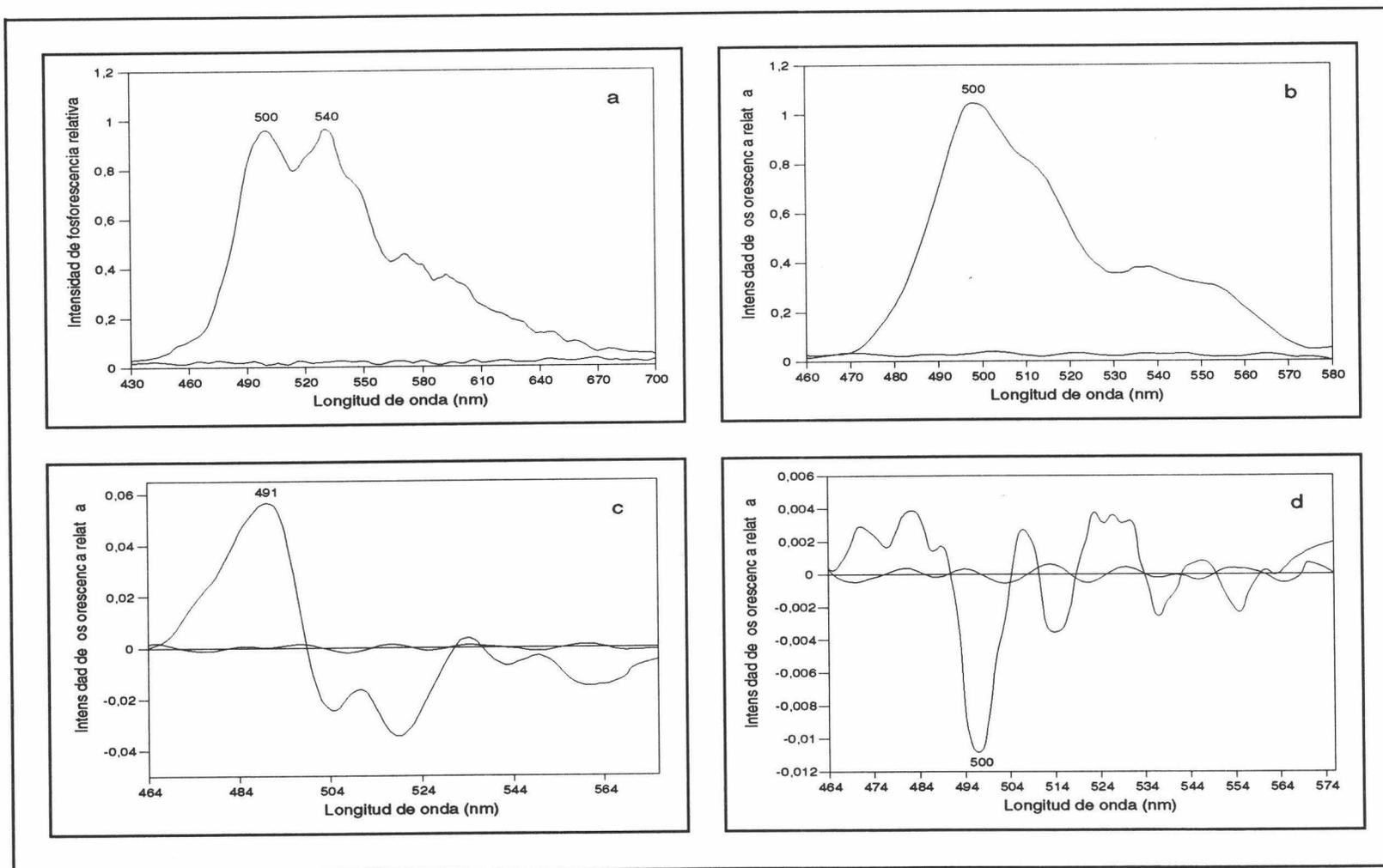


Figura n° V-24.- Espectros de emisión (a), sincrónico (b), 1ª derivada sincrónica (c) y 2ª derivada sincrónica (d) con sus respectivos blancos. [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^{-5}$ M, [TlNO₃] $6'74 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'02 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M. λ_{exc} 282 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 30 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.

de un blanco registrado en las mismas condiciones experimentales e instrumentales pero sin contener ANOA.

3.5. *Parámetros instrumentales establecidos.*

Un resumen esquemático de los parámetros instrumentales establecidos a lo largo de la optimización, se resumen en la Tabla nº V-17.

Tabla nº V-17.- *Parámetros instrumentales establecidos.*

Longitudes de onda de excitación/emisión	
Fluorescencia	282/346 nm
Fosforescencia	282/500 nm
Longitudes de onda espectros sincrónico y sincrónico-derivados	
Sincrónico	500 nm
1ª derivada	491 nm
2ª derivada	500 nm
Rendijas de excitación/emisión	16/16 nm
Mínimo período de pulso de la lámpara	30 ms
Velocidad de barrido de los espectros	2 nm/s
Incremento de longitud de onda	230 nm
Tiempo de decaimiento	100 μ s
Tiempo de integración	500 μ s
Sensibilidad del detector	1100 V

4. *Establecimiento del método analítico.*

4.1. *Procedimiento operatorio.*

En un matraz de 10 ml se colocan alícuotas de una disolución $4'95 \cdot 10^{-4}$ M de ANOA en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, de forma que la concentración de la disolución variase entre 0 y 625 ng/ml, y se le añaden 762 μ l de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 502 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada. De esta disolución, así preparada, se adicionan 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso con un período de 30 ms a

la longitud de onda de 282 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide 1 minuto después de empezar a irradiar a 500 nm de longitud de onda de emisión con t_d 100 μ s, t_g 500 μ s y sensibilidad 1100 V. El espectro sincrónico se registra, a las mismas condiciones instrumentales, con un incremento de longitud de onda de 230 nm desde 460 a 580 nm, midiendo la intensidad de fosforescencia a 500 nm. Derivando este espectro sincrónico se obtiene la 1ª y 2ª derivada sincrónica cuyos máximos de emisión son 491 y 500 nm, respectivamente.

4.2. Rectas de calibrado.

Se proponen cuatro métodos fosforimétricos, uno de emisión directa, otro sincrónico, otro utilizando un máximo de la primera derivada sincrónica y otro mediante la segunda derivada sincrónica. Para el establecimiento de los parámetros de fiabilidad se han obtenido rectas de calibrado a partir de una serie de réplicas de distintos patrones distribuidos a lo largo del rango dinámico lineal establecido, incluyendo el blanco. Los datos de las rectas de calibrado de los cuatro métodos en estudio se reflejan en las Tablas nº V-18, 19, 20 y 21. En la Figura nº V-25 se recogen los espectros obtenidos.

Tabla nº V-18.- Réplicas del calibrado del método directo.

ng/ml	$I_{\text{Fosf.}}$	$I_{\text{Fosf.}}$	$I_{\text{Fosf.}}$
0	$2'46 \cdot 10^{-2}$	$1'30 \cdot 10^{-2}$	$2'10 \cdot 10^{-2}$
125	0'311	0'340	0'300
250	0'598	0'546	0'621
375	0'885	0'850	0'837
500	1'171	1'132	1'094
625	1'458	1'402	1'504

Tabla nº V-19.- Réplicas del calibrado del método sincrónico.

ng/ml	$I_{\text{Fosf.}}$	$I_{\text{Fosf.}}$	$I_{\text{Fosf.}}$
0	$1'78 \cdot 10^{-2}$	$2'10 \cdot 10^{-2}$	$1'50 \cdot 10^{-2}$
125	0'312	0'332	0'274
250	0'585	0'541	0'602
375	0'858	0'817	0'874
500	1'133	1'117	1'200
625	1'407	1'432	1'379

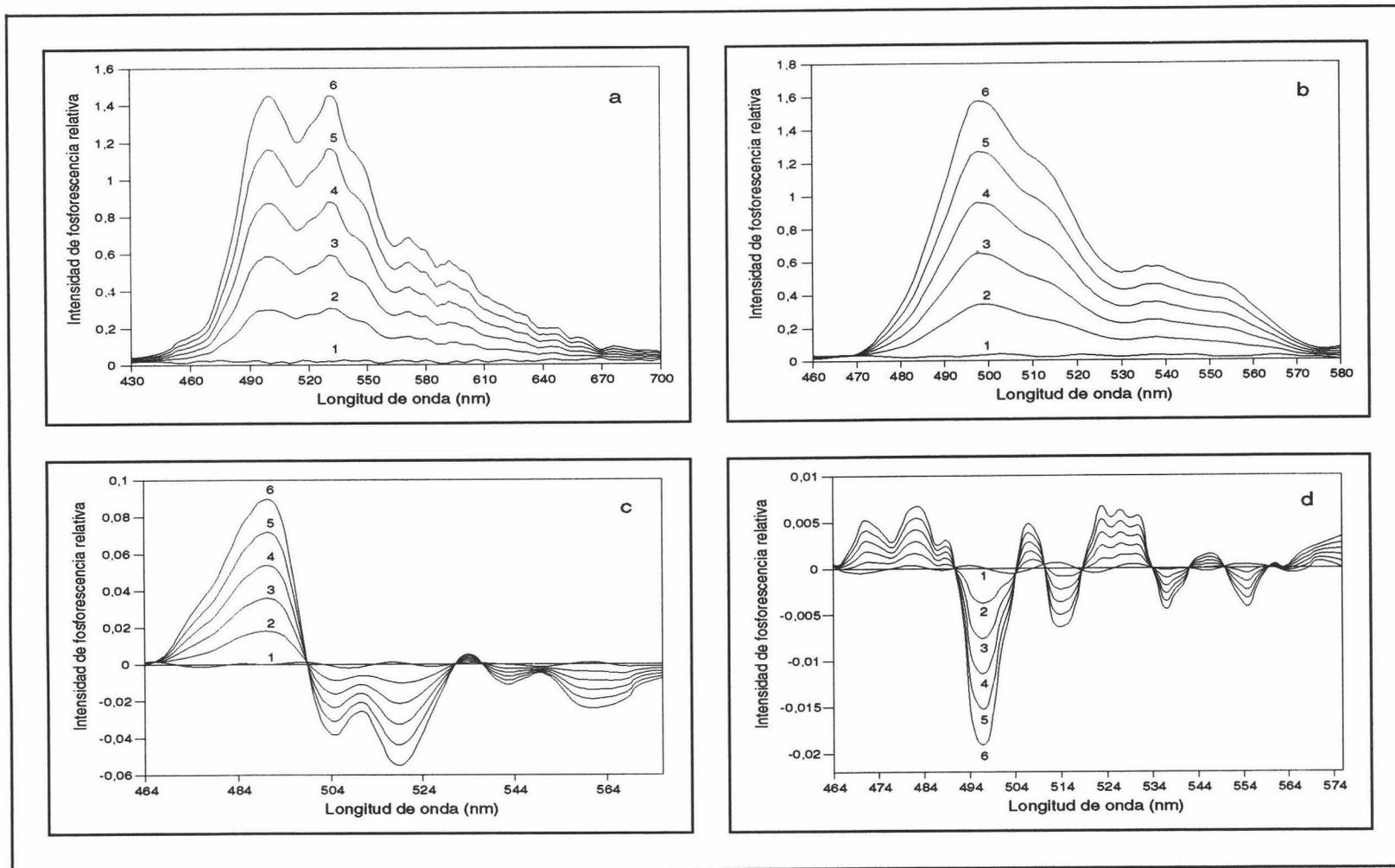


Figura n^o V-25.- *Calibrados de emisión (a), sincrónico (b), 1^a derivada sincrónica (c) y 2^a derivada sincrónica (d). (1) Blanco, (2) 125, (3) 250, (4) 375, (5) 500 y (6) 625 ng/ml. [ANOA] 500 ng/ml, [TX-100] $1'53 \cdot 10^5$ M, [TiNO₃] $6'74 \cdot 10^2$ M, [Na₂SO₃] $5'02 \cdot 10^3$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^3$ M. $\lambda_{exc/em}$ 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 30 ms, $t_{d/g}$ 100/500 μ s y sensibilidad 1100 V.*

Tabla n° V-20.- Réplicas del calibrado del método 1ªD'.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	1'74·10 ⁻³	1'40·10 ⁻³	1'00·10 ⁻³
125	0'016	0'014	0'018
250	0'031	0'027	0'033
375	0'047	0'044	0'051
500	0'062	0'068	0'070
625	0'077	0'079	0'083

Tabla n° V-21.- Réplicas del calibrado del método 2ªD.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	4'36·10 ⁻⁴	5'17·10 ⁻⁴	6'12·10 ⁻⁴
125	4'10·10 ⁻³	3'80·10 ⁻³	4'41·10 ⁻³
250	7'78·10 ⁻³	7'05·10 ⁻³	8'24·10 ⁻³
375	1'14·10 ⁻²	1'06·10 ⁻²	1'19·10 ⁻²
500	1'51·10 ⁻²	1'77·10 ⁻²	1'45·10 ⁻²
625	1'88·10 ⁻²	1'80·10 ⁻²	1'98·10 ⁻²

Los datos estadísticos obtenidos para las cuatro rectas en estudio, se resumen en la Tabla n° V-22.

Tabla n° V-22.- Datos estadísticos de las rectas de calibrado.

Parámetros estadísticos	D	S	1ªD	2ªD
Ordenada en el origen (a)	0'022	0'022	0'0002	0'0004
Desviación estándar (s _a)	0'0135	0'0114	0'0012	0'0003
Desviación estándar relativa (DER(a)) (%)	61'97	53'10	623'25	83'89
Pendiente (b)	0'0023	0'0022	0'0001	0'0001
Desviación estándar (s _b)	0'00001	0'00001	0'00001	0'00001
Desviación estándar relativa (DER(b)) (%)	1'57	1'35	2'56	2'97
Desviación estándar de regresión (S _{R,c})	0'0322	0'0273	0'0030	0'0008
Coefficiente de correlación (r)	0'9980	0'9985	0'9948	0'9930
Coefficiente de determinación (r ²) (%)	99'61	99'71	98'96	98'61
g	0'0011	0'0008	0'0029	0'0040

Los mejores parámetros estadísticos se obtienen para los métodos sincrónico y directo, con un coeficiente de correlación de 0'9985 y 0'9980, respectivamente.

4.3. *Parámetros de fiabilidad.*

Los parámetros de fiabilidad del método: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido establecidos mediante el modelo de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado. La sensibilidad analítica, así como la linealidad son establecidas mediante el uso de los datos derivados del calibrado, reflejados en las Tablas nº V-13, V-14, V-15 y V-16. Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar tanto de los blancos como de los patrones usados para el establecimiento de las rectas de calibrado. Los datos de dichas desviaciones estándar se muestran en la Tabla nº V-23.

Tabla nº V-23.- Desviaciones estándar en función del calibrado

ng/ml	D	S	1ªD ¹	2ªD
0	10'16	8'73	16'40	19'11
125	9'33	8'03	15'24	17'68
250	8'94	7'68	14'58	16'88
375	8'93	7'67	14'52	16'85
500	9'32	8'07	15'38	17'82
625	10'23	8'70	16'46	19'09

La estimación de todos los parámetros característicos del método, calculados a partir del modelo de análisis de la regresión se reflejan en la Tabla nº V-24.

Tabla nº V-24.- Parámetros de fiabilidad.

Parámetro	D	S	1ªD	2ªD	
Linealidad (1-DER(b)%)	98'42	98'64	97'44	97'03	
Sensibilidad analítica (ng/ml)	14'25	12'24	23'17	26'89	
Límite de detección (ng/ml)	30'49	26'20	49'21	57'33	
Límite de cuantificación (ng/ml)	101'16	87'34	164'05	191'12	
Rango dinámico lineal (ng/ml)	101-625	87-625	164-625	191-625	
Precisión (DER%)	125 ng/ml	7'15	6'29	11'36	14'22
	250 ng/ml	3'57	3'09	6'20	6'90
	375 ng/ml	2'42	2'06	3'95	4'60
	500 ng/ml	1'90	1'59	2'97	3'46
	625 ng/ml	1'61	1'40	2'65	3'08

Mediante la representación gráfica de los valores de precisión para cada uno de los valores de concentración del calibrado, es posible por interpolación, estimar la DER (%) para cualquier valor de concentración, dentro del rango lineal.

Las mejores características analíticas se obtienen para el método sincrónico y directo en este orden. Los resultados son menos satisfactorios conforme se aumenta el grado de derivación del espectro sincrónico.

4.4. Estudio de interferencias.

Con el fin de comprobar la aplicabilidad del método propuesto para la determinación de ANOA en manzanas, donde es interesante su cuantificación, se ha estudiado el efecto que ejerce la presencia de otras fitohormonas e insecticidas, comúnmente encontrados en esta matriz, ejercen en su determinación espectrofotométrica.

Para llevar a cabo dicho estudio se ha preparado una muestra añadiendo a una alícuota de 50 μl de disolución madre $4'95 \cdot 10^{-4}$ de ANOA en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M distintas cantidades de diversas fitohormonas e insecticidas, 762 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2692 μl de TINO_3 0'25 M, 502 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada. A esta muestra se le registró la intensidad de fosforescencia emitida a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ de 282/500 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 100/500 μs y sensibilidad 1100 V.

Las tolerancias de las distintas sustancias ensayadas, calculadas aplicando el procedimiento expuestos en la parte de "Reactivos, instrumentación y metodología", se resumen en la Tabla n° V-25.

Los mayores niveles de tolerancia del método se obtienen para la carbendazima mientras que los más pequeños son para el 2-(4-thiazolil)-benzimidazol. De los cuatro métodos propuestos es el método directo y, sobre todo, la segunda derivada sincrónica los que muestran mayores niveles de tolerancia para los interferentes estudiados, sin embargo como éste último posee peores parámetros de fiabilidad, la utilización de uno u otro dependería del caso particular en estudio.

Tabla n° V-25.- Nivel de tolerancia de sustancias extrañas.

Interferente	Nivel de tolerancia (ng/ml)			
	D	S	1ªD	2ªD
Carbendazima	12000	12000	12000	12000
3-Amino-1,2,4-triazol	12000	12000	1500	1500
Ácido p-clorofenoxiacético	10500	8850	8600	8500
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	6500	5000	1700	1500
α -Naftol	250	250	250	250
2-Aminofenol	20	20	20	20
2-(4-Thiazolil)-benzimidazol	20	10	15	40

5. Aplicaciones.

5.1. Determinación en manzanas.

La determinación de ANOA en manzanas se llevó a cabo mediante estudios de recuperación según el procedimiento operatorio siguiente: *Se trocean 250 g de manzanas con un procesador de alimentos y se transfieren 15 g a un mortero (o una taza mezcladora). Se adicionan 25 ml de acetona conteniendo 0'3 ml de ácido ortofosfórico y una cierta cantidad de ANOA y se mezclan durante varios minutos, se filtra bajo succión y se lava el filtrado con tres porciones de 5 ml de acetona. Se transfiere el filtrado y lavados a un matraz de 50 ml y se enrasa con acetona. A una alícuota de esta disolución de 1 ml, a la cual se le evapora la acetona mediante el paso de N₂, se le aplica el procedimiento operatorio general propuesto para el método. Los resultados se muestran en la Tabla n° V-26.*

Las recuperaciones obtenidas para los cuatro métodos propuestos están, en todos los casos, alrededor del 100 %, si bien los mejores resultados se obtienen para la primera derivada sincrónica y para el método sincrónico y directo en este orden.

Basándose en todos los resultados alcanzados hasta el momento el método más aconsejable para la determinación de ANOA en manzanas sería el método directo, ya que presentando unas buenas características analíticas, ofrece unos niveles de tolerancia elevados y unas recuperaciones aceptables.

Tabla nº V-26.- Aplicación del método.

Muestra	ng/ml puesto	% Recuperado			
		Directo	Sincrónico	1ªD	2ªD
1	500	111'3	105'0	97'4	115'8
	500	112'0	107'3	99'0	117'5
	500	116'2	106'0	94'0	118'5
	500	104'5	115'0	96'0	116'2
2	500	105'0	109'5	97'0	107'0
	500	107'0	106'0	99'4	107'0
	500	106'1	118'0	90'5	109'0
3	500	108'0	105'2	91'0	112'7
	500	109'3	106'2	93'1	117'5
X_{media}		108'8	108'7	95'3	113'5
σ_{n-1}		3'80	4'68	3'29	4'68

X_{media} - Valor promedio de las determinaciones
 σ_{n-1} - Desviación estándar de los valores



Capítulo VI

Determinación fosforimétrica de la α -Naftaleneacetamida

1. Características espectroscópicas.

1.1. Características fluorescentes.

Dentro de este apartado, en primer lugar, se establecieron de los espectros de excitación y emisión fluorescentes. Para ello, a una alícuota de 50 μl de la disolución madre $5'4 \cdot 10^{-4}$ M de NAD en SDS 0'5 M, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M y se enrasó con agua destilada hasta 10 ml. De esta forma la concentración final de NAD fue de 500 ng/ml. Se siguió la técnica operatoria que se describe a continuación: Se fijó el monocromador de excitación a 290 nm, se fijaron las rendijas de excitación y emisión en 4 nm, la sensibilidad en 500 V y la velocidad de barrido de los monocromadores en 4 nm/s. Se registró el espectro de emisión que presenta dos máximos a 325 y 346 nm, siendo este primero el más intenso. Fijada la longitud de onda de este máximo en el monocromador de emisión, se registró el espectro de excitación, trabajando en las mismas condiciones instrumentales, obteniendo un máximo de excitación a 292 nm, eligiendo, por tanto, 292 y 325 nm como longitudes de excitación y emisión fluorescentes. Dichos espectros se encuentran en la Figura nº VI-1.

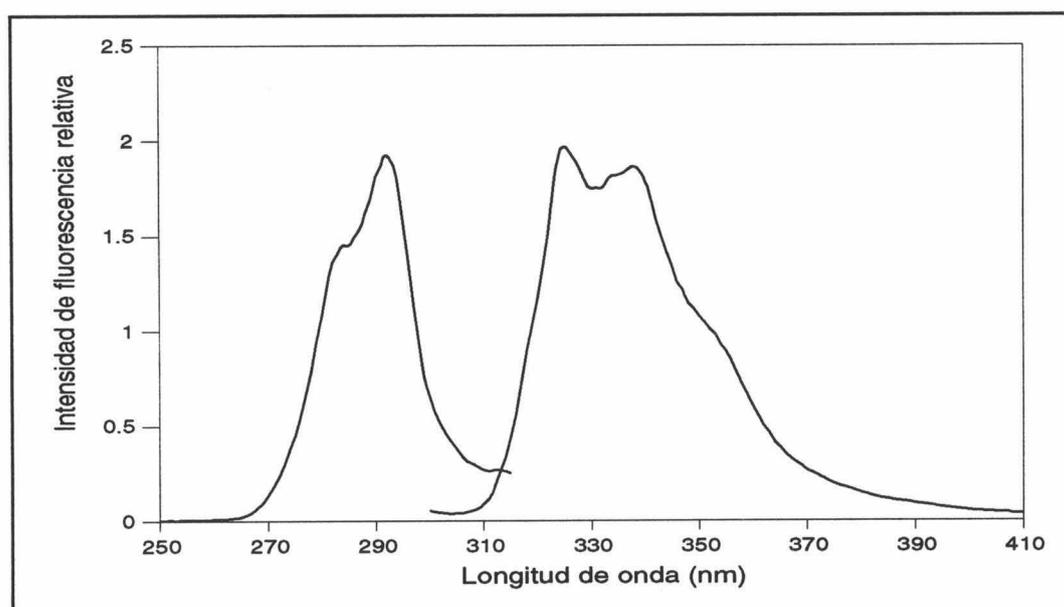


Figura nº VI-1.- Espectros de excitación y emisión fluorescentes. [NAD] 500 ng/ml y [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M.

1.2. Características fosforescentes.

Se establecieron los espectros de excitación y emisión fosforescente del NAD en presencia de SDS, TlNO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 . El procedimiento seguido se describe a continuación: *Se preparó una disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4}$ M en SDS 0'5 M. A una alícuota de 50 μl de disolución madre se le añadieron 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TlNO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada. De esta forma la concentración final de NAD fue de 500 ng/ml. Se registraron los espectros de excitación y emisión fosforescente; para ello, se fijó la longitud de onda de excitación en 292 nm y se registró el espectro de emisión con una velocidad de barrido de 4 nm/s, sensibilidad del detector 900 V, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, tiempo de decaimiento 200 μs y tiempo de integración 1000 μs , obteniendo dos máximos a 490 y 524 nm, siendo este último el más intenso. Colocando este máximo de emisión en el monocromador respectivo, siempre en las mismas condiciones instrumentales, se registró el espectro de excitación obteniendo un máximo a 292 nm, pudiendo considerar que 292 y 524 nm son los máximos de excitación y emisión fosforescente del NAD. El espectro de fosforescencia obtenido se encuentra representado en la Figura n° VI-2.*

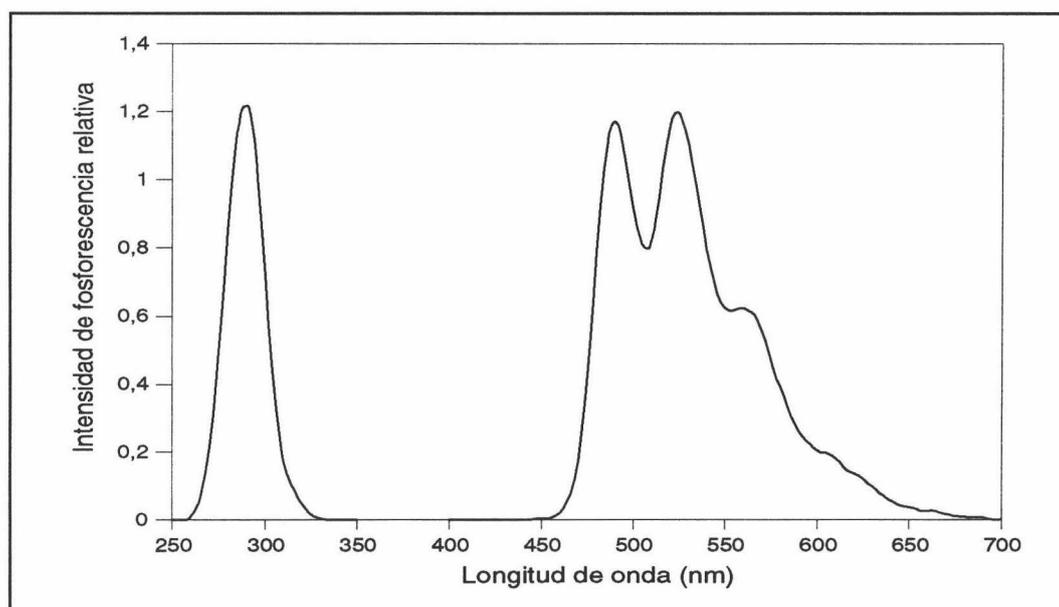


Figura n° VI-2.- *Espectros de excitación y emisión fosforescentes. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO_3] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na_2SO_3] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H_2SO_4] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

Las longitudes de onda máximas de excitación y emisión fosforescentes que se emplearon para el resto del trabajo experimental fueron:

$$\lambda_{\text{exc}}: 292 \text{ nm y } \lambda_{\text{em}}: 524 \text{ nm}$$

Para una mejor visualización de la emisión fosforescente, se ha registrado el espectro de fosforescencia total del NAD. A una disolución preparada como se describe a continuación: a una alícuota de 50 μl de disolución madre se le añadieron 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, se le ha registrado el espectro en las siguientes condiciones instrumentales: Emisión entre 400 y 700 nm, excitación entre 250 y 330 nm, velocidad de barrido de 4 nm/s y un paso de monocromador de 2 nm y 4 nm para el de emisión y excitación respectivamente, sensibilidad 900 V, tiempo de decaimiento 200 μs y tiempo de integración 1000 μs . Dicho espectro junto a su respectivo mapa de contorno se muestran en la Figura n° VI-3. Se comprueba que las longitudes de onda de excitación y emisión elegidas son las que generan la máxima intensidad fosforescente.

1.2.1. Curva de decaimiento.

Para un mayor conocimiento de las características fosforescentes del NAD, se procedió al registro de la curva de decaimiento de la emisión fosforescente. Para ello, a una alícuota de 50 μl de disolución madre se le añadieron 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TINO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada. La curva de decaimiento se registró desde 0 a 2000 μs , cada 20 μs y haciendo 100 repeticiones a $\lambda_{\text{exc/em}}$ de 292/524 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 900 V. La representación gráfica de dicha curva se presenta en la Figura n° VI-4.

El ajuste de dicha curva de decaimiento conduce al cálculo del parámetro vida media para el NAD a estas condiciones experimentales, cuyo valor es:

$$\text{Vida media: } 337 \mu\text{s}$$

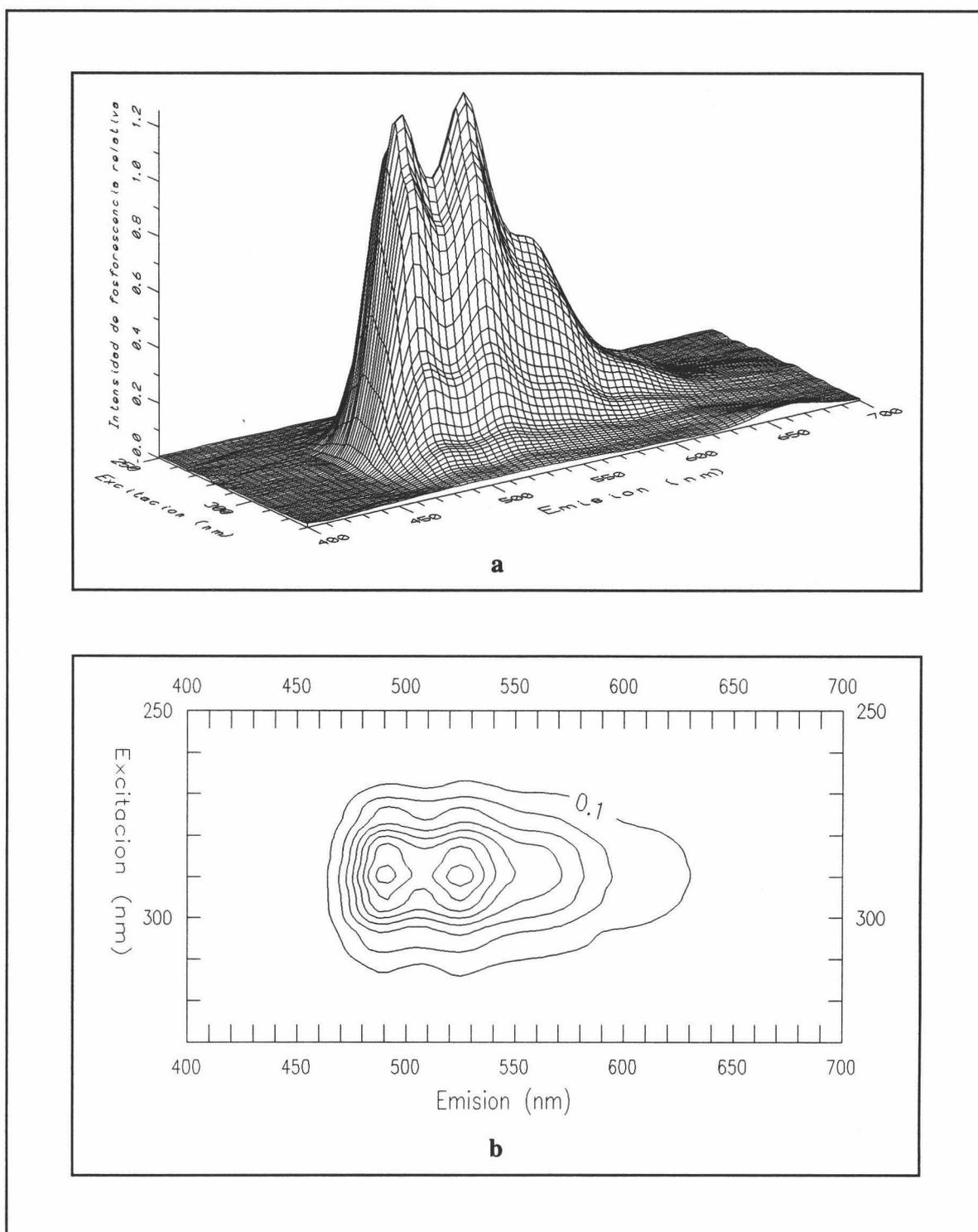


Figura nº VI-3.- Espectro de fosforescencia total (a) y mapa de contorno (b). [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

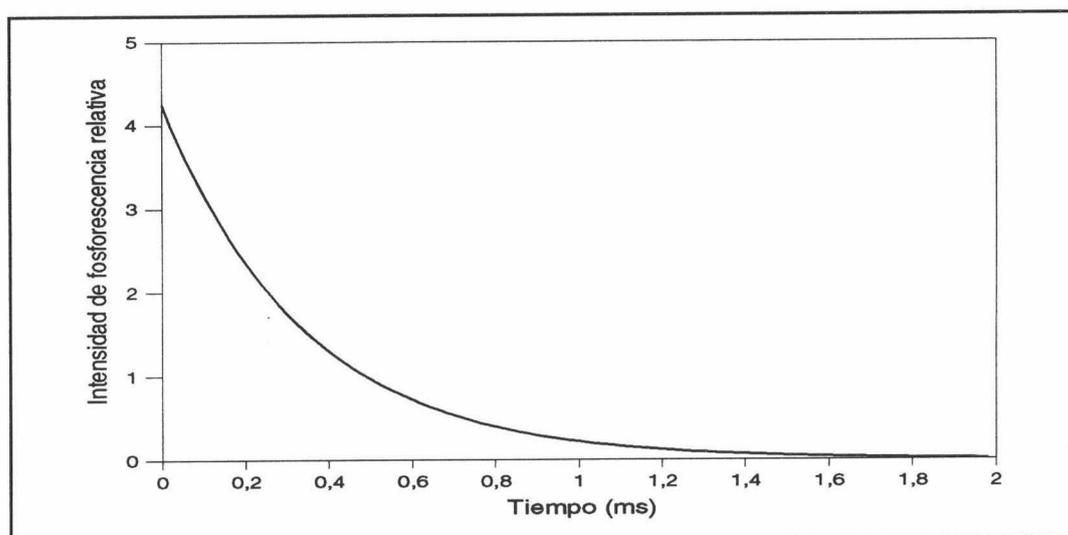


Figura n° VI-4.- *Curva de decaimiento. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

2. Selección de variables experimentales.

2.1. Optimización conjunta de agente micelar, TlNO₃, Na₂SO₃ y H₂SO₄.

Al igual que para el analito ANOA, son varios los sistemas que pueden conducir a la obtención de distintos métodos fosforimétricos para el NAD:

- Sistema: NAD - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄ (sin o con microemulsiones)
- Sistema: NAD - Brij-35 - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄
- Sistema: NAD - TX-100 - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄

No obstante, varias de estas posibilidades no son viables, puesto que apenas si se obtienen señales de fosforescencia cuando se utilizan agentes micelares no iónicos como surfactantes. Además, el NAD es ligeramente soluble en agua por lo que no se ha tenido en cuenta la posibilidad de estudiar este analito empleando microemulsiones. Para comprobar estos hechos, se prepararon una serie de muestras según los siguientes procedimientos operatorios:

- Muestra 1: *a una alícuota de 50 μl de disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4}$ M en SDS 0'5 M, se le añadieron 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TlNO₃ 0'25 M, 500 μl de Na₂SO₃ 0'1 M y 800 μl de H₂SO₄ 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada.*

- Muestra 2: a una alícuota de 50 μl de disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ en TX-100 $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, se le añadieron 760 μl de TX-100 $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, 2600 μl de TINO_3 $0'25 \text{ M}$, 500 μl de Na_2SO_3 $0'1 \text{ M}$ y 800 μl de H_2SO_4 $0'02 \text{ M}$, enrasando a 10 ml con agua destilada.
- Muestra 3: a una alícuota de 50 μl de disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ en Brij-35 $7'0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, se le añadieron 1200 μl de Brij-35 $7'0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, 3200 μl de TINO_3 $0'25 \text{ M}$, 500 μl de Na_2SO_3 $0'1 \text{ M}$ y 800 μl de H_2SO_4 $0'02 \text{ M}$, enrasando a 10 ml con agua destilada.

A estas muestras se les registró el espectro de emisión y las curvas de decaimiento a las siguientes condiciones instrumentales a $\lambda_{\text{exc/em}}$ de 292/524 nm, rendijas $_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, sensibilidad 900 V (para el sistema NAD/SDS) y 1275 V (para los sistemas NAD/TX-100 o NAD/Brij-35), $t_{\text{d/g}}$ 200/1000 μs (para el sistema NAD/SDS) y 200/200 μs (para los sistemas NAD/TX-100 o NAD/Brij-35). Los espectros de emisión se presentan en la Figura n° VI-5.

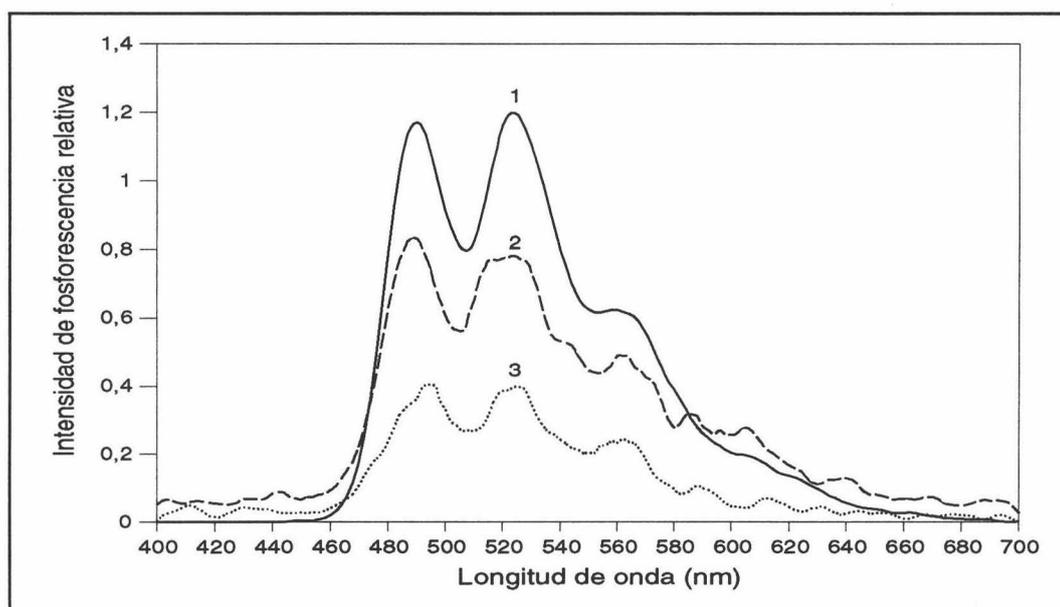


Figura n° VI-5.- Espectros de emisión: (1) $[\text{NAD}]$ 500 ng/ml, $[\text{SDS}]$ $3'00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{TINO}_3]$ $2'50 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; (2) $[\text{NAD}]$ 500 ng/ml, $[\text{TX-100}]$ $1'52 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{TINO}_3]$ $6'50 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; (3) $[\text{NAD}]$ 500 ng/ml, $[\text{Brij-35}]$ $8'40 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{TINO}_3]$ $8'00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Las curvas de decaimiento correspondientes a cada una de las muestras preparadas anteriormente se representan en la Figura n° VI-6.

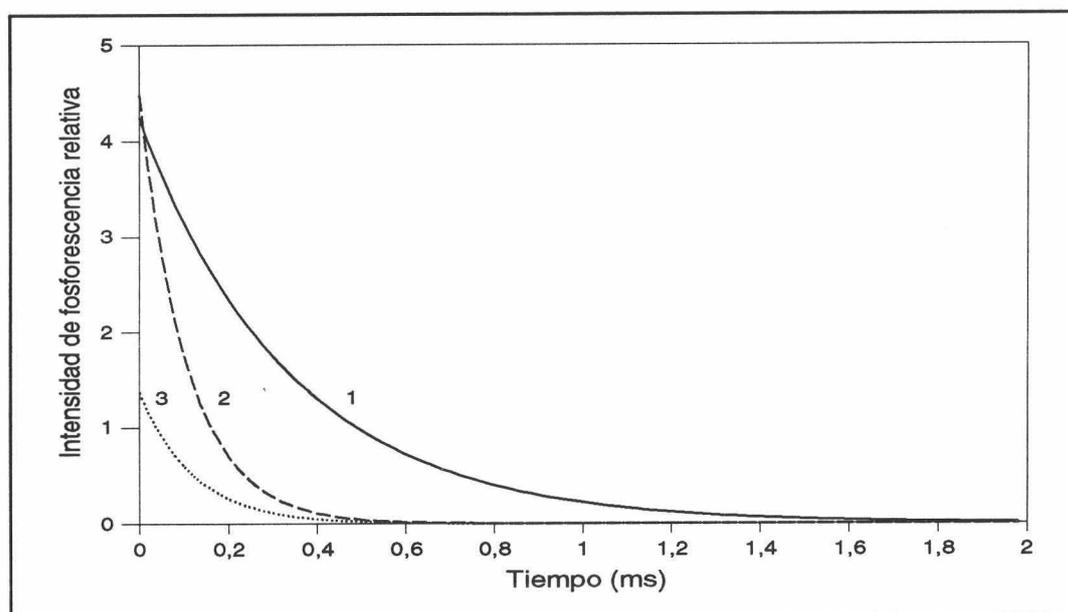


Figura n° VI-6.- Curvas de decaimiento: (1) $[NAD]$ 500 ng/ml, $[SDS]$ $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, $[TiNO_3]$ $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M; (2) $[NAD]$ 500 ng/ml, $[TX-100]$ $1'52 \cdot 10^{-5}$ M, $[TiNO_3]$ $6'50 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M; (3) $[NAD]$ 500 ng/ml, $[Brij-35]$ $8'40 \cdot 10^{-5}$ M, $[TiNO_3]$ $8'00 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

El ajuste de dichas curvas de decaimiento conduce al cálculo del parámetro vida media para el NAD en este tipo de sistemas cuyo valor es de 337, 108 y 121 μs para el sistema NAD/SDS, NAD/TX-100 y NAD/Brij-35, respectivamente.

Este analito, a diferencia del ANOA, es un naftaleno α - sustituido y parece que apenas genera señales de fosforescencia cuando se utilizan sistemas micelares no iónicos, hecho que se corroborará en el Capítulo VII dedicado a otro naftaleno α - sustituido, el carbaril. Por lo tanto, el estudio queda reducido para este analito α - sustituido a un agente micelar, el SDS, con o sin la utilización de microemulsiones. Luego, las posibilidades para este analito se han reducido a un solo camino: NAD - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 sin la utilización de microemulsiones.

La localización de los óptimos de los cuatro reactivos es conocida para este tipo de sistemas, por lo que se planteó directamente un diseño experimental. El desarrollo del diseño compuesto hipercúbico estrellado se muestra en la Tabla n° VI-1. Este diseño coincide con el empleado hasta este momento para otros analitos ya que el óptimo de las cuatro variables se encuentra comprendido en la región abarcada por el diseño. Para llevar a cabo esta experiencia se utilizó el siguiente procedimiento operatorio: *a una alícuota de 50 μ l de disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4}$ M se le adicionaron volúmenes variables de SDS 0'5 M, TlNO_3 0'25 M, Na_2SO_3 0'1 M y H_2SO_4 0'02 M tal y como indica el diseño, colocando 1'5 ml de estos 10 ml dentro de la cubeta de medida y midiendo la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 292/524 nm, $t_{exc/em}$ 16/16 ns, $t_{d/g}$ 200/1000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 900 V.*

La Tabla n° VI-2 muestra el análisis de la varianza para el diseño anterior. Se comprueba que los coeficientes que relacionan la intensidad de fosforescencia con las concentraciones de TlNO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 , son significativos tanto los términos lineales como los cuadráticos, mientras que para el SDS solamente lo es el término cuadrático. Los términos cruzados significativos, en este caso, son SDS- H_2SO_4 , TlNO_3 - Na_2SO_3 y Na_2SO_3 - H_2SO_4 . El modelo se ajusta aceptablemente, como se deduce de los valores del nivel de significación para el fallo de ajuste (18'39 %) y del coeficiente de determinación (0'9375).

La valoración del diseño experimental desarrollado anteriormente, es decir, los coeficientes del polinomio cuadrático al cual se aproxima la variables respuesta intensidad de fosforescencia con respecto a las variables experimentales, así como los valores del óptimo y la valoración de los correspondientes hessiano, introducidos en la parte metodológica, se presentan en la Tabla n° VI-3. La variación, de forma gráfica, de la intensidad de fosforescencia con cada una de las variables optimizadas, de forma univariante se muestra en la Figura n° VI-7 y de forma bivariante en la Figura n° VI-8.

Para el resto del trabajo experimental, se seleccionaron las siguientes concentraciones de trabajo:

$[\text{SDS}] = 3'07 \cdot 10^{-2}$ M	$[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 4'67 \cdot 10^{-3}$ M
$[\text{TlNO}_3] = 2'25 \cdot 10^{-2}$ M	$[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1'46 \cdot 10^{-3}$ M

Tabla n° VI-1.- *Desarrollo del diseño experimental para el sistema NAD - SDS - TINO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Punto	Variables experimentales				pH	I _{Fosf.} ¹
	[SDS] (·10 ⁻²)	[TINO ₃] (·10 ⁻²)	[Na ₂ SO ₃] (·10 ⁻³)	[H ₂ SO ₄] (·10 ⁻³)		
1	3'00(0)	2'50(0)	5'00(0)	1'60(0)	6'64	1'23
2	2'00(-1)	2'00(-1)	4'50(-1)	1'80(1)	6'44	0'82
3	2'00	3'00(1)	4'50	1'80	6'27	0'80
4	2'00	2'00	4'50	1'40(-1)	6'67	1'18
5	4'00(1)	3'00	4'50	1'40	6'70	0'94
6	2'00	2'00	5'50(1)	1'40	6'88	0'90
7	4'00	2'00	5'50	1'40	6'93	0'90
8	4'00	3'00	4'50	1'80	6'51	0'82
9	4'00	2'00	4'50	1'40	6'75	1'12
10	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	1'18
11	4'00	2'00	5'50	1'80	6'93	1'02
12	2'00	3'00	5'50	1'40	6'84	0'95
13	4'00	3'00	5'50	1'40	6'90	0'88
14	4'00	2'00	4'50	1'80	6'57	1'05
15	2'00	3'00	4'50	1'40	6'62	0'90
16	2'00	3'00	5'50	1'80	6'59	0'92
17	4'00	3'00	5'50	1'80	6'68	0'96
18	2'00	2'00	5'50	1'80	6'70	0'95
19	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	1'22
20	0'94(-2'058)	2'50	5'00	1'60	6'60	0'88
21	3'00	3'52(2'058)	5'00	1'60	6'61	0'80
22	5'06(2'058)	2'50	5'00	1'60	6'66	0'85
23	3'00	1'47(-2'058)	5'00	1'60	6'75	0'95
24	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	1'20
25	3'00	2'50	5'00	1'19(-2'058)	6'90	1'05
26	3'00	2'50	5'00	2'01(2'058)	6'40	1'00
27	3'00	2'50	3'97(-2'058)	1'60	6'44	1'02
28	3'00	2'50	6'03(2'058)	1'60	6'84	0'90
29	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	1'15

¹ λ_{exc/em} 292/524 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, t_{d/g} 200/1000 μs, m.p.f. de 5 ms y sensibilidad de 900 V

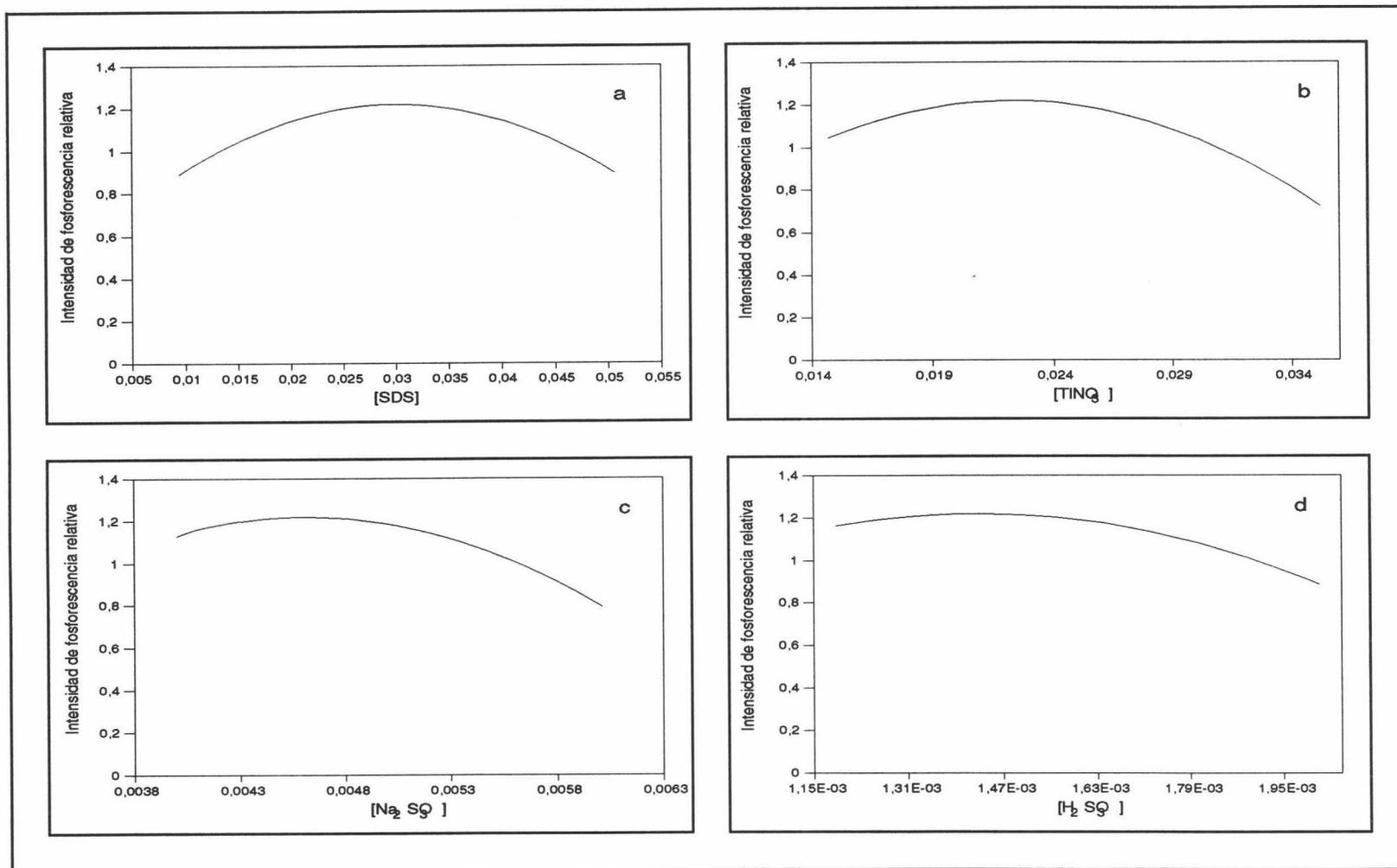


Figura n° VI-7.- Variación de la intensidad de fosforescencia del NAD con la [SDS] (a), [TINO₃] (b), [Na₂SO₃] (c) y la [H₂SO₄] (d). [NAD] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 292/524 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 900 V.

Tabla n° VI-2.- *Análisis de la varianza.*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0017724	1	0'0017724	1'72	0'2598
a ₂	0'0475505	1	0'0475505	46'17	0'0025
a ₃	0'0064394	1	0'0064394	6'25	0'0667
a ₄	0'0116050	1	0'0116050	11'27	0'0284
a ₁₂	0'0027562	1	0'0027562	2'68	0'1772
a ₁₃	0'0022562	1	0'0022562	2'19	0'2130
a ₁₄	0'0126563	1	0'0126563	12'29	0'0248
a ₂₃	0'0264062	1	0'0264062	25'64	0'0072
a ₂₄	0'0473062	1	0'0473062	0'49	0'5289
a ₃₄	0'1736860	1	0'1736860	45'93	0'0025
a ₁₁	0'1633797	1	0'1633797	168'23	0'0002
a ₂₂	0'0885021	1	0'0885021	158'62	0'0002
a ₃₃	0'0466092	1	0'0466092	85'92	0'0008
a ₄₄	0'0269033	1	0'0269033	45'25	0'0025
Fallo de ajuste	0'0269033	10	0'0026903	2'61	0'1839
Error Puro	0'0041200	4	0'0010300		
Total	0'4967035	28			

Tabla n° VI-3.- *Valoración del diseño experimental para el sistema NAD - SDS - TlNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Coeficientes		
a ₁ = 43'8176		
a ₂ = 60'85		
a ₃ = 1000'6		
a ₄ = -141'818		
a ₁₂ = -262'5		
a ₁₃ = -2375	Coordenadas del óptimo	Naturaleza del óptimo
a ₁₄ = 14062'5	[SDS] = 3'07·10 ⁻² M	A ₁ < 0
a ₂₃ = 16250	[TlNO ₃] = 2'25·10 ⁻² M	A ₂ > 0
a ₂₄ = 5625	[Na ₂ SO ₃] = 4'67·10 ⁻³ M	A ₃ < 0
a ₃₄ = 543750	[H ₂ SO ₄] = 1'46·10 ⁻³ M	A ₄ > 0
a ₁₁ = -783'817		Es un máximo
a ₂₂ = -3040'83		
a ₃₃ = -223805		
a ₄₄ = -1'0151·10 ⁶		
a = -2'344		

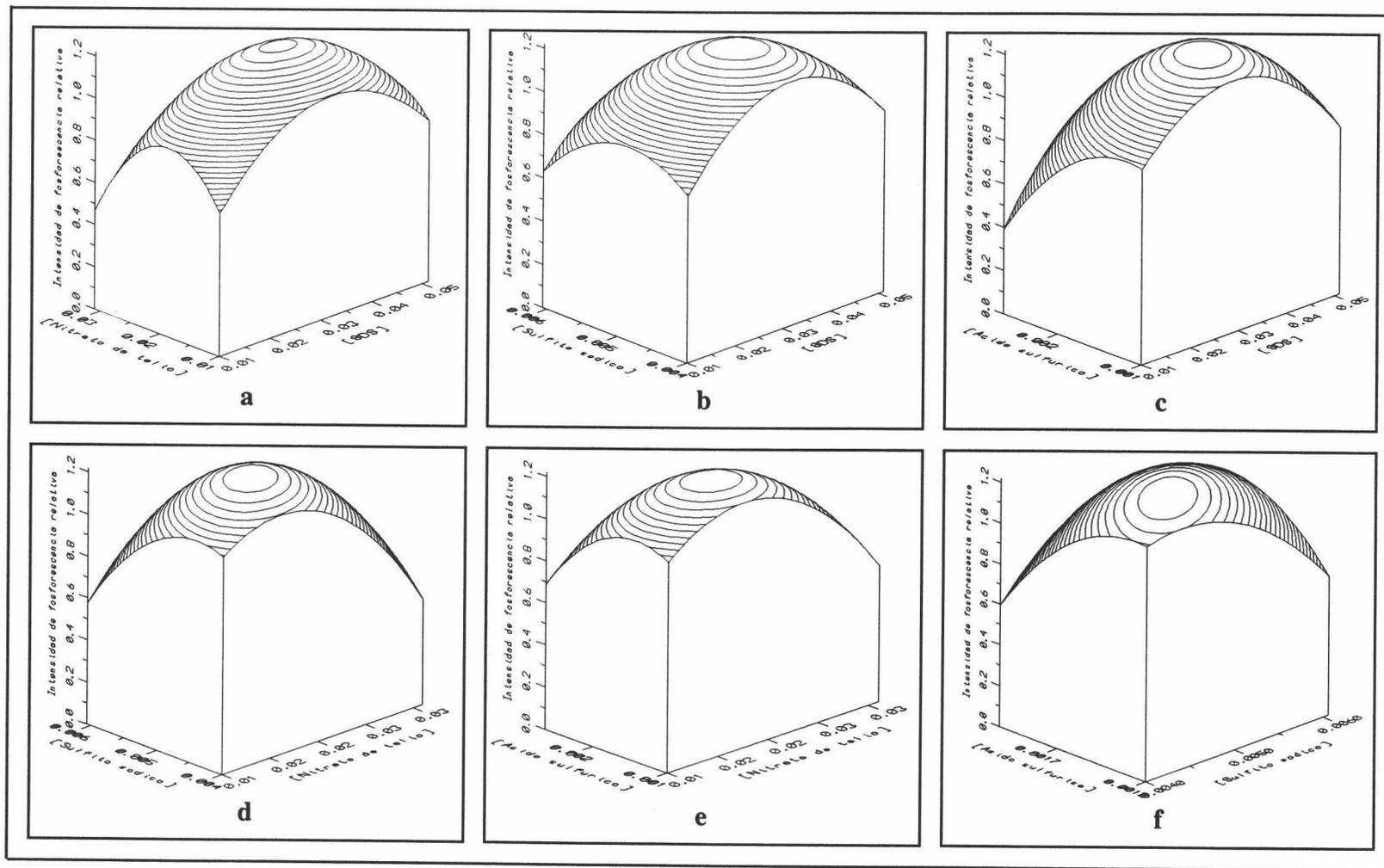


Figura n° VI-8.- Variación de la intensidad de fosforescencia del NAD con [SDS] y [TlNO₃] (a), [SDS] y [Na₂SO₃] (b), [SDS] y [H₂SO₄] (c), [TlNO₃] y [Na₂SO₃] (d), [TlNO₃] y [H₂SO₄] (e) y [Na₂SO₃] y [H₂SO₄] (f). [NAD] 500 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 292/524 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 900 V.

2.2. Optimización del volumen de muestra.

Se estudio la evolución temporal de la intensidad de fosforescencia con el tiempo, iluminando continuamente una muestra preparada en las siguientes condiciones: a una alícuota de 50 μl de disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4}$ M en SDS 0'5 M, se le añadieron 614 μl de SDS 0'5 M, 900 μl de TlNO_3 0'25 M, 467 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 730 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, variando el volumen introducido en la cubeta entre 1'5 y 4 ml; por debajo de este volumen o por encima se producen problemas de tipo instrumental ya comentados anteriormente.

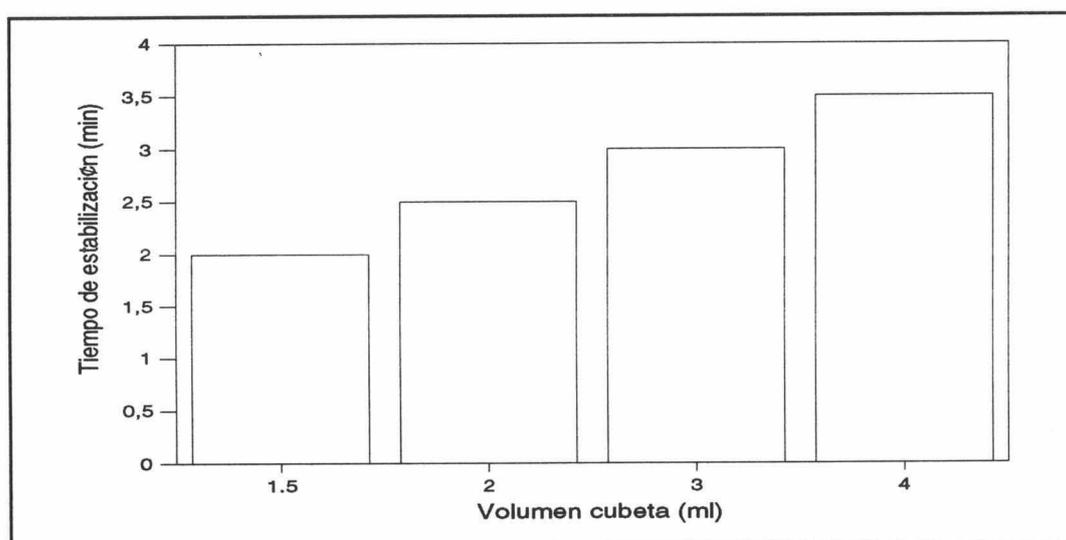


Figura n° VI-12.- *Influencia del volumen de muestra. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, [TlNO₃] $2'25 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'67 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'46 \cdot 10^{-3}$ M.*

Se observa una disminución del tiempo de estabilización a medida que se disminuye el volumen introducido en la cubeta, si bien las diferencias no son muy marcadas, eligiendo como volumen óptimo de muestra:

Volumen de muestra: 1'5 ml

2.3. Influencia del orden de adición.

Aunque se ha demostrado que para este tipo de sistemas el orden de adición es

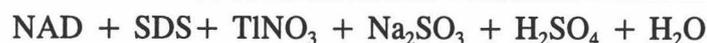
independiente a la hora de desarrollar una metodología de trabajo, se comprobó su efecto. Para llevar a cabo esta experiencia se prepararon una serie de disoluciones mezclando 50 μl de una disolución madre de NAD, 614 μl de SDS 0'5 M, 900 μl de TINO_3 0'25 M, 467 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 730 μl de H_2SO_4 0'02 M en distintos órdenes, enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones así preparadas se introdujeron 1'5 ml en la cubeta de medida y se midió la intensidad de fosforescencia. Los resultados se reflejan en la Tabla n° VI-4.

Tabla n° VI-4.- Influencia del orden de adición.

Orden de adición	$I_{\text{Fosf.}}$
NAD + TINO_3 + Na_2SO_3 + SDS + H_2SO_4 + H_2O	1'18
TINO_3 + SDS + H_2SO_4 + Na_2SO_3 + NAD + H_2O	1'14
SDS + H_2SO_4 + Na_2SO_3 + NAD + TINO_3 + H_2O	1'14
NAD + TINO_3 + H_2SO_4 + SDS + Na_2SO_3 + H_2O	1'11
NAD + H_2SO_4 + SDS + TINO_3 + Na_2SO_3 + H_2O	1'18
TINO_3 + NAD + Na_2SO_3 H_2SO_4 ++ SDS + H_2O	1'10
NAD + SDS + TINO_3 + H_2SO_4 + Na_2SO_3 + H_2O	1'20
NAD + TINO_3 + SDS + Na_2SO_3 + H_2SO_4 + H_2O	1'19
H_2SO_4 + Na_2SO_3 + SDS + NAD + TINO_3 + H_2O	1'21

¹ $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/524 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 900 V.

A la vista de estos resultados se eligió el orden de adición empleado a lo largo del desarrollo del método, que es:



2.4. Influencia de la temperatura.

Como la mayoría de las señales espectroscópicas, la intensidad de fosforescencia, disminuye conforme aumenta la temperatura. Para llevar a cabo el estudio de su influencia se preparó una muestra de NAD mezclando una alícuota de 50 μl de disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4}$ M en SDS 0'5 M, 614 μl de SDS 0'5 M, 900 μl de TINO_3 0'25 M, 467 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 730 μl de H_2SO_4 0'02 M y enrasando a 10 ml con agua destilada, esta muestra se introdujo en la cubeta de medida y se registró la fosforescencia emitida a

distintas temperaturas de trabajo, a las mismas condiciones instrumentales del apartado anterior. Este estudio se refleja en la Figura n° VI-9.

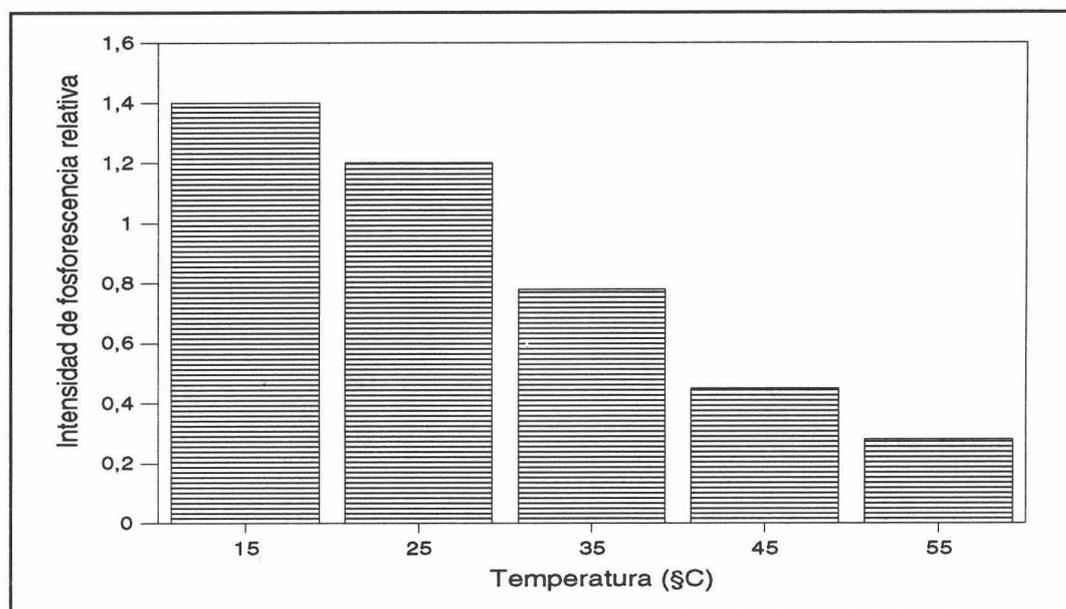


Figura n° VI-9.- *Influencia de la temperatura. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'25 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'67 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'46 \cdot 10^{-3}$ M.*

Se observa una marcada disminución de la emisión fosforescente con el aumento de la temperatura, por lo que es necesario, termostatar la célula de medida y mantener la temperatura de trabajo para el desarrollo del método fosforimétrico en:

Temperatura: 25 °C

2.5. Estabilidad con el tiempo.

Establecidas la mayor parte de las variables experimentales, se procedió al estudio de la estabilidad de la señal de fosforescencia emitida por una muestra de NAD con el tiempo. Para ello, se dispuso de una muestra preparada según el siguiente procedimiento: a una alícuota de 50 µl de disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4}$ M en SDS 0'5 M, se le añadieron 614 µl de SDS 0'5 M, 900 µl de TiNO₃ 0'25 M, 467 µl de Na₂SO₃ 0'1 M y 730 µl de H₂SO₄ 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, de la cual se introdujeron 1'5

ml en una cubeta de cuarzo 1 x 1 cm, irradiándola continuamente con una lámpara de pulso a un m.p.f. de 5 ms; los datos obtenidos se representan en la Figura VI-10.

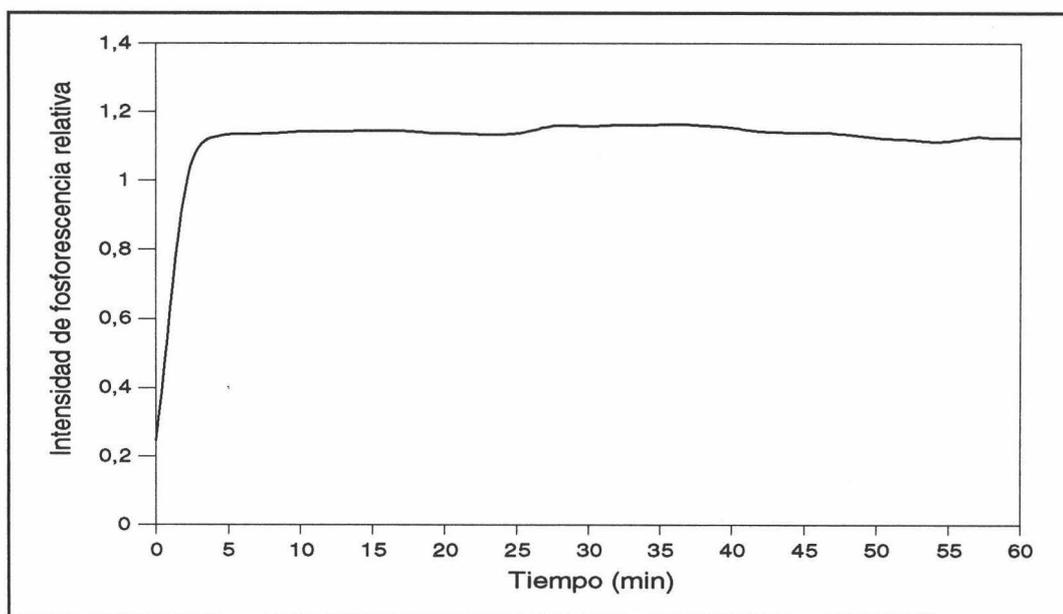


Figura n° VI-10.- Estabilidad con el tiempo. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'25 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'67 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'46 \cdot 10^{-3}$ M.

Se observa que, tras un período de aproximadamente de 3 minutos, la señal permanece estable al menos durante una hora, tiempo suficiente para realizar las medidas analíticas oportunas.

2.6. Influencia de la concentración de analito.

Para establecer el rango dinámico lineal del método se procedió al estudio de la influencia de la concentración de analito sobre la intensidad de fosforescencia. Para ello, a distintas alícuotas de una disolución madre de NAD se le añaden 614 μ l de SDS 0'5 M, 900 μ l de TiNO₃ 0'25 M, 467 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 730 μ l de H₂SO₄ 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml de forma que la concentración de NAD variara entre 0 a 1000 ng/ml. De estas muestras así preparadas se introducen 1'5 ml en la cubeta de medida, y se mide la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 292/524 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 900 V. Este estudio se muestra en la Figura n° VI-11.

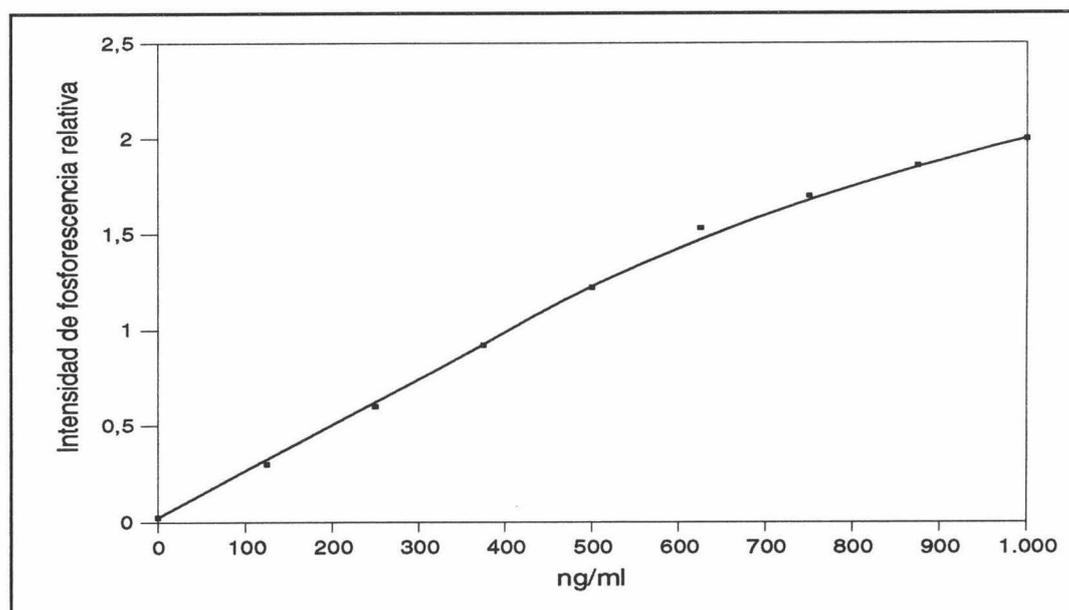


Figura nº VI-11.- *Influencia de la concentración. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'25 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'67 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'46 \cdot 10^{-3}$ M.*

Se observa que existe un amplio rango de linealidad para la señal analítica pero, a partir de 625 ng/ml, la variación de la respuesta con la concentración de analito se desvía de la linealidad, por lo que el rango dinámico lineal será:

Rango dinámico lineal: 0-625 ng/ml

3. Selección de parámetros instrumentales.

3.1. Optimización del mínimo período de flash.

Aunque se conoce la relación del tiempo de medida y la velocidad de la lámpara, en estos sistemas se procedió a la optimización del m.p.f.. Para ello, se preparó una muestra de NAD adicionando a una alícuota de 50 μ l de disolución madre de NAD $5'4 \cdot 10^{-4}$ M en SDS 0'5 M, 614 μ l de SDS 0'5 M, 900 μ l de TINO₃ 0'25 M, 467 μ l de Na₂SO₃ 0'1 M y 730 μ l de H₂SO₄ 0'02 M y enrasando a 10 ml con agua destilada, de esta muestra se introdujeron 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradió a 292 nm con un período de pulso de 5, 30 y 100 ms, registrando la intensidad de fosforescencia a 524 nm, con un $t_{d/g}$ de 200/1000 μ s, rendijas 16/16 nm y sensibilidad del detector de 900 V.

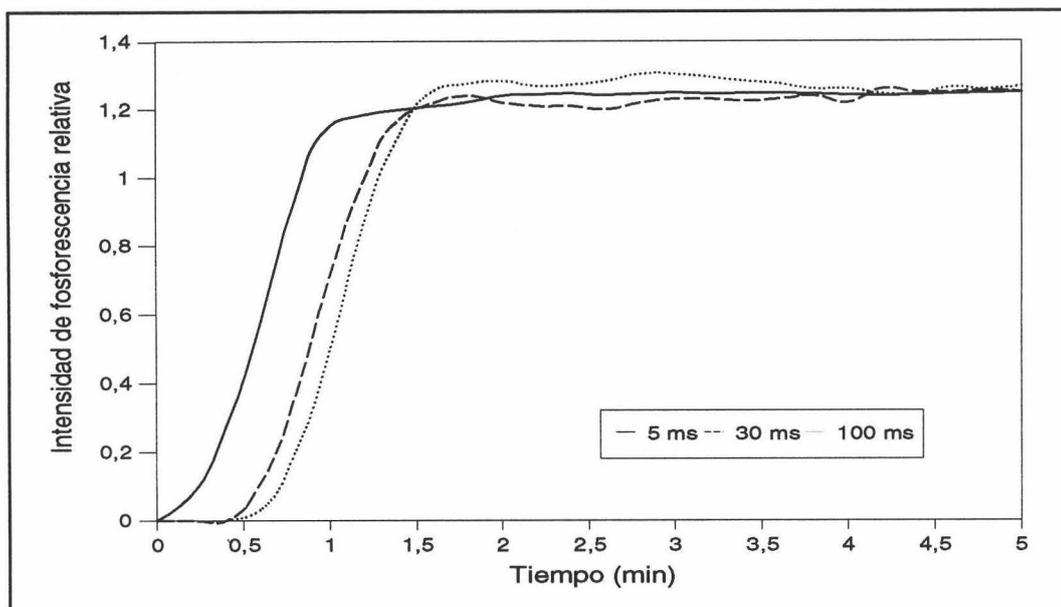


Figura nº VI-16.- Optimización del m.p.f. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, [TiNO₃] $2'25 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'67 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'46 \cdot 10^{-3}$ M.

Los tiempos de estabilización se incrementan ligeramente al aumentar el m.p.f., aumentando también una cierta falta de reproducibilidad de las medidas debido a que, conforme se aumenta este parámetro, disminuye el número de puntos integrados. Para el resto del trabajo experimental se seleccionó un valor para el mínimo período de flash de:

m.p.f.: 5 ms

3.2. Optimización de la longitud de onda de excitación.

El hecho de que el analito NAD presente un estrecho espectro de excitación y que la influencia de esta variable instrumental no sea determinante en la disminución de los tiempos de medida hizo que no fuera necesaria la optimización para este compuesto. Para el resto del trabajo experimental se siguió utilizando la longitud de onda de excitación empleada hasta este momento que coincide con el máximo del espectro de excitación.

λ_{exc} : 292 nm

3.3. Optimización del incremento de longitud de onda.

La optimización del $\Delta\lambda$ es necesario para el posterior desarrollo de métodos sincrónicos y sincrónico-derivados. Para llevar a cabo esta optimización: *a una alícuota de 50 μl de una disolución madre de NAD se le añadió 614 μl de SDS 0'5 M, 900 μl de TINO_3 0'25 M, 467 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 730 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, de esta muestra se introdujeron 1'5 ml dentro de la cubeta de medida registrando distintos barridos sincrónicos con rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 900 V. El barrido de incrementos de longitud de onda se llevó a cabo entre 180 a 260 nm a intervalos de 10 nm; los espectros registrados se muestran en la Figura n° VI-12.*

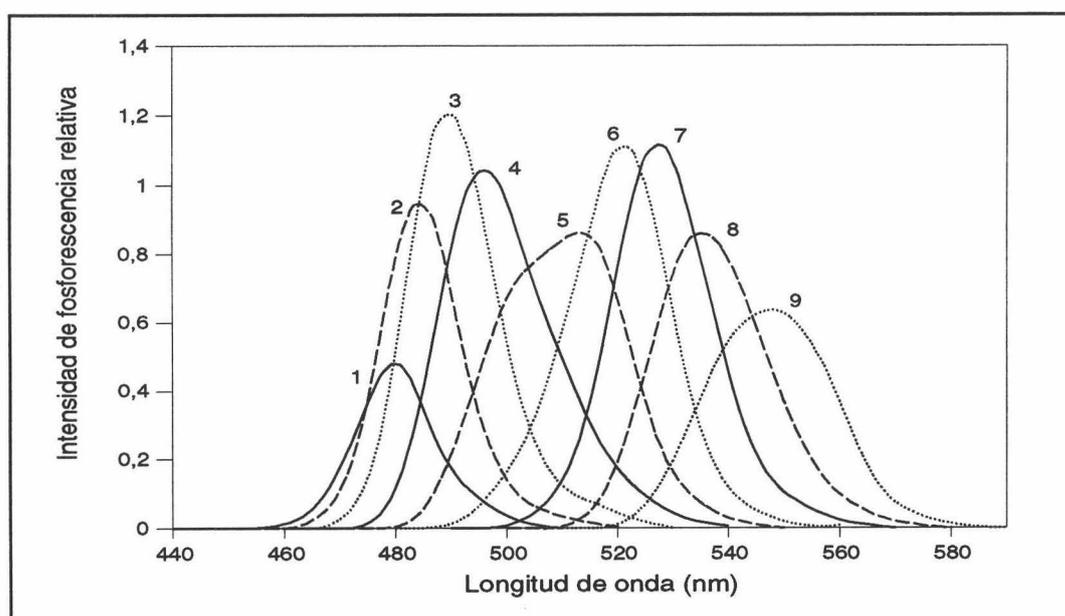


Figura n° VI-12.- Optimización del $\Delta\lambda$. (1) 180, (2) 190, (3) 200, (4) 210, (5) 220, (6) 230, (7) 240, (8) 250 y (9) 260 nm. $[\text{NAD}]$ 500 ng/ml, $[\text{SDS}]$ $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, $[\text{TINO}_3]$ $2'25 \cdot 10^{-2}$ M, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $4'67 \cdot 10^{-3}$ M y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'46 \cdot 10^{-3}$ M.

Al observar esta figura se comprueba que el pico más estrecho e intenso se obtiene para un incremento de longitud de onda de 200 nm, por lo que se eligió éste como el incremento de longitud de onda óptimo para el desarrollo de los métodos sincrónicos y sincrónico-derivados.

$\Delta\lambda$: 200 nm

3.4. Características espectroscópicas.

Conocido el $\Delta\lambda$ óptimo, se registraron los distintos espectros de emisión, sincrónicos y sincrónico-derivados característicos del NAD en SDS. Para ello, a una alícuota de 50 μl de una disolución madre de NAD, 614 μl de SDS 0'5 M, 900 μl de TlNO_3 0'25 M, 467 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 730 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada, de esta muestra se introdujeron 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se le registraron los espectros de emisión, sincrónico y sincrónico-derivados a las siguientes condiciones instrumentales: velocidad de barrido 2 nm/s, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 900 V. Estos se presentan en la Figura n° VI-13 junto a los espectros de un blanco registrado en las mismas condiciones experimentales e instrumentales pero sin contener NAD.

3.5. Parámetros instrumentales establecidos.

Un resumen esquemático de los parámetros instrumentales establecidos a lo largo de la optimización del método fosforimétrico, se resumen en la Tabla n° VI-5.

Tabla n° VI-5.- Parámetros instrumentales establecidos

Longitudes de onda de excitación/emisión	
Fluorescencia	292/325 y 346 nm
Fosforescencia	292/490 y 524 nm
Longitudes de onda espectros sincrónicos y derivados	
Sincrónico	490 nm
1ª derivada	482 y 498 nm
2ª derivada	490 nm
Rendijas de excitación/emisión	16/16 nm
Mínimo período de flash	5 ms
Velocidad de barrido de los espectros	2 nm/s
Incremento de longitud de onda	200 nm
Tiempo de decaimiento	200 μs
Tiempo de integración	1000 μs
Sensibilidad del detector	900 V

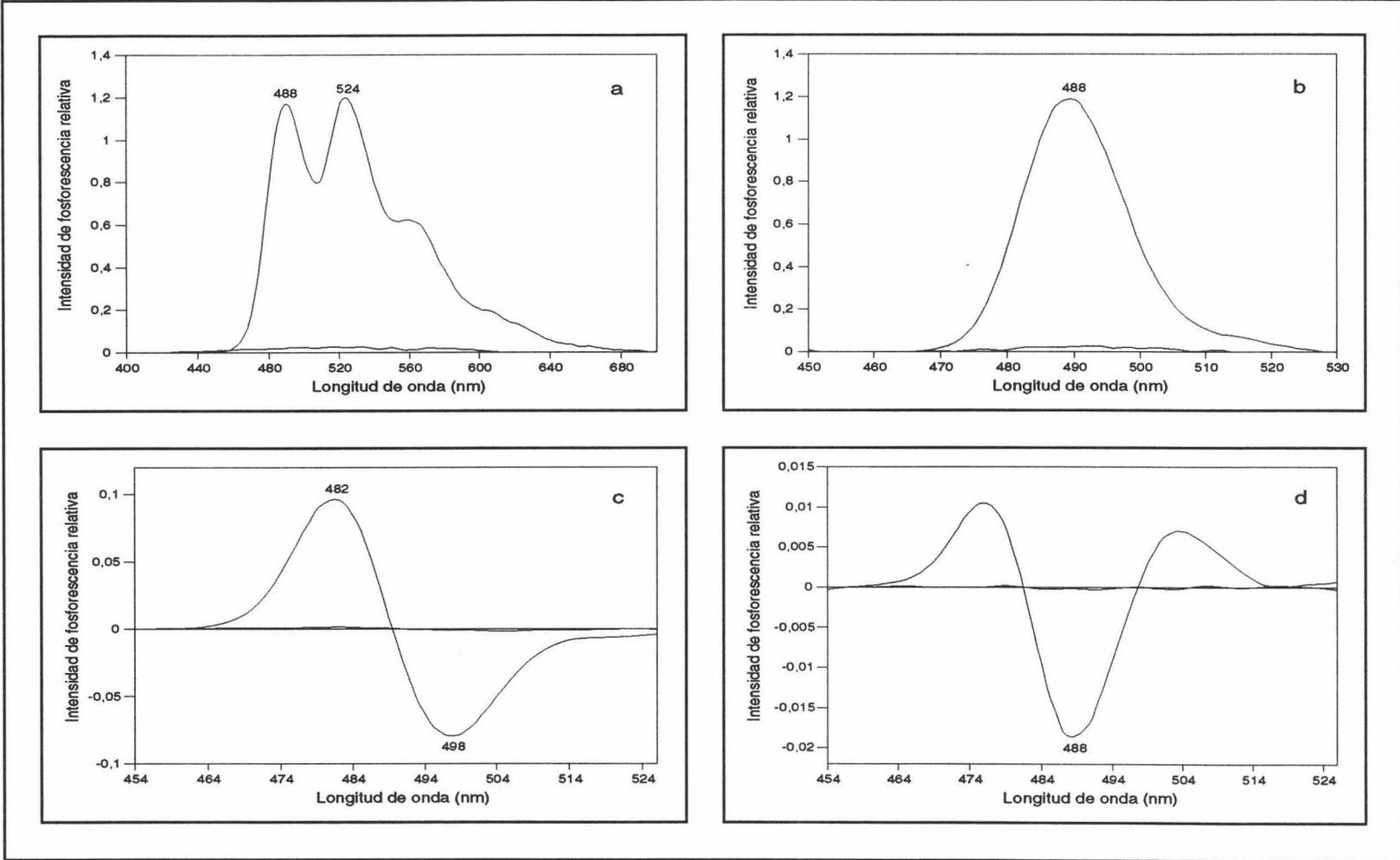


Figura n° VI-13.- Espectro de emisión (a), sincrónico (b), 1ª derivada sincrónica (c) y 2ª derivada sincrónica del NAD junto a su correspondiente blanco. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3 \cdot 07 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2 \cdot 25 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4 \cdot 67 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1 \cdot 46 \cdot 10^{-3}$ M.

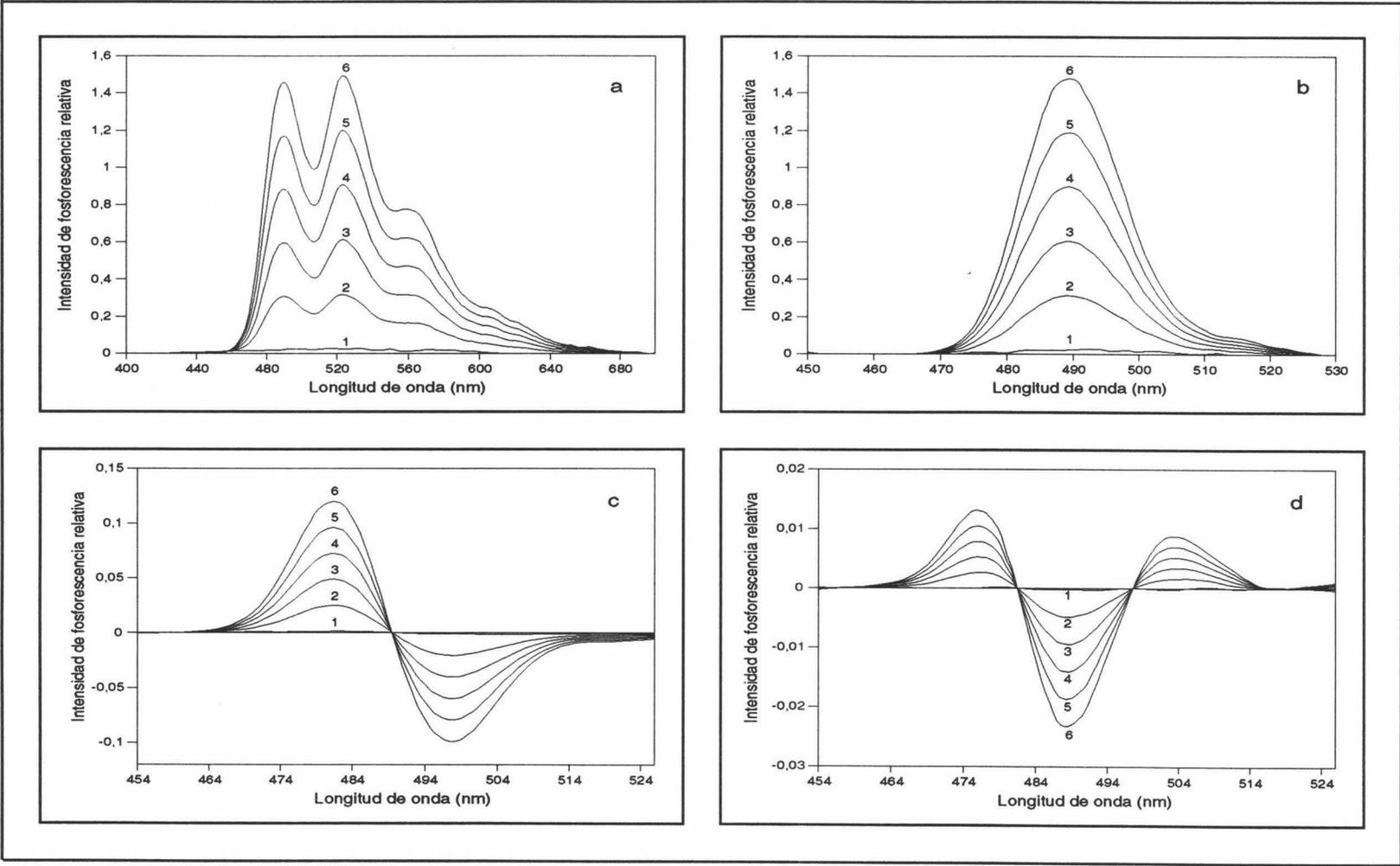


Figura nº VI-14.- *Espetros de emisión (a), sincrónico (b), 1ª derivada sincrónica (c) y 2ª derivada sincrónica (d) correspondientes a la recta de calibrado del NAD en SDS. (1) Blanco, (2) 125, (3) 250, (4) 375, (5) 500 y (6) 625 ng/ml. [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'25 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'67 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'46 \cdot 10^{-3}$ M.*

4. Establecimiento del método analítico.

4.1. Procedimiento operatorio.

En un matraz de 10 ml se colocan alícuotas de una disolución de NAD $5'4 \cdot 10^{-4}$ M en SDS 0'5 M, de forma que la concentración de la disolución variase entre 0 y 625 ng/ml, y se le añaden 614 μ l de SDS 0'5 M, 900 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 467 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 730 μ l de H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada. De esta disolución así preparada se adiciona 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso a un período de 5 ms a la longitud de onda de 292 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide 3 minutos después de empezar a irradiar con t_d de 200 μ s, t_g de 1000 μ s y voltaje de detector 900 V, a 524, 490, 482, 498 y 490 nm, para el método de emisión directa, sincrónico, 1^aD^1 , 1^aD^2 y 2^aD , respectivamente.

4.2. Rectas de calibrado.

Establecidos los parámetros experimentales e instrumentales se procedió al establecimiento de las distintas rectas de calibrado para cada uno de los métodos propuestos. En conjunto se propusieron cinco métodos espectrofotométricos: un método de emisión directa, otro sincrónico, dos métodos utilizando los dos posibles valores extremos que posee la primera derivada del espectro sincrónico y otro mediante la segunda derivada de dicho espectro sincrónico. Los espectros correspondientes a cada una de estas calibrados, se reflejan en conjunto en la Figura n° VI-14.

Para establecer los parámetros de fiabilidad es necesario obtener la recta de calibrado a partir de una serie de réplicas de distintos patrones que deben encontrarse homogéneamente distribuidos a lo largo del rango establecido. Estos patrones deben incluir al blanco como otro valor más, ya que su señal instrumental está sujeta al mismo tipo de errores que las demás medidas. Los datos de las rectas de calibrado de los cinco métodos en estudio se reflejan en las Tablas n° VI-6, 7, 8, 9 y 10. Los datos estadísticos obtenidos para las cinco rectas en estudio, se resumen en la Tabla n° VI-11.

Tabla n° VI-6.- Réplicas correspondientes al calibrado directo.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'024	0'029	0'020
125	0'318	0'290	0'340
250	0'612	0'580	0'620
375	0'905	0'912	0'943
500	1'199	1'260	1'150
625	1'492	1'561	1'520

Tabla n° VI-7.- Réplicas correspondientes al calibrado sincrónico.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	0'022	0'026	0'020
125	0'310	0'270	0'331
250	0'598	0'562	0'640
375	0'885	0'860	0'843
500	1'173	1'150	1'221
625	1'461	1'523	1'552

Tabla n° VI-8- Réplicas correspondientes al calibrado 1ªD¹.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	1'57·10 ⁻³	2'00·10 ⁻³	1'82·10 ⁻³
125	0'025	0'023	0'027
250	0'049	0'050	0'046
375	0'072	0'070	0'074
500	0'096	0'089	0'092
625	0'119	0'125	0'124

Tabla n° VI-9.- Réplicas correspondientes al calibrado 1ªD².

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	8'02·10 ⁻⁴	7'01·10 ⁻⁴	9'03·10 ⁻⁴
125	0'020	0'019	0'023
250	0'040	0'043	0'046
375	0'060	0'058	0'063
500	0'079	0'078	0'084
625	0'099	0'096	0'106

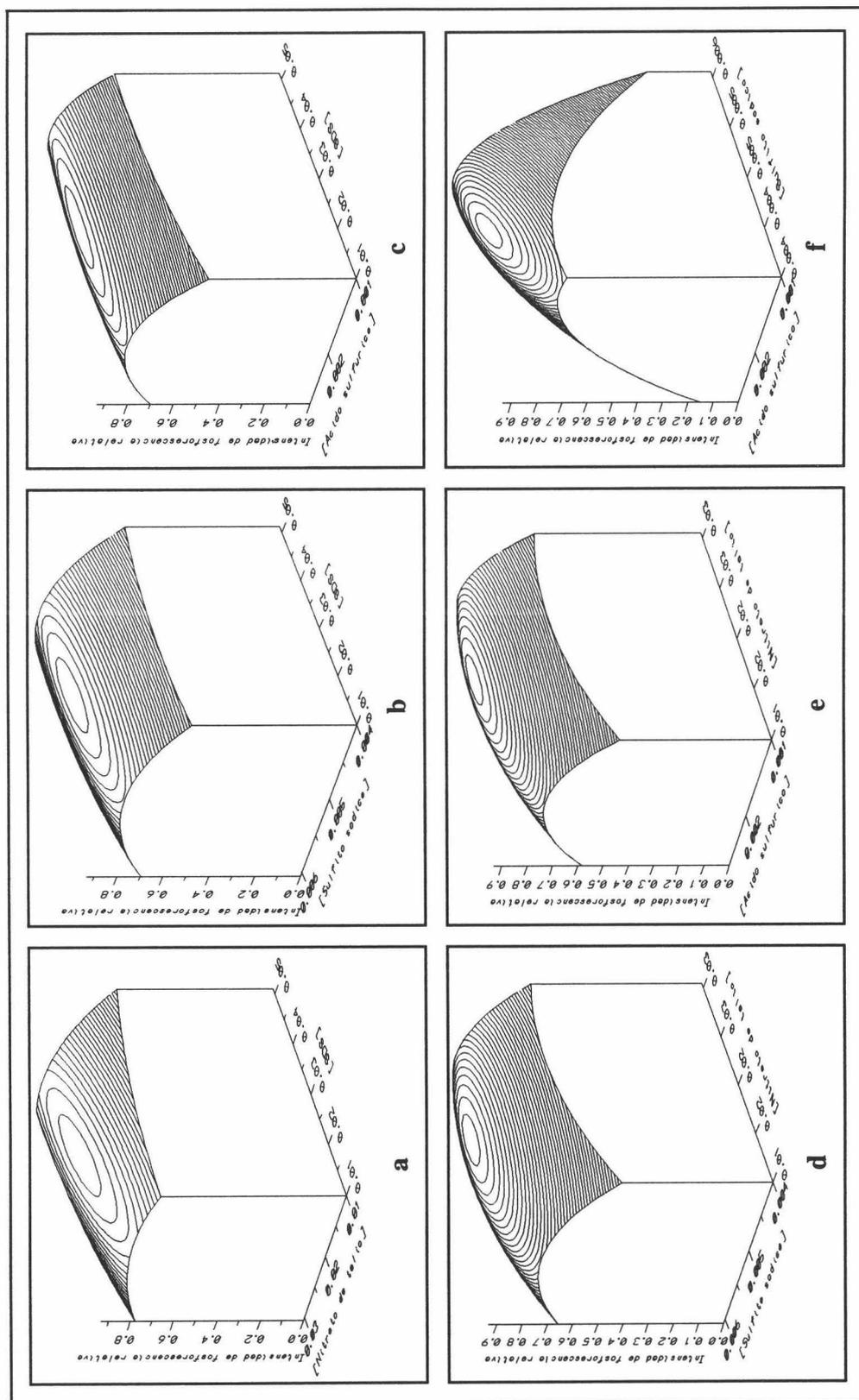


Figura n° VII-8.- Variación de la intensidad de fosforescencia del CBL con $[S_2O_8^{2-}]$ y $[TiNO_3]$ (a), $[S_2O_8^{2-}]$ y $[Na_2SO_3]$ (b), $[S_2O_8^{2-}]$ y $[H_2SO_4]$ (c), $[TiNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TiNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). $[CBL]$ 400 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 292/490 nm, rendijas exc/em 16/16 nm, t_{dig} 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V.

Tabla n° VI-10- Réplicas correspondientes al calibrado 2^aD.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	1'68·10 ⁻⁴	9'81·10 ⁻⁵	1'12·10 ⁻⁴
125	4'77·10 ⁻³	4'50·10 ⁻³	5'01·10 ⁻³
250	9'38·10 ⁻³	8'72·10 ⁻³	9'61·10 ⁻³
375	1'40·10 ⁻²	1'27·10 ⁻²	1'40·10 ⁻²
500	1'86·10 ⁻²	2'01·10 ⁻²	1'92·10 ⁻²
625	2'32·10 ⁻²	2'40·10 ⁻²	2'15·10 ⁻²

Tabla n° VI-11.- Datos estadísticos de las rectas de calibrado.

Parámetros estadísticos	D	S	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
Ordenada en el origen (a)	0'017	0'008	0'0014	0'0014	0'0001
Desviación estándar (s _a)	0'0118	0'0142	0'0011	0'0012	0'0003
Desv. estándar relativa (DER(a)) (%)	70'03	168'35	77'49	84'74	326'05
Pendiente (b)	0'0024	0'0024	0'0002	0'0002	0'0001
Desviación estándar (s _b)	0'0001	0'0001	0'00001	0'00001	0'00001
Desv. estándar relativa (DER(b)) (%)	1'31	1'59	1'51	1'96	2'10
Desv. estándar de regresión (S _{R,c})	0'0284	0'034	0'0026	0'0028	0'0007
Coeficiente de correlación (r)	0'9986	0'9985	0'9982	0'9970	0'9965
Coef. de determinación (r ²) (%)	99'73	99'60	99'64	99'35	99'30
g	0'0008	0'0011	0'0010	0'0017	0'0020

4.3. Parámetros de fiabilidad.

Los parámetros de fiabilidad del método: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido determinados mediante el modelo de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado. La sensibilidad analítica, así como la linealidad son establecidas mediante el uso de los datos derivados del calibrado, reflejados en las Tablas n° VI-5, VI-6, VI-7, VI-8 y VI-9.

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar tanto de los blancos, así como de los patrones usados para el establecimiento de las rectas de calibrado, respectivamente. Los datos de dichas desviaciones estándar se muestran en la Tabla n° VI-12.

Tabla n° VI-12.- Desviaciones estándar en función del calibrado.

ng/ml	D	S	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
0	8'42	10'20	9'70	12'65	13'56
125	7'78	9'44	8'95	11'65	12'51
250	7'44	9'02	8'55	11'09	11'96
375	7'43	9'00	8'56	11'10	11'93
500	7'76	9'43	8'88	11'63	12'64
625	8'46	10'33	9'80	12'61	13'50

La estimación de todos los parámetros característicos del método, calculados a partir del modelo de análisis de la regresión se reflejan en la Tabla n° VI-13. Mediante la representación gráfica de los valores de precisión, para cada uno de los valores de concentración del calibrado, es posible por interpolación, estimar la DER (%) para cualquier valor de concentración dentro del rango lineal.

Tabla n° VI-13.- Parámetros de fiabilidad.

Parámetros de fiabilidad	D	S	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
Linealidad (1-DER(b)%)	98'69	98'41	98'50	98'05	97'90
Sensibilidad analítica (ng/ml)	11'84	10'20	13'63	17'71	19'05
Límite de detección (ng/ml)	25'26	30'60	29'10	37'97	40'70
Límite de cuantificación (ng/ml)	84'20	102'01	97'00	126'58	135'67
Rango dinámico lineal (ng/ml)	84-625	102-625	97-625	127-625	136-625
Precisión (DER%) 125 ng/ml	6'23	7'57	7'11	9'51	9'90
250 ng/ml	3'03	3'61	3'43	4'22	4'83
375 ng/ml	1'97	2'49	2'27	2'99	3'27
500 ng/ml	1'57	1'90	1'84	2'33	2'44
625 ng/ml	1'35	1'62	1'54	2'02	2'19

4.4. Estudio de interferencias.

Con el fin de comprobar la aplicabilidad del método propuesto para la determinación de NAD en muestras de pera, donde es interesante su cuantificación, se ha estudiado el efecto que la presencia de otras fitohormonas y pesticidas ejercen en su determinación espectrofotométrica.

Para llevar a cabo dicho estudio se ha preparado una muestra para cada interferente que contenía 500 ng/ml de NAD junto con una cierta cantidad de interferente, y a la cual se le añaden 614 μ l de SDS 0'5 M, 900 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 467 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 730 μ l de H_2SO_4 0'02 M enrasando hasta 10 ml con agua destilada. De esta disolución, así preparada, se adicionan 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso con un período de 5 ms a la longitud de onda de 292 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide a los 3 minutos después de empezar a irradiar a 524 nm en el método de emisión directa, a 488 para el método sincrónico, a 482 y 498 para los métodos sincrónicos 1ª derivada y a 488 para el método sincrónico 2ª derivada, con m.p.f. de 5 ms, t_d 200 μ s, t_g 1000 μ s y voltaje en el detector de 900 V. La tolerancia de las distintas sustancias ensayadas se resumen en la Tabla nº VI-14.

Tabla nº VI-14.- Nivel de tolerancia de sustancias extrañas.

Interferente	Nivel de tolerancia (ng/ml)				
	D	S	1ªD ¹	1ªD ²	2ªD
Ácido p-Clorofenoxiacético	12100	10000	5000	15000	10000
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	5000	7200	4000	4000	10500
Carbendazima	2000	3000	1000	1500	3600
3-Amino-1,2,4-Triazol	1500	1000	600	600	1500
α -Naftol	150	250	100	100	200
2-(4-Thiazolil)-benzimidazol	30	30	20	20	65
2-Aminofenol	10	10	10	10	20

Al observar esta tabla se comprueba que el compuesto que menos interfiere es el ácido p-clorofenoxiacético mientras el más interferente es el 2-aminofenol. El método que ofrece los mayores niveles de tolerancia para los interferentes estudiados está basado en la segunda derivada sincrónica.

5. Aplicaciones analíticas.

Como se ha indicado anteriormente, la 1-naftaleneacetamida se aplica en la mayoría de las variedades del manzano y peral, por lo que se ha probado la eficacia y selectividad de los métodos propuestos realizando ensayos de recuperación de NAD en peras. Las

muestras de fruta fueron adquiridas en el mercado local y su origen y su tratamiento previo eran desconocidos.

Para llevar a cabo el estudio de recuperación, se ha seguido el siguiente procedimiento operatorio: *Se trocean 250 g de pera con un procesador de alimentos y se transfieren 15 g a un mortero (o una taza mezcladora). Se adiciona una cierta cantidad de NAD y 75 ml de H₂O y se mezclan durante 20 minutos, se filtra bajo succión y se lava el filtrado con tres porciones de 5 ml de H₂O. Se transfiere el filtrado y lavados a un matraz de 100 ml y se enrasa con H₂O.* A una alícuota de esta disolución se le aplica el procedimiento operatorio anteriormente propuesto. Las condiciones instrumentales a las cuales son llevadas a cabo las medidas de fosforescencia son las indicadas en el Procedimiento operatorio.

Los valores correspondientes a la intensidad de fosforescencia se interpolan en las funciones de calibrado obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla n° VI-15. En todos los casos los porcentajes de recuperación están en torno al 90 %, si bien los mejores resultados se obtienen el método directo con un porcentaje de recuperación del 92 % y una desviación estándar de 2'55.

Tabla n° VI-15.- Aplicación del método.

Muestra	ng/ml NAD puesto	% Recuperado				
		Directo	Sincrónico	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
1	250	92'2	96'3	87'4	88'4	87'4
	250	90'0	91'3	90'1	87'0	90'2
	250	94'2	90'2	91'0	89'2	86'5
2	250	90'2	91'4	89'4	94'0	95'4
	250	88'7	87'5	88'8	85'0	88'1
	250	91'2	94'0	90'2	91'4	87'9
3	250	90'7	91'0	92'5	90'1	89'1
	250	93'0	92'2	93'3	95'0	92'0
	250	97'1	93'2	88'4	87'2	86'3
X_{media}		91'9	91'8	90'1	89'7	89'2
σ_{n-1}		2'55	2'54	1'90	3'27	2'93

X_{media} - Valor promedio de las determinaciones
 σ_{n-1} - Desviación estándar de los valores



Capítulo VII

Determinación fosforimétrica del Carbaril

1. Estabilidad de la disolución madre.

El carbaril es un compuesto que se hidroliza rápidamente a pH básicos para dar lugar al 1-naftol y 1-naftolato, por lo se procedió a conocer la estabilidad de la disolución madre de CBL con el tiempo. Para llevar a cabo este estudio se preparó, en primer lugar, una disolución madre $1'98 \cdot 10^{-4}$ M según el siguiente procedimiento: a 200 μ l de una disolución $9'95 \cdot 10^{-3}$ M de CBL en CH_2Cl_2 , se le añaden 200 μ l de 1-pentanol y se enrasa hasta 10 ml con SDS 0'5 M agitando suavemente durante dos minutos. Posteriormente, se registraron a lo largo del tiempo, la intensidad de fluorescencia y de fosforescencia de muestras preparadas utilizando los siguientes procedimientos:

- Fluorescencia: 100 μ l de disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en microemulsión CH_2Cl_2 /1-pentanol/SDS se enrasa directamente en un matraz de 10 ml con agua destilada, midiendo la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda fluorescentes del CBL, 1-naftol y 1-naftolato, respectivamente.
- Fosforescencia: a 100 μ l de la disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en microemulsión CH_2Cl_2 /1-pentanol/SDS, se le añaden 600 μ l de SDS 0'5 M, 1000 μ l de $TiNO_3$ 0'25 M, 500 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l H_2SO_4 0'02 M, midiendo la intensidad de fosforescencia del CBL.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla n° VII-1.

Tabla n° VII-1.- Estabilidad de la disolución madre.

Tiempo (días)	Fluorescencia			Fosforescencia
	Carbaril ¹	1-Naftol ²	1-Naftolato ³	Carbaril ⁴
1	1'50	0'30	0'72	1'02
2	1'48	0'34	0'78	0'97
3	1'44	0'39	0'84	0'95
4	1'40	0'41	0'85	0'90
5	1'35	0'45	0'90	0'88
6	1'30	0'55	1'00	0'85

(1) $\lambda_{exc/em}$ 300/335 nm, rendijas exc/em 4/4 nm y sensibilidad 500 V.
(2) $\lambda_{exc/em}$ 300/460 nm, rendijas exc/em 4/4 nm y sensibilidad 700 V.
(3) $\lambda_{exc/em}$ 330/460 nm, rendijas exc/em 4/4 nm y sensibilidad 900 V.
(4) $\lambda_{exc/em}$ 292/490 nm, rendijas exc/em 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V.

Se observa que a medida que transcurre el tiempo, la fluorescencia de la disolución de carbaril, a un pH prácticamente neutro, va disminuyendo a la vez que aumenta la de 1-naftol y 1-naftolato, lo que demuestra la hidrólisis parcial del mismo en estos dos compuestos. En cuanto a la intensidad de fosforescencia del carbaril, ésta disminuye paulatinamente con el tiempo aunque, como la disminución es relativamente lenta se puede considerar inalterable durante 4 días.

2. Características espectroscópicas.

2.1. Características fluorescentes.

Con objeto de conocer las características fluorescentes del CBL, se procedió a llevar a cabo un barrido de excitación y emisión en el modo fluorescencia. Para ello, a una alícuota de 100 μl de la disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en microemulsión $\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-pentanol/SDS}$, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M y se enrasó con agua destilada hasta 10 ml. De esta forma la concentración final de CBL fue de 400 ng/ml. Se siguió la técnica operatoria que se describe a continuación: Se fijó el monocromador de excitación a 292 nm, rendijas de excitación y emisión 4 nm, sensibilidad 500 V y velocidad de barrido de los monocromadores 8 nm/s. Se registró el espectro de emisión observando dos máximos a 335 y 345 nm, siendo el primero más intenso. Fijada la longitud de onda de este máximo en el monocromador de emisión, se registró el espectro de excitación, trabajando en las mismas condiciones, obteniendo un máximo de excitación a 292 nm, eligiendo, por tanto, 292 y 335 como longitudes de excitación y emisión fluorescentes del carbaril. Dichos espectros se encuentran en la Figura n° n° VII-1.

2.1. Características fosforescentes.

Se procedió al establecimiento de los espectros de excitación y emisión fosforescente del carbaril en microemulsión $\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-pentanol/SDS}$, en presencia de SDS, TlNO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 . El procedimiento seguido para la obtención de las características fosforescentes fue el siguiente: A una alícuota de 100 μl de la disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en microemulsión $\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-pentanol/SDS}$, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de TlNO_3 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada. De esta forma la concentración final de CBL fue de 400

ng/ml. Se fijó la longitud de onda de excitación en 292 nm y se registró el espectro de emisión con una velocidad de barrido de los monocromadores de 2 nm/s, m.p.f. 5 ms, sensibilidad del detector 1100 V, rendijas de excitación y emisión 16/16 nm respectivamente, tiempo de decaimiento 200 μ s y tiempo de integración 1000 μ s, obteniendo dos máximos a 490 y 524 nm, siendo el primero más intenso. Fijando este máximo de emisión en el monocromador respectivo, siempre en las mismas condiciones instrumentales, se registró el espectro de excitación obteniendo un máximo a 292 nm, pudiendo considerar que 292 y 490 nm son los máximos de excitación y emisión fosforescente del CBL. El espectro de fosforescencia obtenido en estas condiciones se encuentra representado en la Figura n° VII-2. Las longitudes de onda de excitación y emisión fosforescentes seleccionadas para el resto del trabajo experimental han sido:

$$\lambda_{\text{exc}}: 292 \text{ nm y } \lambda_{\text{em}}: 490 \text{ nm}$$

De igual forma se ha registrado el espectro de fosforescencia total, para un mayor conocimiento de sus características espectroscópicas. Este espectro se ha realizado en condiciones instrumentales análogas a las utilizadas anteriormente, con un barrido de emisión entre 400 y 700 nm y de excitación entre 250 y 350 nm, velocidad de barrido 2 nm/s y paso de monocromador de 2 nm y 4 nm para el de emisión y excitación respectivamente, sensibilidad 1100 V, tiempo de decaimiento 200 μ s y tiempo de integración 1000 μ s. Dicho espectro de fosforescencia total junto con su respectivo mapa de contorno se muestran en la Figura n° VII-3.

2.2.1. Curva de decaimiento.

Una característica interesante de los compuestos fosforescentes es el tiempo de vida media. Para su cálculo se procedió al registro de la curva de decaimiento fosforescente de una muestra preparada siguiendo la misma metodología que en el apartado anterior, registrando dicha curva a las siguientes condiciones instrumentales: 0 a 3000 μ s cada 50 μ s, 100 repeticiones, $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, rendijas exc/em 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/1000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V. La curva de decaimiento obtenida se presenta en la Figura n° VII-4.

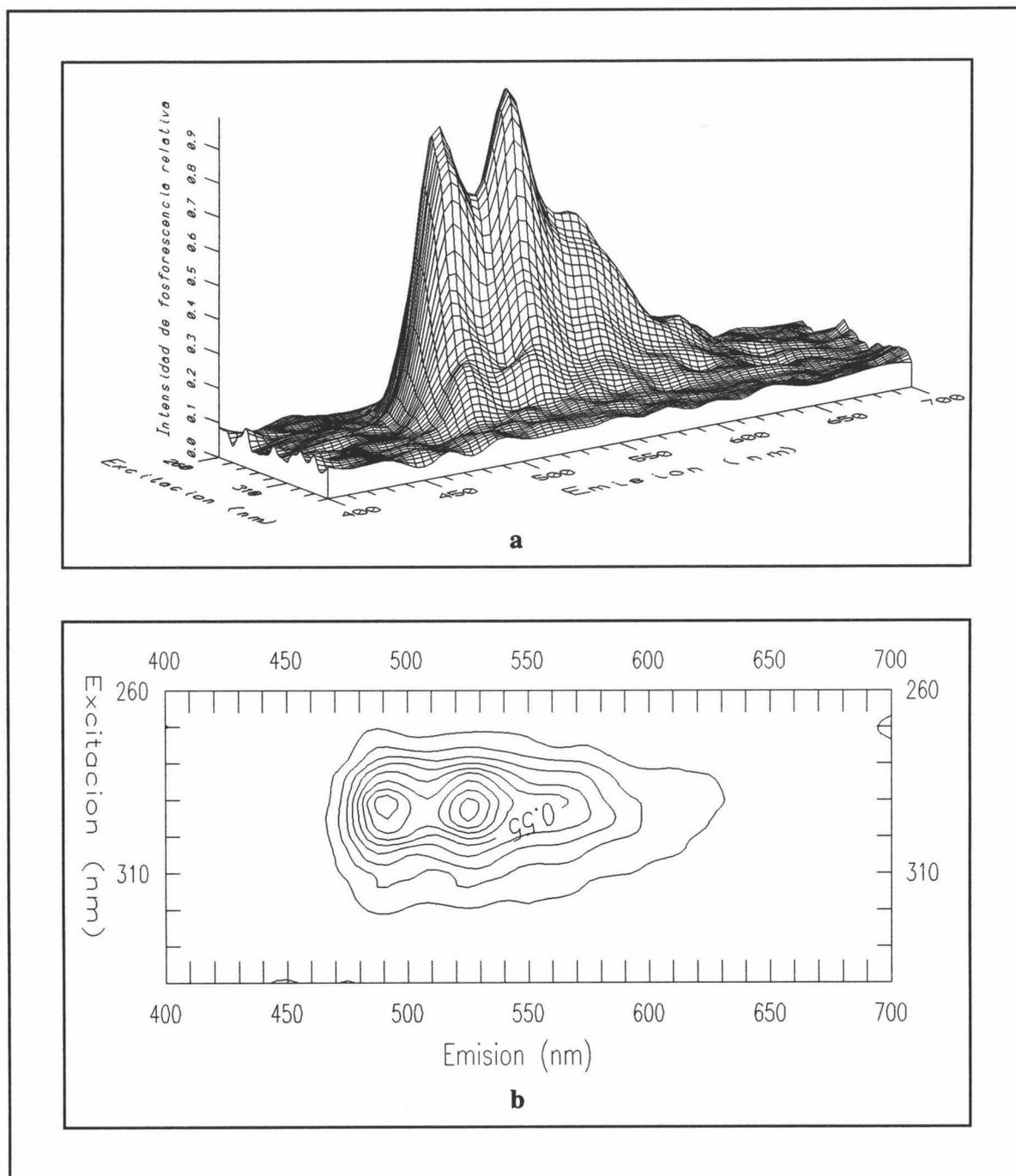


Figura nº VII-3.- *Espectro de fosforescencia total (a) y mapa de contorno (b). [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, $[TiNO_3]$ $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

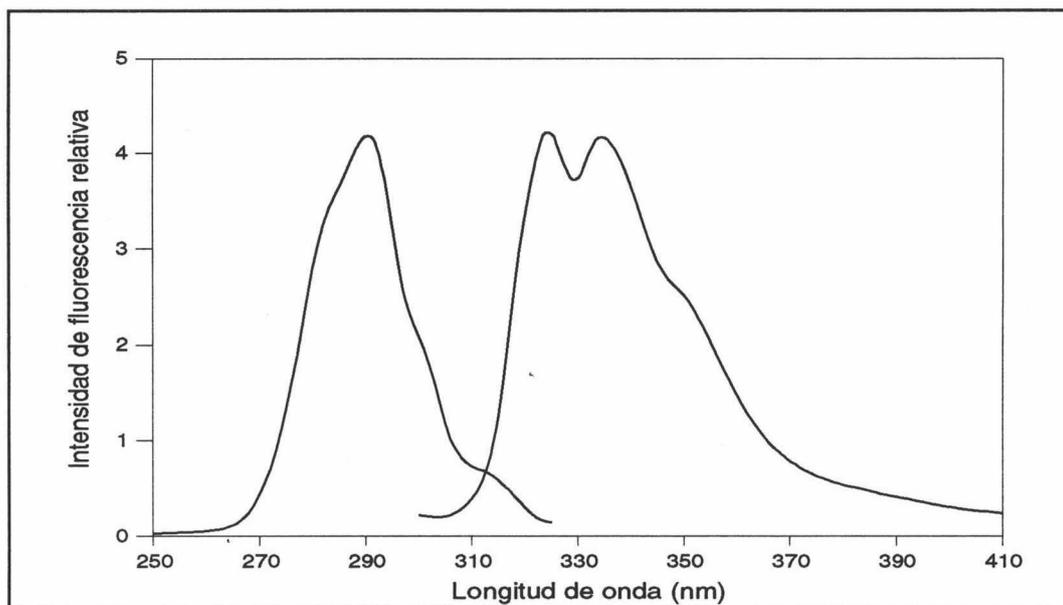


Figura n° VII-1.- *Espectros de excitación y emisión fluorescente. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M.*

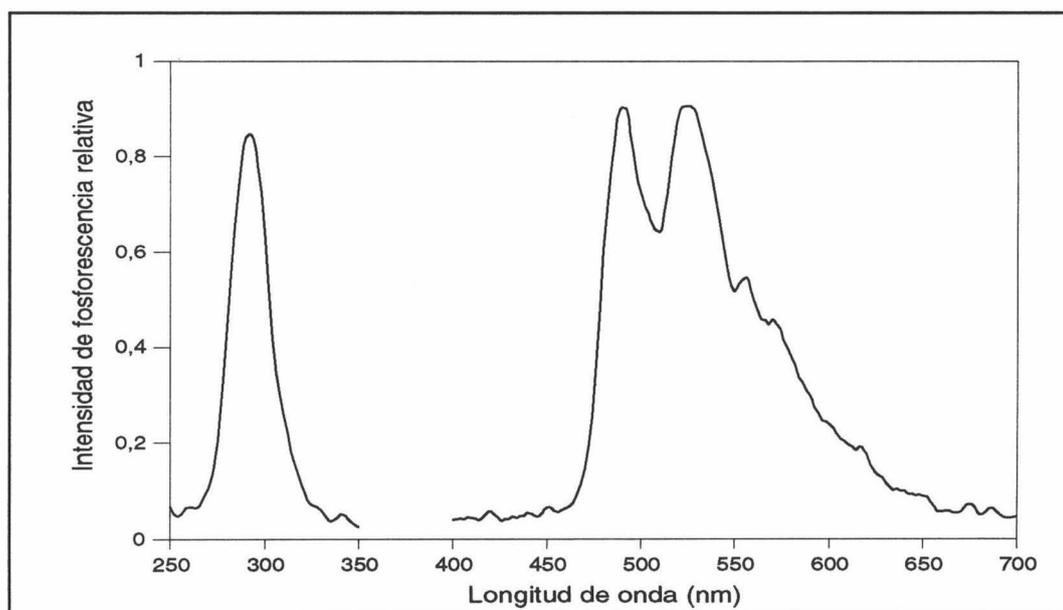


Figura n° VII-2.- *Espectros de excitación y emisión fosforescentes. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, $[\text{TlNO}_3]$ $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

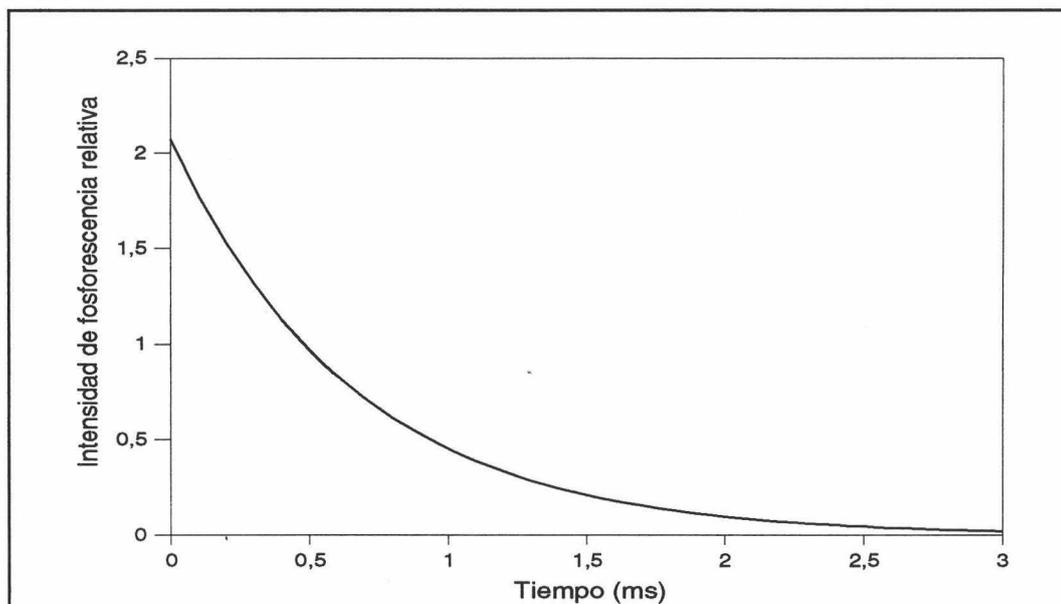


Figura n° VII-4.- Curva de decaimiento fosforescente. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, $[TiNO_3]$ $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

De esta curva mediante ajuste a una exponencial se puede determinar el valor del parámetro vida media para el CBL en estas condiciones. El valor de este parámetro es:

Vida media: 657 μs

3. Selección de variables experimentales.

3.1. Optimización conjunta de agente micelar, $TiNO_3$, Na_2SO_3 y H_2SO_4 .

El carbaril, al igual que el NAD, es un naftaleno α - sustituido, y como ocurría con este compuesto el desarrollo de métodos fosforimétricos a temperatura ambiente mediante la utilización de medios micelares se reduce a la utilización de SDS como agente micelar. Para comprobarlo se prepararon tres tipos de muestras:

- Muestra 1: a 100 μl de la disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en microemulsión CH_2Cl_2 /1-pentanol/SDS, se le añaden 600 μl de SDS 0'5 M, 1000 μl de $TiNO_3$ 0'25 M, 500 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl H_2SO_4 0'02 M, enrasando a 10 ml con agua destilada.

- Muestra 2: a 100 μl de la disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, se le añadieron 800 μl de TX-100 $2'0 \cdot 10^{-4}$ M, 2600 μl de TlNO_3 $0'25$ M, 500 μl de Na_2SO_3 $0'1$ M y 800 μl de H_2SO_4 $0'02$ M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml.
- Muestra 3: a 100 μl de la disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en Brij-35 $7'0 \cdot 10^{-4}$ M, se le añadieron 1200 μl de Brij-35 $7'0 \cdot 10^{-4}$ M, 3300 μl de TlNO_3 $0'25$ M, 500 μl de Na_2SO_3 $0'1$ M y 800 μl de H_2SO_4 $0'02$ M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml.

A estas muestras se les registró el espectro de emisión y las curvas de decaimiento a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, rendijas $_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, m.p.f. 5 ms, sensibilidad 1100 V (para el sistema CBL/SDS) y 1275 V (para los sistemas CBL/TX-100 o CBL/Brij-35), t_{dig} 200/1000 μs (para el sistema CBL/SDS) y 100/200 μs (para los sistemas CBL/TX-100 o CBL/Brij-35). Los espectros de emisión se presentan en la Figura n° VII-5.

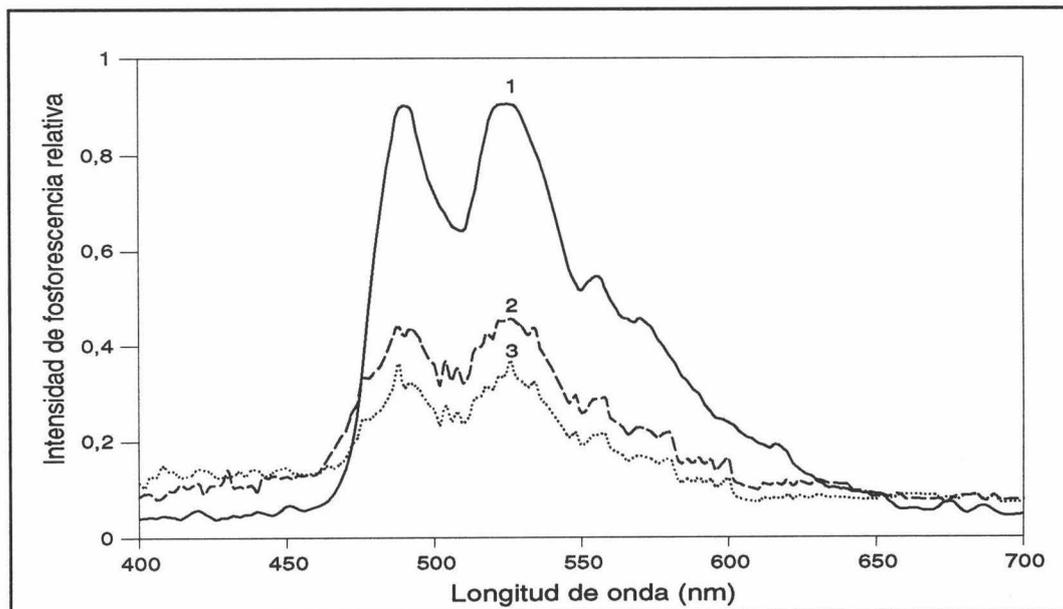


Figura n° VII-5.- Espectros de emisión: (1) $[\text{NAD}]$ 500 ng/ml, $[\text{SDS}]$ $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, $[\text{TlNO}_3]$ $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M; (2) $[\text{NAD}]$ 500 ng/ml, $[\text{TX-100}]$ $1'52 \cdot 10^{-5}$ M, $[\text{TlNO}_3]$ $6'50 \cdot 10^{-2}$ M, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M; (3) $[\text{NAD}]$ 500 ng/ml, $[\text{Brij-35}]$ $8'40 \cdot 10^{-5}$ M, $[\text{TlNO}_3]$ $8'00 \cdot 10^{-2}$ M, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

Las curvas de decaimiento correspondientes a cada una de las muestras preparadas se representan en la Figura n° VII-6.

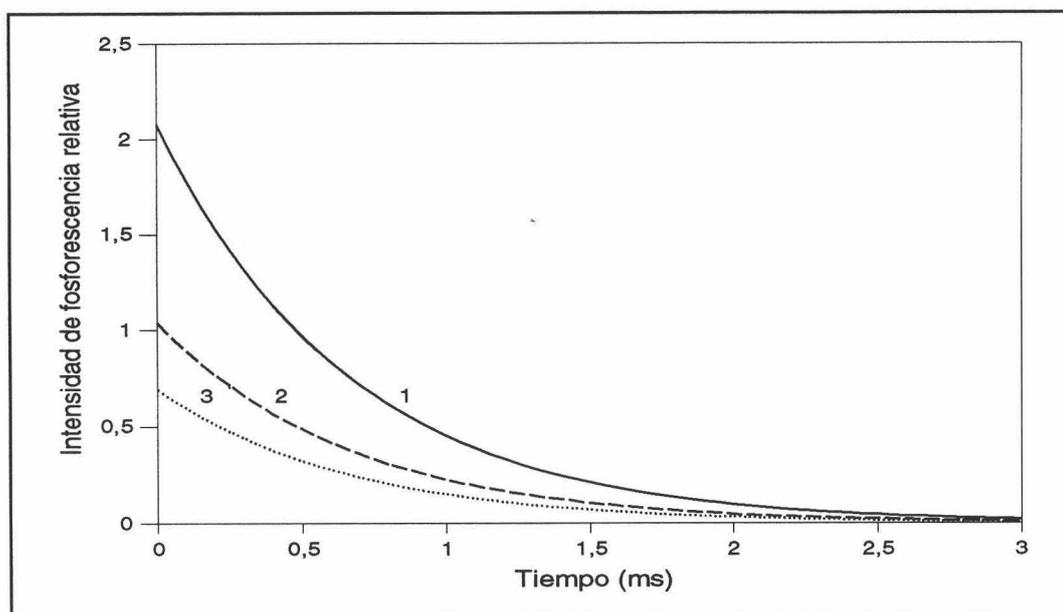


Figura n° VII-6.- Curvas de decaimiento: (1) [NAD] 500 ng/ml, [SDS] $3'00 \cdot 10^{-2}$ M, [TINO₃] $2'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M; (2) [NAD] 500 ng/ml, [TX-100] $1'52 \cdot 10^{-5}$ M, [TINO₃] $6'50 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M; (3) [NAD] 500 ng/ml, [Brij-35] $8'40 \cdot 10^{-5}$ M, [TINO₃] $8'00 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $5'00 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

Como se deduce de este estudio, para el analito CBL la mejor posibilidad de desarrollo de método fosforimétrico es mediante el empleo de SDS como agente micelar. Recientemente, Yansheng y col. (1994) han propuesto un método fosforimétrico para este analito en este medio, por lo que se procedió a observar las posibilidades de desarrollo de un método fosforimétrico del carbaril pero mediante el empleo de microemulsiones.

Por tanto el estudio queda reducido, para este analito α - sustituido, a un agente micelar, el SDS mediante la utilización de microemulsiones, las cuales presentan ciertas ventajas frente a los medios micelares.

Suponiendo que los óptimos de concentración experimentales para el SDS, el TINO₃, el Na₂SO₃ y el H₂SO₄ van a permanecer inalterables para los diferentes tipos de

agentes emulsionantes, se optimizaron dichas concentraciones fijando el tipo de agente emulsionante ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-pentanol}$).

La optimización de las cuatro variables experimentales se llevó a cabo mediante la utilización de un diseño compuesto hipercúbico estrellado. Para ello, a $100 \mu\text{l}$ de la disolución madre $1'98 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ de CBL en microemulsión $\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-pentanol}/\text{SDS}$, se le añaden volúmenes variables de $\text{SDS } 0'5 \text{ M}$, $\text{TINO}_3 \text{ } 0'25 \text{ M}$, $\text{Na}_2\text{SO}_3 \text{ } 0'1 \text{ M}$ y $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0'02 \text{ M}$, tal y como lo requiere el diseño. De esta disolución, se introdujeron $1'5 \text{ ml}$ en la cubeta de medida y se midió la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}} \text{ } 292/490 \text{ nm}$, rendijas $\text{exc/em} \text{ } 16/16 \text{ nm}$, tiempo de decaimiento $200 \mu\text{s}$, tiempo de integración $1000 \mu\text{s}$, m.p.f. de 5 ms y sensibilidad 1100 V . La matriz del diseño empleado junto con los valores de intensidad de fosforescencia se muestran en la Tabla nº VII-2.

La Tabla nº VII-3, presenta el análisis de la varianza correspondiente al diseño anterior. Se comprueba que la intensidad de fosforescencia depende de las concentraciones de SDS , TINO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 , de forma cuadrática, no siendo significativos los coeficientes lineales, a excepción del que relaciona a la intensidad de fosforescencia con la concentración de TINO_3 . Los dos únicos términos cruzados que son significativos son los que relacionan las concentraciones de SDS y TINO_3 y Na_2SO_3 y H_2SO_4 . El modelo se ajusta bien a los datos experimentales, tal y como se deduce de los datos del ANOVA referidos al fallo de ajuste y del coeficiente de determinación, con un valor de $0'9371$.

La valoración del diseño permite conocer la localización del óptimo del sistema así como de la dependencia, en forma gráfica, de la intensidad de fosforescencia del CBL con las concentraciones de SDS , TINO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 de forma univariante (Figura nº VII-7) o bivariante (Figura nº VII-8). Dichos coeficientes de regresión así como el óptimo calculado con su correspondiente verificación se presentan en la Tabla nº VII-4. Para el resto del trabajo experimental, se han seleccionado las siguientes concentraciones de trabajo:

$[\text{SDS}] = 3'07 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$[\text{Na}_2\text{SO}_3] = 4'96 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
$[\text{TINO}_3] = 2'62 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$[\text{H}_2\text{SO}_4] = 1'60 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Tabla n° VII-2.- Diseño experimental para el sistema Carbaril - SDS - $TiNO_3$ - Na_2SO_3 - H_2SO_4 (agente emulsionante $CH_2Cl_2/1$ -pentanol).

Punto	Variables experimentales				pH	$I_{Fosf.}^1$
	[SDS] ($\cdot 10^{-2}$)	[$TiNO_3$] ($\cdot 10^{-2}$)	[Na_2SO_3] ($\cdot 10^{-3}$)	[H_2SO_4] ($\cdot 10^{-3}$)		
1	3'00(0)	2'50(0)	5'00(0)	1'60(0)	6'64	0'95
2	2'00(-1)	2'00(-1)	4'50(-1)	1'80(1)	6'44	0'80
3	2'00	3'00(1)	4'50	1'80	6'27	0'74
4	2'00	2'00	4'50	1'40(-1)	6'67	0'89
5	4'00(1)	3'00	4'50	1'40	6'70	0'91
6	2'00	2'00	5'50(1)	1'40	6'88	0'75
7	4'00	2'00	5'50	1'40	6'93	0'68
8	4'00	3'00	4'50	1'80	6'51	0'73
9	4'00	2'00	4'50	1'40	6'75	0'88
10	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'92
11	4'00	2'00	5'50	1'80	6'93	0'89
12	2'00	3'00	5'50	1'40	6'84	0'65
13	4'00	3'00	5'50	1'40	6'90	0'73
14	4'00	2'00	4'50	1'80	6'57	0'70
15	2'00	3'00	4'50	1'40	6'62	0'90
16	2'00	3'00	5'50	1'80	6'59	0'90
17	4'00	3'00	5'50	1'80	6'68	0'89
18	2'00	2'00	5'50	1'80	6'70	0'88
19	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'97
20	0'94(-2'058)	2'50	5'00	1'60	6'60	0'87
21	3'00	3'52(2'058)	5'00	1'60	6'61	0'90
22	5'06(2'058)	2'50	5'00	1'60	6'66	0'90
23	3'00	1'47(-2'058)	5'00	1'60	6'75	0'76
24	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'94
25	3'00	2'50	5'00	1'19(-2'058)	6'90	0'69
26	3'00	2'50	5'00	2'01(2'058)	6'40	0'78
27	3'00	2'50	3'97(-2'058)	1'60	6'44	0'70
28	3'00	2'50	6'03(2'058)	1'60	6'84	0'68
29	3'00	2'50	5'00	1'60	6'64	0'96

¹ $\lambda_{exc/em}$ 292/490 nm, rendijas exc/em 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μs , m.p.f. de 5 ms y sensibilidad 1100 V

Tabla nº VII-3.- *Análisis de la varianza.*

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P
a ₁	0'0000598	1	0'0000598	0'16	0'7122
a ₂	0'0029377	1	0'0029377	7'94	0'0479
a ₃	0'0019988	1	0'0019988	5'40	0'0808
a ₄	0'0010537	1	0'0010537	2'85	0'1668
a ₁₂	0'0036000	1	0'0036000	9'73	0'0356
a ₁₃	0'0009000	1	0'0009000	2'43	0'1939
a ₁₄	0'0009000	1	0'0009000	2'43	0'1939
a ₂₃	0'0001000	1	0'0001000	0'27	0'6358
a ₂₄	0'0000000	1	0'0000000	0'00	0'0000
a ₃₄	0'1156000	1	0'1156000	312'43	0'0001
a ₁₁	0'0037812	1	0'0037812	10'22	0'0330
a ₂₂	0'0170404	1	0'0170404	46'06	0'0025
a ₃₃	0'0938170	1	0'0938170	253'56	0'0001
a ₄₄	0'0900111	1	0'0900111	243'27	0'0001
Fallo de ajuste	0'0174503	10	0'0017450	4'72	0'0742
Error Puro	0'0014800	4	0'0003700		
Total	0'3009793	28			

Tabla nº VII-4.- *Valoración del diseño experimental para el sistema Carbaril - SDS - TiNO₃ - Na₂SO₃ - H₂SO₄.*

Coeficientes		
a ₁ = -2'21732		
a ₂ = 47'2937		
a ₃ = 906'194		
a ₄ = 409'405		
a ₁₂ = 300		
a ₁₃ = 1500	Coordenadas del óptimo [SDS] = 3'07·10 ⁻² M [TiNO ₃] = 2'62·10 ⁻² M [Na ₂ SO ₃] = 4'94·10 ⁻³ M [H ₂ SO ₄] = 1'60·10 ⁻³ M	Naturaleza del óptimo A ₁ < 0 A ₂ > 0 A ₃ < 0 A ₄ > 0
a ₁₄ = -3750		
a ₂₃ = -1000		
a ₂₄ = -5'2154·10 ⁻⁸		
a ₃₄ = 850000		Es un máximo
a ₁₁ = -115'651		
a ₂₂ = -982'047		
a ₃₃ = -230427		
a ₄₄ = -1'41065·10 ⁶		
a = -2'208		

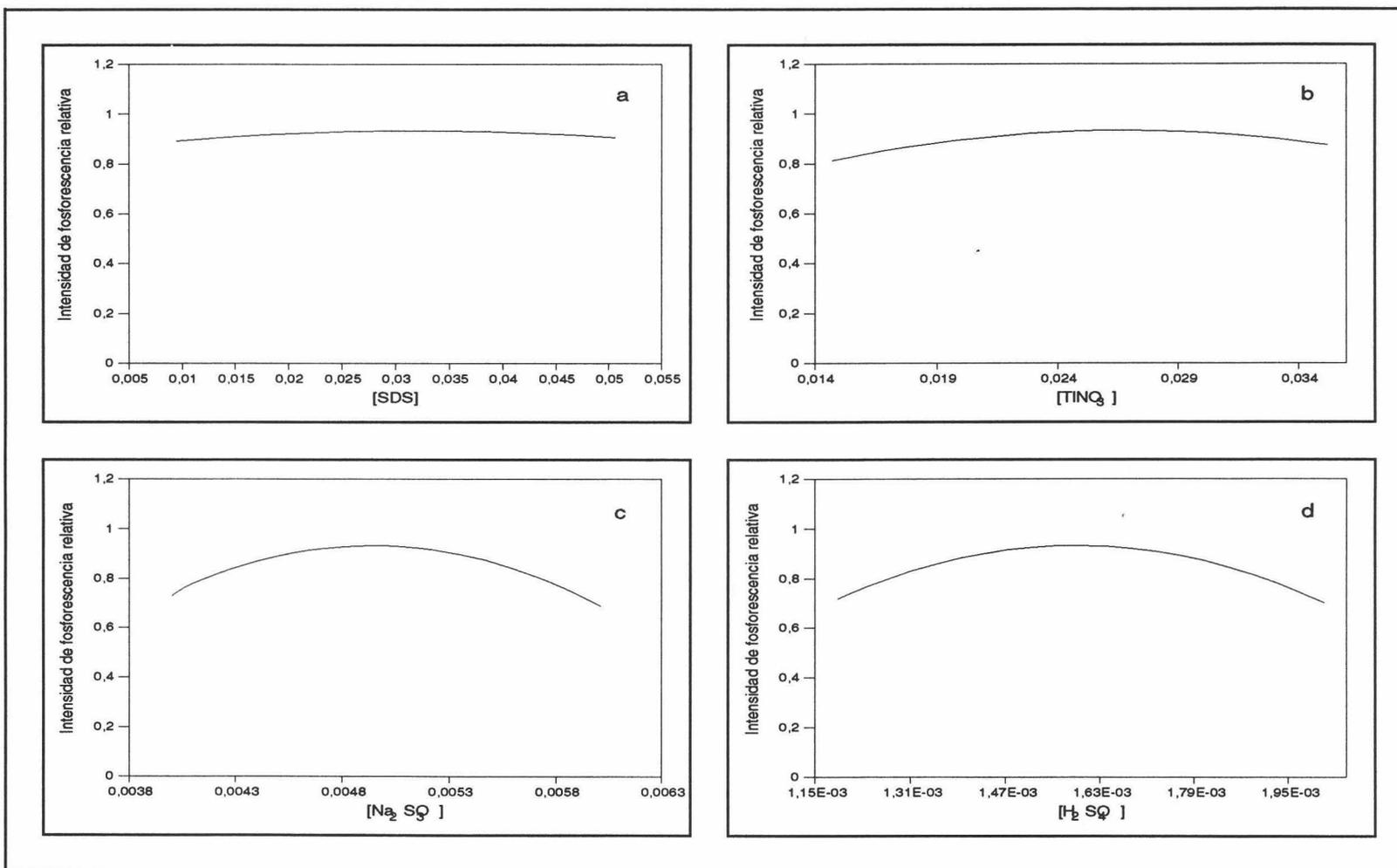


Figura nº VII-7.- Variación de la intensidad de fosforescencia del CBL con la [SDS] (a), [TiNO₃] (b), [Na₂SO₃] (c) y la [H₂SO₄] (d). [CBL] 400 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 292/490 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V.

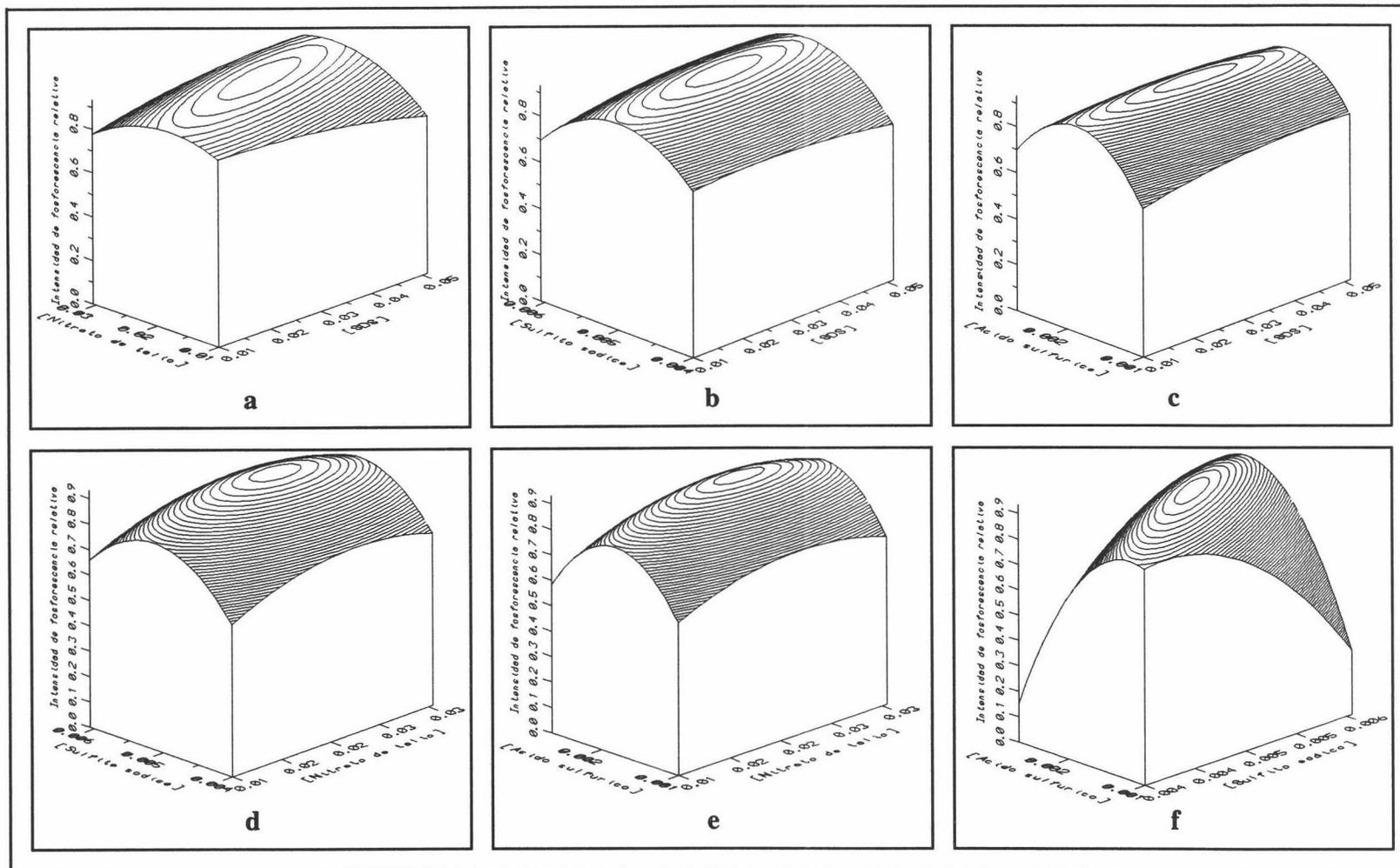


Figura n° VII-8.- Variación de la intensidad de fosforescencia del CBL con [SDS] y $[TiNO_3]$ (a), [SDS] y $[Na_2SO_3]$ (b), [SDS] y $[H_2SO_4]$ (c), $[TiNO_3]$ y $[Na_2SO_3]$ (d), $[TiNO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (e) y $[Na_2SO_3]$ y $[H_2SO_4]$ (f). [CBL] 400 ng/ml, $\lambda_{exc/em}$ 292/490 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μ s, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V.

3.2. Selección del tipo de microemulsión.

Conocidas las concentraciones óptimas de SDS, TlNO_3 , Na_2SO_3 y H_2SO_4 y admitiendo que éstas permanecen inalterables para cualquier tipo de agente emulsionante, se procedió a la selección de éste. Se probaron diez tipos diferentes de agentes emulsionantes, algunos de ellos indicados en capítulos anteriores y otros que no habían sido empleados hasta ahora. Para llevar a cabo esta experiencia se utilizó el siguiente procedimiento: *Se prepararon una serie de disoluciones madre de CBL mezclando 200 μl de una disolución $9'95 \cdot 10^{-3}$ M de en un compuesto orgánico (CH_2Cl_2 , CHCl_3 , CCl_4 , ciclohexano, *n*-pentano, *n*-hexano o *n*-heptano) con 200 μl de co-surfactante (1-butanol, 1-pentanol o 1-hexanol) y enrasando hasta 10 ml con SDS 0'5 M. A una alícuota de 100 μl de estas disoluciones se le añadió 614 μl de SDS 0'5 M, 1048 μl de TlNO_3 0'25 M, 496 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml, a estas muestras se les registró la intensidad de fosforescencia emitida a 490 nm. Los resultados se reflejan en la Tabla n° VII-5.*

Tabla n° VII-5.- Selección del tipo de microemulsión.

Agente emulsionante	$I_{\text{Fosf.}}^1$	Estabilidad
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-pentanol}$	0'96	Estable
$\text{CHCl}_3/1\text{-pentanol}$	0'86	No estable
$\text{CCl}_4/1\text{-pentanol}$	0'95	No estable
Ciclohexano/1-pentanol	1'03	No estable
N-hexano/1-pentanol	0'92	Estable
N-Heptano/1-pentanol	0'94	Estable
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-butanol}$	0'84	Estable
N-hexano/1-butanol	0'86	Estable
N-heptano/1-butanol	0'83	Estable
Ciclohexano/1-butanol	0'85	Estable

¹ $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, $\text{rendijas}_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V.

De entre las microemulsiones estables a lo largo del tiempo los mejores resultados se obtienen empleando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-pentanol}$ como agente emulsionante, aunque las diferencias en las intensidades de fosforescencia obtenidas para cada caso, no son muy significativas. Sin embargo, se eligió para el resto del trabajo experimental se seleccionó:

Agente emulsionante: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-pentanol}$

Seleccionada la mezcla CH_2Cl_2 /1-pentanol se procedió a determinar la proporción óptima de ambos constituyentes. Esta optimización se llevó a cabo mediante la utilización de un diseño experimental de dos variables. Para ello, se prepararon disoluciones madre de CBL $1'98 \cdot 10^4$ M adicionando distintas cantidades de CH_2Cl_2 y 1-pentanol tal y como exige el diseño; se tomaron 100 μl de cada una de ellas, y se les añadió 614 μl de SDS 0'5 M, 1048 μl de TINO_3 0'25 M, 496 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml midiendo la intensidad de fosforescencia en las mismas condiciones que la Tabla n° VII-5. La matriz del diseño se muestra en la Tabla n° VII-6, y el correspondiente análisis de la varianza y la valoración se muestran en las Tablas n° VII-7 y VII-8, respectivamente.

Tabla n° VII-6.- Desarrollo del diseño experimental bidimensional.

Punto	μl CH_2Cl_2	μl 1-pentanol	$I_{\text{Fosf.}}$
1	200(0)	200(0)	0'95
2	300(1)	300(1)	0'95
3	100(-1)	100(-1)	0'97
4	200	200	0'98
5	100	300	0'90
6	300	100	0'92
7	200	60(-1'414)	0'90
8	60(-1'414)	200	0'92
9	200	200	0'97
10	200	350(1'414)	0'95
11	350(1'414)	200	0'95
12	200	200	0'96

Tabla n° VII-7.- Análisis de la varianza.

Coefficiente de regresión	SC	g.l.	MC	F_{cal}	P
a_1	0'0002889	1	0'0002889	0'96	0'4085
a_2	0'0001896	1	0'0001896	0'63	0'4925
a_{12}	0'0025000	1	0'0025000	8'33	0'0632
a_{11}	0'0011761	1	0'0011761	3'92	0'1421
a_{22}	0'0020831	1	0'0020831	6'64	0'0780
Fallo de ajuste	0'0020327	3	0'0006776	2'26	0'2604
Error Puro	0'0009000	3	0'0003000		
Total	0'0084667	11			

Tabla n° VII-8.- Valoración del diseño experimental.

Coeficientes		
$a_1 = 5'032 \cdot 10^{-4}$		
$a_2 = 6'883 \cdot 10^{-4}$	Coordenadas del extremo	Naturaleza del extremo
$a_{12} = 2'5 \cdot 10^{-6}$	$\mu\text{l CH}_2\text{Cl}_2 = 220 \mu\text{l}$	$A_1 < 0$
$a_{11} = -2'375 \cdot 10^{-6}$	$\mu\text{l 1-pentanol} = 215 \mu\text{l}$	$A_2 > 0$
$a_{22} = -2'875 \cdot 10^{-6}$		Es un máximo
$a = 0'857$		

Como se deduce de la tabla del análisis de la varianza del diseño anterior, ninguno de los coeficiente de regresión que relacionan la intensidad de fosforescencia con las concentraciones de CH_2Cl_2 y 1-pentanol son significativos, por tanto no es estrictamente necesario trabajar a este óptimo calculado. Para el resto del trabajo experimental, se eligió $200 \mu\text{l}$ (2 %) como porcentaje óptimo de CH_2Cl_2 y 1-pentanol.

% CH_2Cl_2 y 1-pentanol: 2 %
--

3.3. Optimización del volumen de muestra.

Sobre la influencia del volumen de muestra en el tiempo de estabilización de la señal analítica las conclusiones son análogas a los sistemas ya estudiados. Para llevar a cabo esta experiencia: *Se prepararon una serie de disoluciones adicionando a $100 \mu\text{l}$ de una disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ en CH_2Cl_2 /1-pentanol/SDS, $634 \mu\text{l}$ de SDS $0'5 \text{ M}$, $1068 \mu\text{l}$ de TINO_3 $0'25 \text{ M}$, $494 \mu\text{l}$ de Na_2SO_3 $0'1 \text{ M}$ y $795 \mu\text{l}$ de H_2SO_4 $0'02 \text{ M}$, y enrasando con agua destilada hasta 10 ml . De estas disoluciones se colocaron distintos volúmenes entre $1'5$ y 4 ml en la cubeta de medida, registrando la variación de la intensidad de fosforescencia con el tiempo a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ $292/490 \text{ nm}$, rendijas_{exc/em} $16/16 \text{ nm}$, $t_{\text{d/g}}$ $200/1000 \mu\text{s}$, m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V . Este estudio se muestra en la Figura n° VII-9.*

Se observa que, a medida que aumenta el volumen de muestra introducido en la cubeta de medida, la señal requiere más tiempo para la estabilización, pasando de $1'5$

minutos para un volumen de 1'5 ml hasta 3 minutos cuando el volumen introducido es del orden de los 4 ml. Por tanto, para el resto del trabajo experimental se eligió como volumen óptimo para introducir en la cubeta de medida:

Volumen de muestra: 1'5 ml

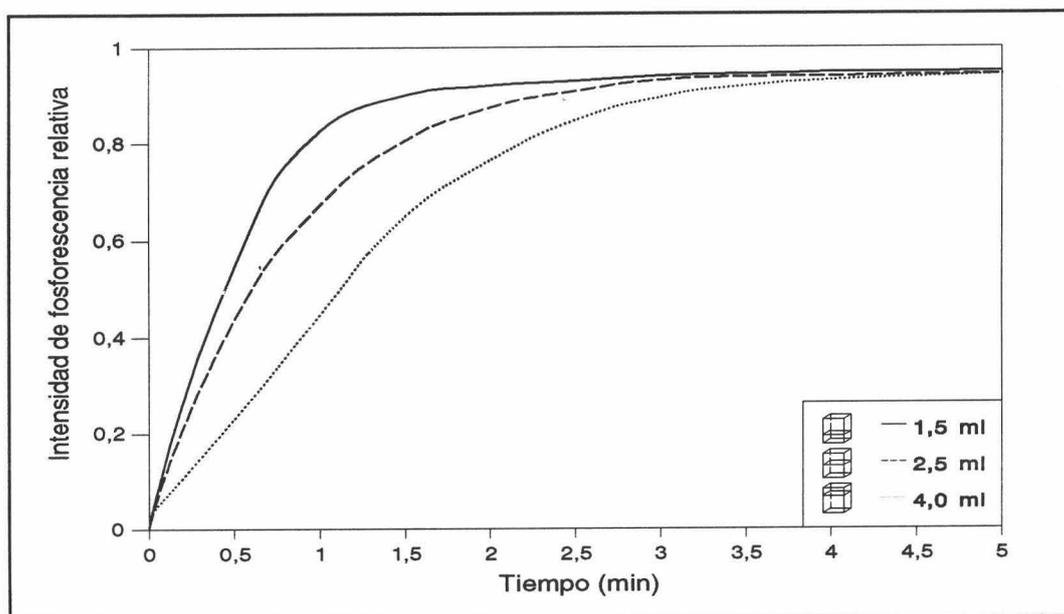


Figura nº VII-9.- *Influencia del volumen introducido de muestra. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, [TlNO₃] $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

3.4. Influencia del orden de adición.

Como en capítulos anteriores, se han estudiado distintos órdenes en la preparación de las muestras. Para llevar a cabo esta experiencia, se prepararon una serie de disoluciones mezclando 100 µl de una disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en CH_2Cl_2 /1-pentanol/SDS, 614 µl de SDS 0'5 M, 1048 µl de TlNO₃ 0'25 M, 496 µl de Na₂SO₃ 0'1 M y 800 µl de H₂SO₄ 0'02 M en distintos órdenes, y enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones se introdujeron 1'5 ml en la cubeta de medida registrando la intensidad de fosforescencia. Los resultados se presentan en la Tabla nº VII-9.

A la vista de estos resultados, no se observaron diferencias significativas entre los distintos órdenes de adición probados, por lo que se mantuvo el orden de adición hasta



ahora utilizado y que fue:

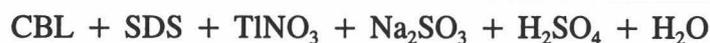


Tabla n° VII-9.- Influencia del orden de adición.

Orden de adición	$I_{\text{Fosf.}}^1$
CBL + SDS + TINO ₃ + Na ₂ SO ₃ + H ₂ SO ₄ + H ₂ O	1'05
CBL + TINO ₃ + H ₂ SO ₄ + SDS + Na ₂ SO ₃ + H ₂ O	1'03
CBL + H ₂ SO ₄ + TINO ₃ + Na ₂ SO ₃ + SDS + H ₂ O	0'97
CBL + TINO ₃ + SDS + H ₂ SO ₄ + Na ₂ SO ₃ + H ₂ O	0'98
CBL + SDS + TINO ₃ + H ₂ SO ₄ + Na ₂ SO ₃ + H ₂ O	1'06
TINO ₃ + H ₂ SO ₄ + SDS + Na ₂ SO ₃ + CBL + H ₂ O	0'97
SDS + H ₂ SO ₄ + Na ₂ SO ₃ + CBL + TINO ₃ + H ₂ O	1'03
TINO ₃ + CBL + Na ₂ SO ₃ + SDS + H ₂ SO ₄ + H ₂ O	1'02
Na ₂ SO ₃ + SDS + CBL + H ₂ SO ₄ + TINO ₃ + H ₂ O	0'99

¹ $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V.

3.5. Influencia de la temperatura.

Una variable importante de controlar en este tipo de sistemas fosforimétricos es la temperatura. Para ello, se llevó a cabo el siguiente procedimiento operatorio: *Se preparó una disolución conteniendo 100 μl de una disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en CH_2Cl_2 /1-pentanol/SDS, 614 μl de SDS 0'5 M, 1048 μl de TINO₃ 0'25 M, 496 μl de Na₂SO₃ 0'1 M y 800 μl de H₂SO₄ 0'02 M, y enrasando con agua destilada hasta 10 ml, se introducen 1'5 ml de la misma en una cubeta de medida, y se midió la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V. La temperatura del baño que termostatiza la célula de medida se varió entre 5 y 45 °C a intervalos de 10 °C.*

Como se observa en la Figura n° VII-10, a medida que aumenta la temperatura, se produce un descenso de la intensidad de fosforescencia, por lo que el control de temperatura para llevar a cabo las medidas fosforimétricas deberá ser riguroso. Para el resto del trabajo experimental, se termostatizará el compartimiento de cubeta a:

Temperatura: 25 °C

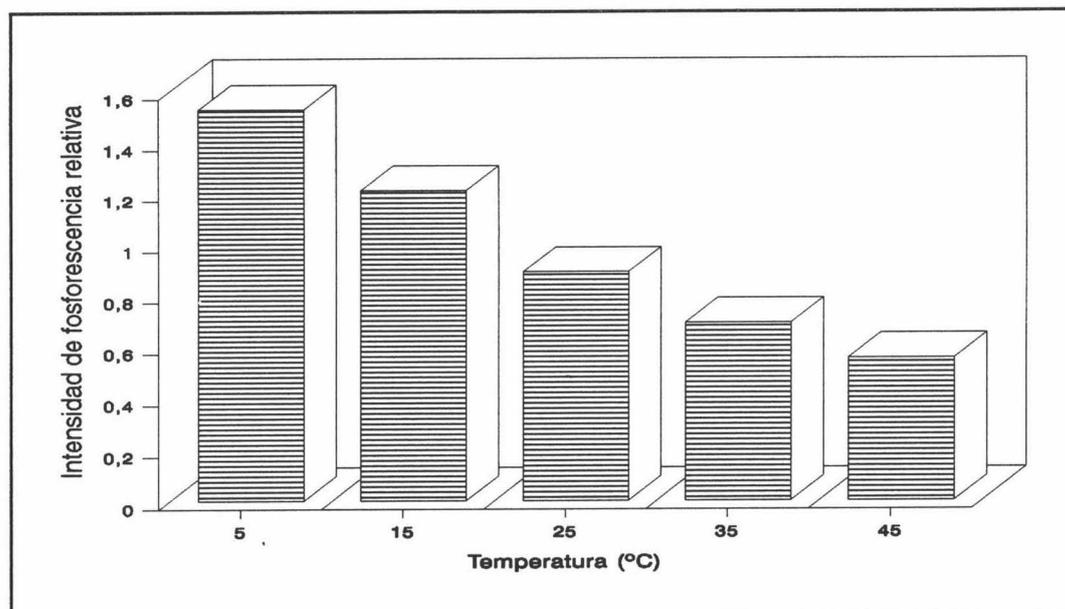


Figura n° VII-10.- *Influencia de la temperatura. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, $[TiNO_3]$ $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

3.6. Estabilidad con el tiempo.

Conocida la cinética existente para la obtención del máximo de intensidad de fosforescencia, se procedió a estudiar la estabilidad con el tiempo de dicha señal. Para llevar a cabo esta experiencia se siguió el procedimiento operatorio del apartado anterior mostrando los resultados del estudio en la Figura n° VII-11.

Como se observa en dicha figura, después de un período de 2 minutos para alcanzar el máximo de intensidad de fosforescencia, la señal permanece constante durante, al menos, una hora, tiempo suficiente para llevar a cabo las medidas analíticas oportunas.

3.7. Influencia concentración de analito.

Este estudio se llevó a cabo para establecer de forma precisa el rango dinámico lineal donde se puede desarrollar el método, así como información adicional sobre cual es el comportamiento del sistema a otras concentraciones de analito distintas a la utilizada en la optimización de las variables experimentales. Para ello, a distintas alícuotas de una disolución madre $1'98 \cdot 10^{-4}$ M de CBL en microemulsión $CH_2Cl_2/1$ -pentanol/SDS, se le

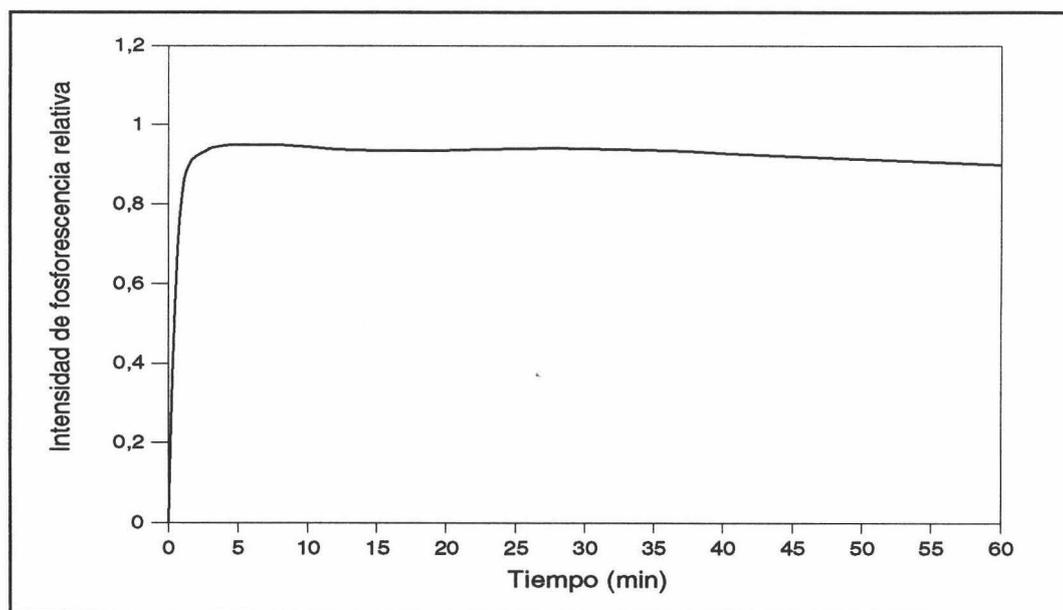


Figura n° VII-11.- Estabilidad con el tiempo. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, $[\text{TlNO}_3]$ $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, $[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

añaden 614 μl de SDS 0'5 M, 1048 μl de TlNO_3 0'25 M, 496 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M, enrasando con agua destilada hasta 10 ml de forma que la concentración de CBL variara entre 0 a 800 ng/ml. De estas muestras así preparadas se introducen 1'5 ml en la cubeta de medida, y se mide la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V. La representación gráfica de este estudio se muestra en la Figura VII-12.

De este estudio se deduce que existe una respuesta lineal para un amplio rango de concentraciones de CBL, observando que existe una pequeña desviación de la linealidad a concentraciones superiores a 600 ng/ml. Por ello, para el establecimiento del método analítico, se tomará como rango lineal:

Rango dinámico lineal: 0-600 ng/ml

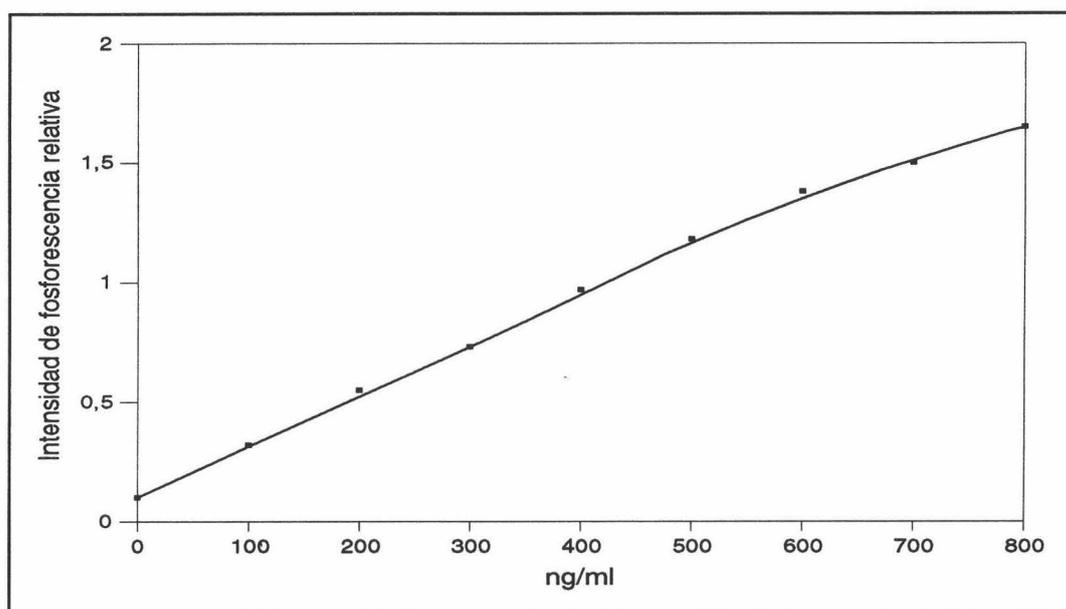


Figura nº VII-12.- *Influencia de la concentración de CBL. [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, $0'02\%$ CH_2Cl_2 y 1-pentanol, $[TiNO_3]$ $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

4. Selección de parámetros instrumentales.

Optimizadas las variables experimentales se procedió, siguiendo la misma metodología de capítulos anteriores, a optimizar las siguientes variables instrumentales:

- Mínimo período de flash de la lámpara de pulso (m.p.f.)
- Longitud de onda de excitación
- Incremento de longitud de onda de los espectros sincrónicos
- Características espectroscópicas del carbaril

4.1. Optimización del mínimo período de flash.

Al igual que en otros sistemas análogos a éste, es conveniente utilizar la máxima velocidad de la lámpara de pulso, efecto que favorece tanto la cinética de la reacción de desoxigenación como la reproducibilidad de las medidas puesto que se integra mayor número de ellas para un mismo tiempo de integración. Este último efecto se observará en el caso del carbaril de forma especial, ya que en esta optimización se abarcó un amplio rango de valores de m.p.f., de 5 a 500 ms, comprobando que la reproducibilidad de las medidas disminuye al aumentar este parámetro.

Se prepararon una serie de muestras utilizando el siguiente procedimiento: a 100 μl de una disolución de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en CH_2Cl_2 /1-pentanol se le añadieron 614 μl de SDS 0'5 M, 1048 μl de TlNO_3 0'25 M, 496 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones así preparadas, se introdujeron 1'5 ml en la cubeta de medida, irradiándola continuamente con la lámpara a distintos m.p.f. y registrando la evolución de la señal de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, rendijas $_{\text{exc/em}}$ 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/1000 μs y sensibilidad 1100 V. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura n° VII-13.

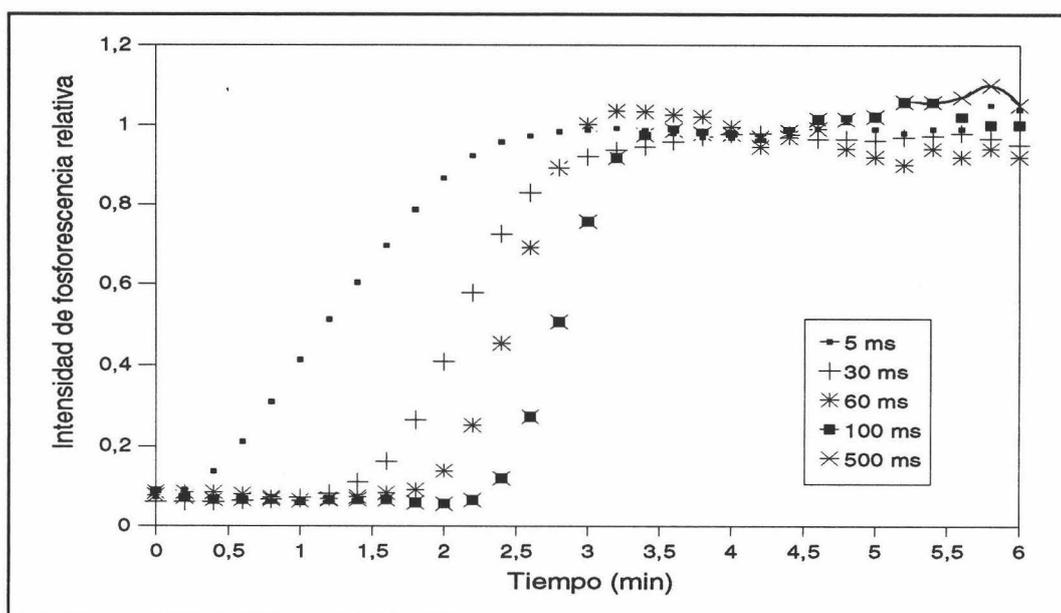


Figura n° VII-13.- Optimización del m.p.f.. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, [TlNO_3] $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, [Na_2SO_3] $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y [H_2SO_4] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

Como se observa en esta figura, a medida que aumentan los valores de m.p.f. la señal de fosforescencia no se observa hasta pasados 2'5 minutos desde el comienzo de la irradiación y sus valores no se estabilizan hasta los 3'5 minutos. Sin embargo, empleando un valor de 5 ms, la intensidad de fosforescencia se observa desde el comienzo de la irradiación, aumentando paulatinamente con el tiempo hasta llegar a su máximo a los 2 minutos. Por ello, para el resto del trabajo experimental se optó por trabajar con un mínimo período de flash de:

m.p.f.: 5 ms

4.2. Optimización de la longitud de onda de excitación.

Otra posibilidad de disminuir los tiempos de estabilización de las medidas consiste en utilizar otras longitudes de onda distintas a la longitud de onda de excitación. Por ello, se utilizaron distintas longitudes de onda de excitación, registrando curvas de desarrollo de la intensidad de fosforescencia con el tiempo y estableciendo los tiempos de estabilización, en cada caso.

Para el desarrollo de esta experiencia, se prepararon una serie de muestras como en el apartado anterior, y se introdujeron 1'5 ml de las mismas en la cubeta de medida, irradiándola con una lámpara de pulso a un m.p.f. de 5 ms y con distintas longitudes de onda de excitación registrando la intensidad de fosforescencia a las siguientes condiciones instrumentales: λ_{em} 490 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{d/g}$ 200/1000 μ s y sensibilidad 1100 V. Los resultados se reflejan en la Figura n° VII-14.

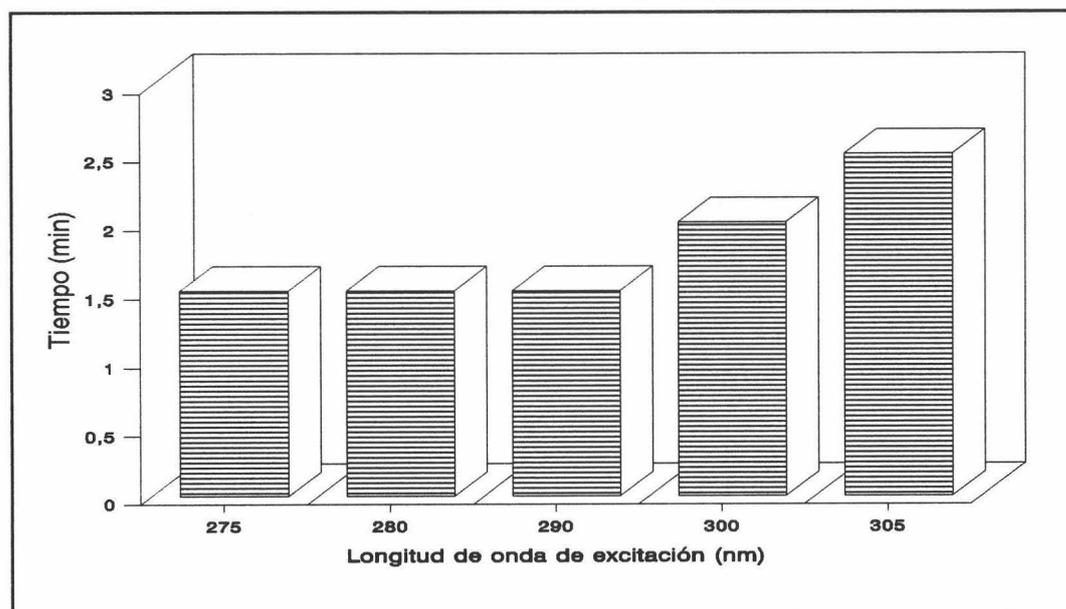


Figura n° VII-14.- *Influencia de la longitud de onda de excitación. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, [TlNO₃] $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

Se observa que a longitudes de onda menores o iguales a la de excitación, el tiempo de espera para realizar las medidas es prácticamente el mismo, es decir, 1'5

minutos. Sin embargo, al utilizar longitudes de onda menos energéticas que la de excitación se produce un retraso cada vez más importante en el tiempo de estabilización de las señales y, por tanto, para el resto de trabajo experimental se ha seleccionado:

Longitud de onda de excitación: 292 nm

4.3. Optimización del incremento de longitud de onda.

Para conocer las longitudes de onda máxima a las cuales se desean desarrollar todos los métodos sincrónicos y sincrónico-derivados es necesario optimizar, en primer lugar, el parámetro $\Delta\lambda$. La optimización de éste se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: a 100 μl de una disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en CH_2Cl_2 /1-pentanol se le añadieron 614 μl de SDS 0'5 M, 1048 μl de TlNO_3 0'25 M, 496 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml. A esta muestra se le registraron los distintos espectros sincrónicos modificando el valor de $\Delta\lambda$ desde 180 a 260 nm en intervalos de 10 nm, y manteniendo las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V. Los espectros registrados se muestran en la Figura nº VII-15.

Al observar esta figura se deduce que el incremento de longitud de onda es siempre un parámetro que afecta mucho tanto a la forma, intensidad como posición del espectro sincrónico. En este caso concreto, existen dos valores de $\Delta\lambda$ a los cuales los picos son estrechos y de máxima intensidad, concretamente a 250 y 300 nm, correspondientes el primero a una longitud de onda de 490 nm y el segundo a 524 nm, que se debe al hecho de que el espectro de fosforescencia presenta dos máximos de emisión a 490 y 524 nm, respectivamente.

Debido a la selectividad que se confiere al método analítico un desplazamiento batocrómico de 34 nm, se eligió, para el resto del trabajo experimental un incremento de longitud de onda de:

$\Delta\lambda$: 230 nm

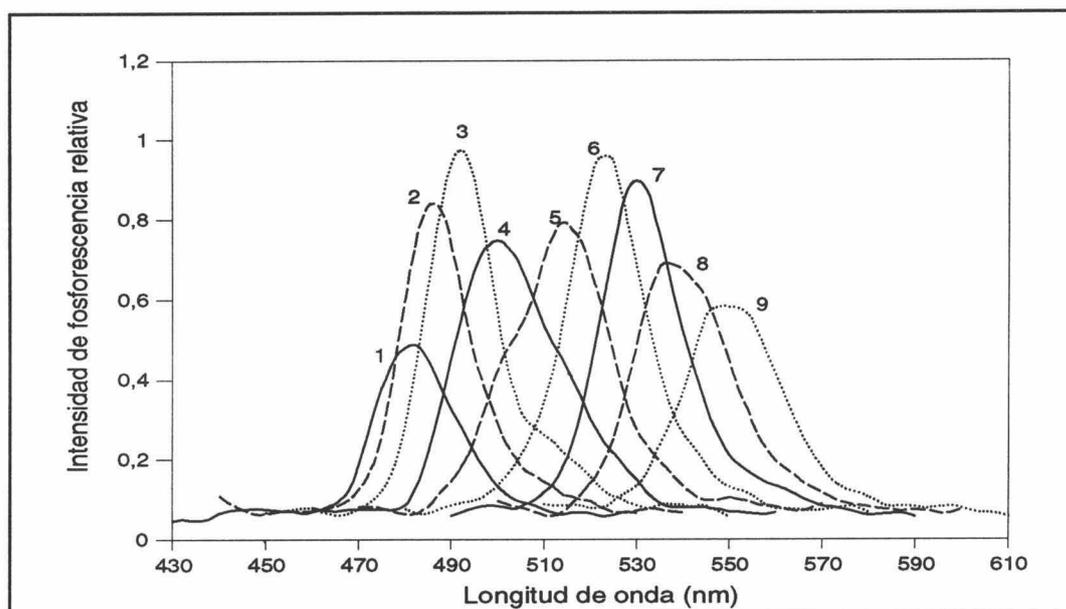


Figura n° VII-15.- Optimización del $\Delta\lambda$. (1) 180, (2) 190, (3) 200, (4) 210, (5) 220, (6) 230, (7) 240, (8) 250 y (9) 260 nm. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, [TiNO₃] $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, [Na₂SO₃] $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y [H₂SO₄] $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.

4.4. Características espectroscópicas.

Después del establecimiento del parámetro incremento de longitud de onda, se procedió al registro de los distintos espectros de emisión, sincrónico y sincrónico-derivados presentados junto a su blanco para un total conocimiento de las características espectroscópicas del carbaril en este tipo de sistemas. El procedimiento operatorio seguido fue: a 100 μl de una disolución madre de CBL $1'98 \cdot 10^{-4}$ M en CH_2Cl_2 /1-pentanol se le añadieron 614 μl de SDS 0'5 M, 1048 μl de TiNO₃ 0'25 M, 496 μl de Na₂SO₃ 0'1 M y 800 μl de H₂SO₄ 0'02 M enrasando con agua destilada hasta 10 ml. De estas disoluciones se introdujeron 1'5 ml dentro de la cubeta de medida, registrándole el espectro de emisión y sincrónico a las siguientes condiciones instrumentales: $\lambda_{\text{exc/em}}$ 292/490 nm, rendijas_{exc/em} 16/16 nm, $t_{\text{d/g}}$ 200/1000 μs , m.p.f. 5 ms y sensibilidad 1100 V. A partir de este espectro sincrónico se obtuvieron los correspondientes sincrónico-derivados. El procedimiento seguido para el blanco fue el mismo pero sin añadir CBL. En la Figura n° VII-16, se presentan dichos espectros indicando la longitud de onda de sus máximos.

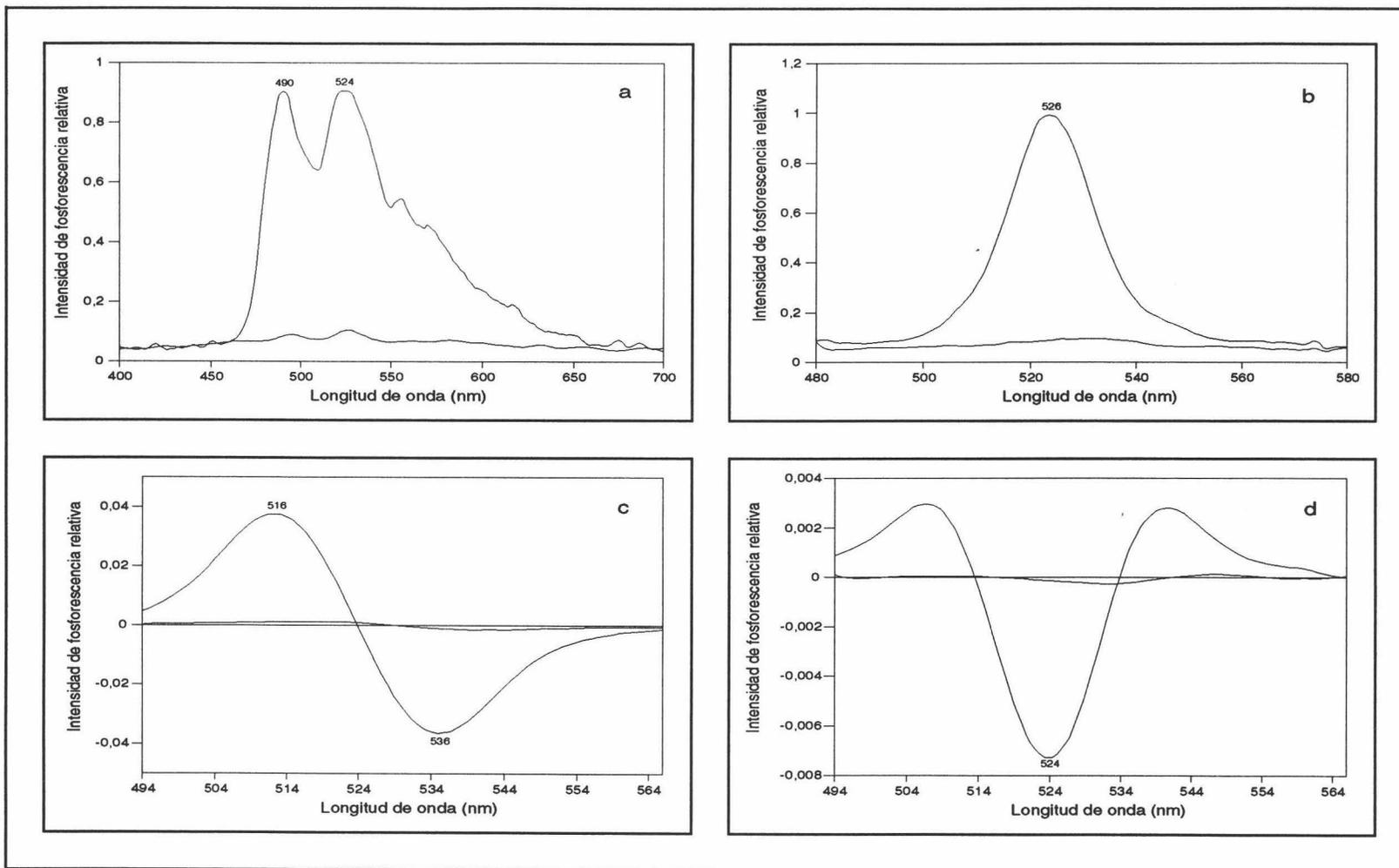


Figura n^o VII-16.- *Espectros de emisión (a), sincrónico (b), 1^a derivada sincrónica (c) y 2^a derivada sincrónica (d) con sus respectivos blancos. [CBL] 400 ng/ml, [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, $[TiNO_3]$ $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

4.5. *Parámetros instrumentales establecidos.*

Los parámetros instrumentales establecidos a lo largo de la optimización de este método se resumen en la Tabla n° VII-10. Algunos parámetros no estudiados de forma específica en algún apartado de los anteriores (tiempo de decaimiento e integración, sensibilidad del detector, velocidad de barrido de los espectros, rendijas de excitación y emisión), se deducen directamente en el trabajo experimental o de las características espectroscópicas del carbaril en este tipo de sistemas.

Tabla n° VII-10.- *Parámetros instrumentales establecidos.*

Longitudes de onda de excitación/emisión	
Fluorescencia	292/335 nm
Fosforescencia	292/490 nm
Longitudes de onda espectros sincrónicos y derivados	
Sincrónico	524 nm
1ª derivada	516 y 536 nm
2ª derivada	524 nm
Rendijas de excitación/emisión	16/16 nm
Mínimo período de flash	5 ms
Velocidad de barrido de los espectros	2 nm/s
Incremento de longitud de onda	230 nm
Tiempo de decaimiento	200 μ s
Tiempo de integración	1000 μ s
Sensibilidad del detector	1100 V

5. *Establecimiento del método analítico.*

Optimizadas las distintas variables experimentales e instrumentales se procedió al establecimiento del método analítico. Este apartado comprende el establecimiento del procedimiento operatorio, las rectas de calibrado y parámetros de fiabilidad del método.

5.1. *Procedimiento operatorio.*

En un matraz de 10 ml se colocan alícuotas de una disolución $1'95 \cdot 10^{-4}$ M de forma que la concentración de la disolución variase entre 0 y 600 ng/ml, se le adicionan 614 μ l de SDS 0'5 M, 1048 μ l de $TlNO_3$ 0'25 M, 496 μ l de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μ l de H_2SO_4 0'02 M y se enrasa hasta 10 ml con agua destilada. De esta disolución así

preparada se adiciona 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso con un período de 5 ms a la longitud de onda de 292 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide a los 2 minutos después de empezar a irradiar con una λ_{exc} de 292 nm a 490 nm de longitud de onda de emisión, m.p.f. 5 ms, t_d 200 μ s, t_g 1000 μ s y un voltaje en el detector de 1100 V.

5.2. Rectas de calibrado.

Establecidos los parámetros experimentales e instrumentales se procedió al establecimiento de las distintas rectas de calibrado para cada uno de los métodos propuestos. En conjunto se propusieron cinco métodos espectrofotométricos: un método de emisión directa, otro sincrónico, dos métodos utilizando los dos posibles valores extremos de la primera derivada del espectro sincrónico y otro mediante la segunda derivada de dicho espectro sincrónico. Los espectros correspondientes a cada una de estas calibrados, se presentan en la Figura n° VII-17. Los datos de las rectas de calibrado de los cinco métodos propuestos se reflejan en las Tablas n° VII-11, 12, 13, 14 y 15.

Tabla n° VII-11.- Réplicas del calibrado del método directo.

ng/ml	$I_{Fosf.}$	$I_{Fosf.}$	$I_{Fosf.}$
0	0'096	0'085	0'089
100	0'331	0'324	0'312
200	0'552	0'516	0'580
300	0'692	0'771	0'744
400	0'941	0'975	0'984
500	1'142	1'194	1'195
600	1'392	1'363	1'408

Tabla n° VII-12.- Réplicas del calibrado del método sincrónico.

ng/ml	$I_{Fosf.}$	$I_{Fosf.}$	$I_{Fosf.}$
0	0'085	0'066	0'095
100	0'324	0'360	0'314
200	0'551	0'532	0'592
300	0'694	0'784	0'746
400	0'961	1'000	1'014
500	1'163	1'221	1'220
600	1'444	1'352	1'463

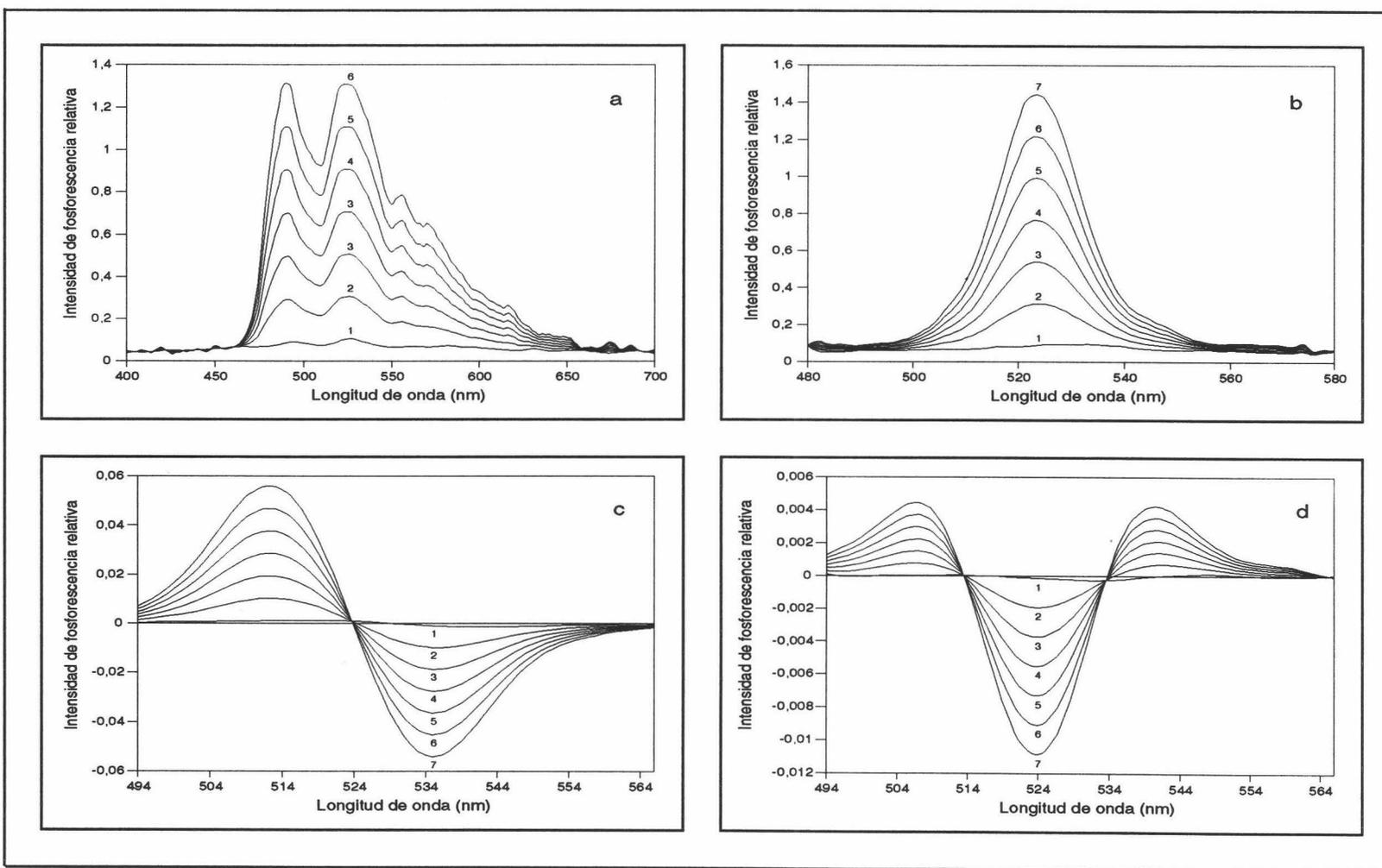


Figura nº VII-17.- *Espectros de emisión (a), sincrónico (b), 1ª derivada sincrónica (c) y 2ª derivada sincrónica (d) correspondientes a la recta de calibrado del CBL. (1) Blanco, (2) 100, (3) 200, (4) 300, (5) 400, (6) 500 y (7) 600 ng/ml. [SDS] $3'07 \cdot 10^{-2}$ M, 0'02% CH_2Cl_2 y 1-pentanol, $[TiNO_3]$ $2'62 \cdot 10^{-2}$ M, $[Na_2SO_3]$ $4'96 \cdot 10^{-3}$ M y $[H_2SO_4]$ $1'60 \cdot 10^{-3}$ M.*

Tabla n° VII-13- Réplicas del calibrado del método 1ªD¹.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	1'38·10 ⁻³	1'03·10 ⁻³	1'21·10 ⁻³
100	8'65·10 ⁻³	1'00·10 ⁻²	9'24·10 ⁻³
200	1'72·10 ⁻²	1'57·10 ⁻²	1'76·10 ⁻²
300	2'22·10 ⁻²	2'51·10 ⁻²	2'32·10 ⁻²
400	3'28·10 ⁻²	3'30·10 ⁻²	3'31·10 ⁻²
500	3'81·10 ⁻²	4'00·10 ⁻²	4'03·10 ⁻²
600	4'83·10 ⁻²	4'48·10 ⁻²	4'78·10 ⁻²

Tabla n° VII-14.- Réplicas del calibrado del método 1ªD².

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	1'68·10 ⁻³	0	1'80·10 ⁻³
100	9'55·10 ⁻³	1'08·10 ⁻²	9'11·10 ⁻³
200	1'83·10 ⁻²	1'65·10 ⁻²	2'02·10 ⁻²
300	2'46·10 ⁻²	2'85·10 ⁻²	2'62·10 ⁻²
400	3'52·10 ⁻²	3'65·10 ⁻²	3'67·10 ⁻²
500	4'10·10 ⁻²	4'40·10 ⁻²	4'34·10 ⁻²
600	5'42·10 ⁻²	5'02·10 ⁻²	5'26·10 ⁻²

Tabla n° VII-15- Réplicas del calibrado del método 2ªD.

ng/ml	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}	I _{Fosf.}
0	1'28·10 ⁻⁴	4'59·10 ⁻⁵	2'82·10 ⁻⁴
100	2'09·10 ⁻³	2'45·10 ⁻³	1'88·10 ⁻³
200	3'75·10 ⁻³	3'46·10 ⁻³	4'12·10 ⁻³
300	4'71·10 ⁻³	5'35·10 ⁻³	5'21·10 ⁻³
400	7'13·10 ⁻³	7'40·10 ⁻³	7'32·10 ⁻³
500	8'23·10 ⁻³	8'89·10 ⁻³	9'22·10 ⁻³
600	1'07·10 ⁻²	9'84·10 ⁻³	1'05·10 ⁻²

Los datos estadísticos correspondientes a las cinco rectas en estudio, se resumen en la Tabla n° VII-16.

5.3. Parámetros de fiabilidad.

Los parámetros de fiabilidad de los métodos propuestos: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido establecidos mediante el

Tabla n° VII-16.- Datos estadísticos de las rectas de calibrado.

Dato estadístico	D	S	1ªD ¹	1ªD ²	2ªD
Ordenada en el origen (a)	0'104	0'100	0'0014	0'0013	0'0003
Desviación estándar (s _a)	0'0096	0'0138	0'0004	0'0005	0'0001
Desv. estándar relativa (DER(a)) (%)	9'21	13'76	30'60	45'61	45'57
Pendiente (b)	0'0021	0'0022	0'0008	0'0008	0'0002
Desviación estándar (s _b)	0'0001	0'0001	0'00001	0'00001	0'00001
Desv. estándar relativa (DER(b)) (%)	1'24	1'74	1'58	1'86	2'18
Desv. estándar de regresión (S _{R,c})	0'0243	0'0351	0'0011	0'0014	0'0003
Coefficiente de correlación (r)	0'9985	0'9971	0'9976	0'9967	0'9955
Coef. de determinación (r ²) (%)	99'71	99'43	99'53	98'35	99'11
g	0'0007	0'0013	0'0011	0'0015	0'0021

modelo de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado. La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrado, reflejados en las Tablas n° VII-9, 10, 11, 12 y 13.

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar tanto de los blancos, así como de los patrones usados para el establecimiento de las rectas de calibrado, respectivamente. Los datos de dichas desviaciones estándar se muestran en la Tabla n° VII-17.

Tabla n° VII-17.- Desviaciones estándar en función del calibrado.

ng/ml	D	S	1ªD ¹	1ªD ²	2ªD
0	7'95	11'17	10'11	11'90	14'03
100	7'42	10'39	9'44	11'14	13'00
200	7'10	9'96	9'05	10'67	12'49
300	7'00	9'83	8'92	10'51	12'32
400	7'12	9'99	9'09	10'70	12'56
500	7'43	10'42	9'45	11'11	13'07
600	7'92	11'12	10'07	11'89	13'88

La estimación de los parámetros característicos del método, calculados a partir del modelo de análisis de la regresión se reflejan en la Tabla n° VII-18. De esta tabla se deduce que los mejores parámetros de fiabilidad se obtienen para el método directo, no observando mejoras sustanciales en el empleo de los espectros sincrónico o derivados.

Tabla n° VII-18.- *Parámetros de fiabilidad.*

Parámetro	D	S	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
Linealidad (1-DER(b)%)	98'76	98'26	98'42	98'14	97'82
Sensibilidad analítica (ng/ml)	11'34	15'93	14'44	17'02	19'95
Límite de detección (ng/ml)	23'84	33'51	30'33	35'71	42'10
Límite de cuantificación (ng/ml)	79'47	111'17	101'10	119'03	140'29
Rango dinámico lineal (ng/ml)	80-600	111-600	101-600	119-600	140-600
Precisión (DER %)100 ng/ml	7'26	9'90	9'14	11'05	11'90
200 ng/ml	3'44	4'81	4'48	5'32	6'06
300 ng/ml	2'38	3'40	3'08	3'56	4'35
400 ng/ml	1'76	2'47	2'20	2'61	3'04
500 ng/ml	1'48	2'08	1'90	2'25	2'61
600 ng/ml	1'32	1'86	1'69	1'98	2'34

5.4. Estudio de interferencias.

Con el fin de comprobar la aplicabilidad del método propuesto para la determinación de carbaril en tierras de cultivo, donde es interesante su cuantificación, se ha estudiado el efecto que ejercen la presencia de otros plaguicidas y fitohormonas, comúnmente utilizados con el CBL, en su determinación espectrofotométrica.

Para llevar a cabo dicho estudio se ha preparado *una muestra para cada interferente que contenía 400 ng/ml de CBL junto con una cierta cantidad de interferente, y a la cual se le añaden 614 µl de SDS 0'5 M, 1048 µl de TiNO₃ 0'25 M, 496 µl de Na₂SO₃ 0'1 M y 800 µl de H₂SO₄ 0'02 M y se enrasa hasta 10 ml con agua destilada. De esta disolución se adicionaron 1'5 ml en la cubeta de medida y se irradia la disolución con a la longitud de onda de 292 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide a los 2 minutos después de empezar a irradiar a 490 nm para el método directo, registrando el espectro sincrónico y midiendo la intensidad de fosforescencia a 524 nm y a este espectro sincrónico, se le calcularon la primera y segunda derivada registrando la intensidad a 516, 536 y 524 nm, respectivamente, con m.p.f. de 5 ms, t_d 200 µs, t_g 1000 µs y sensibilidad 1100 V.*

La tolerancia de las distintas sustancias ensayadas se resumen en la Tabla n° VII-19, cuyo nivel se ha calculado aplicando el mismo procedimiento utilizado hasta ahora.

Tabla nº VII-19.- Nivel de tolerancia de sustancias extrañas.

Interferente	Nivel de tolerancia (ng/ml)				
	D	S	1ªD ¹	1ªD ²	2ªD
Ácido p-Clorofenoxiacético	40000	35000	25000	15000	40000
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	40000	3500	20000	30000	40000
Carbendazima	30000	30000	20000	25000	35000
2-(4-Thiazolil)-benzimidazol	400	400	300	250	500
2-Aminofenol	400	400	300	300	200
3-Amino-1,2,4-Triazol	400	400	350	400	400
α -Naftol	40	40	30	40	50

A la vista de los resultados de esta tabla, los mejores niveles de tolerancia se obtienen con el método directo y segunda derivada sincrónica, mientras que el método sincrónico y primera derivada sincrónica no mejoran las tolerancias obtenidas para los otros métodos. En cuanto a los niveles de tolerancia, éstos son todos del orden de 100:1 (c:c) ó 1:1 (c:c). Salvo el caso del α -naftol que, como metabolito que es del carbaril tiene una estructura tan similar que compite, desde un punto de vista estérico, en el interior de la micela, por lo que los niveles de tolerancia son bastante bajos.

6. Aplicaciones analíticas.

El método propuesto se ha aplicado a la determinación de carbaril en tierras de cultivo de la zona de Gójar (Granada).

a) Toma de muestra.

Para que el valor del análisis que se va a llevar a cabo sea representativo de la zona problema, es necesario realizar una toma de muestra adecuada, ya que de ello va a depender, en gran parte, la utilidad del método empleado. Esto se consigue, teniendo en cuenta las características del terreno, y a partir de ahí siguiendo un método normalizado de muestreo.

Para expresar el análisis se definen dos conceptos, el peso de "tierra fina", que se define como el material que pasa a través de un tamiz de 2 mm y el denominado "muestra

analítica" que es la porción de suelo que se utiliza como conjunto de una determinación analítica única.

La muestra de tierra de cultivo se tomó en la zona de Gójar (Granada), haciendo un hoyo en forma de V de 20 cm de profundidad e introduciendo la parte central en una bolsa. La operación se repitió varias veces, hasta completar 2 Kg de tierra. La "muestra analítica", se deja expuesta al aire, durante 3 días, para su observación. Esta muestra, se divide por cuarteo en porciones de menor tamaño, hasta tener una porción de 300 g. Se pasa por un tamiz de 2 mm de diámetro, para obtener la tierra fina". A partir de esta "tierra fina" se tomaron submuestras de 10 g para realizar los distintos análisis.

b) Fortificación y extracción del carbaril.

En un vaso de precipitado de 100 ml, se colocaron 10 g de muestra, se fortifica con la cantidad necesaria de CBL, para que la concentración final se encuentre dentro del rango lineal, añadiéndoles 40 ml de disolvente de extracción, CH_2Cl_2 . Para homogeneizar la muestra rápidamente con el disolvente de extracción, se introduce el vaso en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto, dejado a continuación la muestra a decantar. Se filtra a vacío con un filtro de porosidad 3, repitiendo la extracción tres veces para cada muestra, tras unir los extractos, estos se llevan hasta casi sequedad en un rotavapor a 40 °C, y el residuo se lleva a un volumen final de 10 ml con CH_2Cl_2 . Estas disoluciones fueron sometidas al procedimiento operatorio habitual para la determinación y cuantificación de CBL.

c) Estudio de recuperación.

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Para ello, *en un matraz de 10 ml se colocaron una alícuota de 100 μl , se le adicionan 614 μl de SDS 0'5 M, 1048 μl de TINO_3 0'25 M, 496 μl de Na_2SO_3 0'1 M y 800 μl de H_2SO_4 0'02 M y se enrasa hasta 10 ml con agua destilada. De esta disolución se adiciona 1'5 ml dentro de la cubeta de medida y se irradia la disolución con una lámpara de pulso con un período de 5 ms a la longitud de onda de 292 nm y rendijas de excitación y emisión de 16/16 nm. La fosforescencia se mide a los 2 minutos después de empezar a irradiar con una λ_{exc} de 292 nm a 490 nm de longitud de onda de emisión con*

m.p.f. 5 ms, t_d 200 μ s, t_g 1000 μ s y un voltaje en el detector de 1100 V.

Los valores correspondientes a la intensidad de fosforescencia se interpolan en las funciones de calibrado de la experiencia anterior obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla n° VII-20.

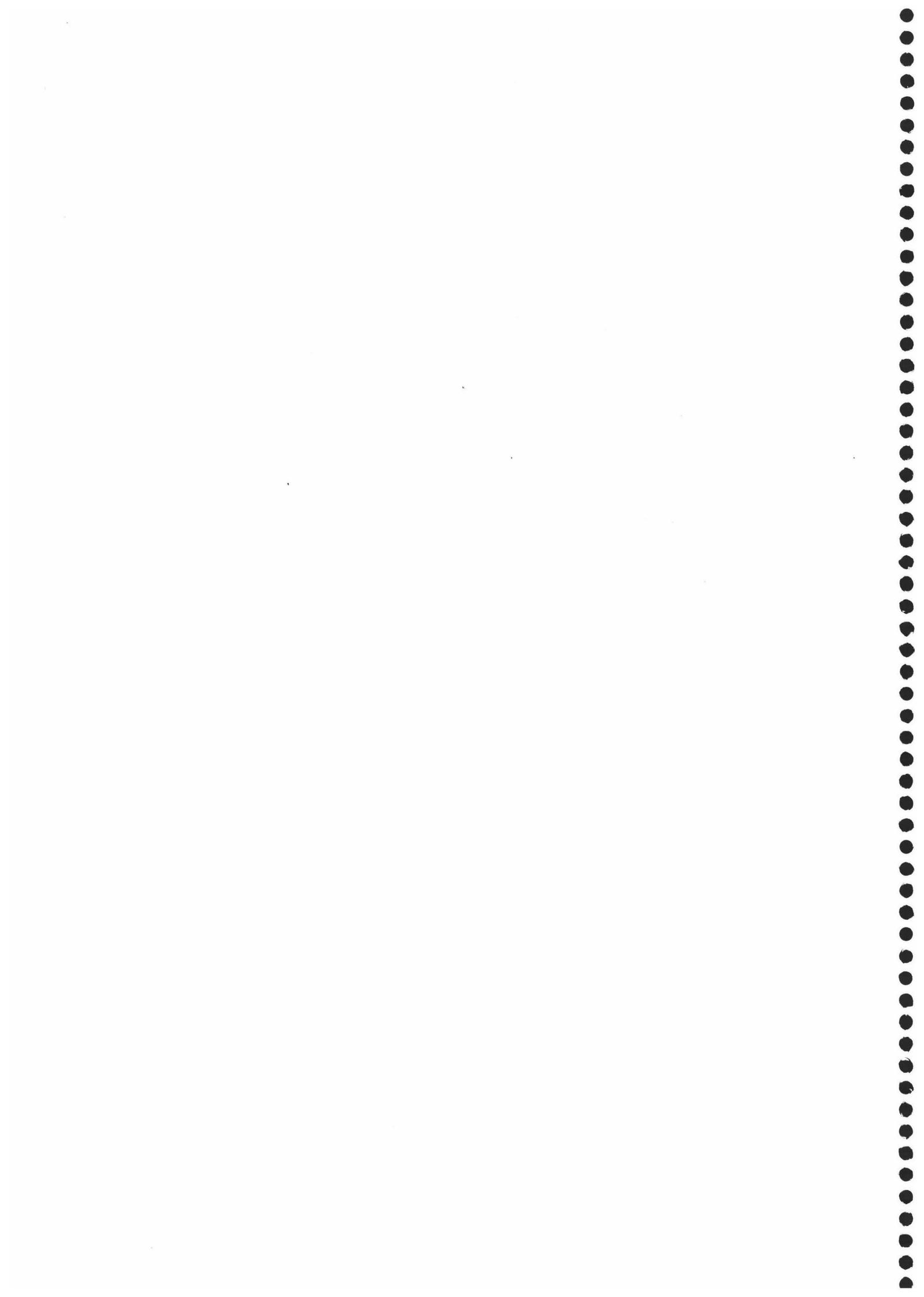
Tabla n° VII-20.- Aplicación del método.

Muestra	ng/ml CBL puesto	% Recuperado				
		Directo	Sincrónico	1 ^a D ¹	1 ^a D ²	2 ^a D
1	400	94'2	93'0	93'4	95'4	97'8
	400	96'5	95'3	94'4	92'0	91'5
	400	94'8	93'0	93'6	91'0	89'5
	400	94'7	94'0	92'1	94'0	93'2
2	400	99'9	97'5	96'3	95'0	94'0
	400	99'5	96'0	97'2	98'4	97'0
	400	96'1	95'0	94'1	95'5	94'0
3	400	98'0	95'2	98'3	94'0	91'7
	400	99'3	96'2	98'1	94'2	90'5
	X_{media}	97'0	95'02	95'3	94'4	93'2
σ_{n-1}	2'23	1'49	2'24	2'13	2'81	

X_{media} - Valor promedio de las determinaciones
 σ_{n-1} - Desviación estándar de los valores

Los porcentajes de recuperación para los cinco métodos propuestos están entorno del 100 %, si bien los mejores porcentajes de recuperación se obtienen para el método directo 97 %, con una desviación estándar para los valores de 2'23.

Conclusiones



El estudio efectuado en esta Memoria ha permitido obtener información suficiente para llegar a las siguientes conclusiones:

Se desarrollan las posibilidades de los métodos fosforimétricos en disolución, estudiando diferentes combinaciones entre varios agentes micelares y átomos pesados.

Se proponen seis métodos fosforimétricos para la determinación de acenafteno, una mezcla de fenantreno, fluoranteno y benz[a]antraceno, una mezcla acenafteno, fluoranteno, pireno, benz[a]antraceno y benzo[a]pireno, ácido β -naftiloxiacético y α -naftaleneacetamida y carbaril.

Se hace uso de las microemulsiones como sistemas de gran interés para compuestos altamente apolares, como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, estudiando diversas posibilidades y estableciendo nuevos agentes emulsionantes no utilizados hasta ahora.

Se aplican técnicas quimiométricas, como métodos simplex y diseños experimentales, tanto para la localización de los óptimos de las variables experimentales como para la valoración de la influencia que éstas ejercen sobre la emisión fosforescente de los distintos compuestos.

Se establecen las condiciones experimentales óptimas para el desarrollo de los métodos propuestos, estudiando la influencia de las distintas variables (agente micelar, átomo pesado, agente desoxigenante, agente emulsionante, volumen de muestra, temperatura, y otras) mediante la utilización de técnicas quimiométricas.

Se establecen los distintos parámetros fosforescentes, longitudes de onda de excitación y emisión, espectro de fosforescencia total y vida media, de los compuestos estudiados en este tipo de sistemas micelares.

Se aplican las modificaciones espectrales de barrido sincrónico y sincrónico-

derivado (de 1^o y 2^o orden), con objeto de mejorar la selectividad, optimizando para ello todas las variables instrumentales que esto conlleva.

Para la resolución de mezclas complejas de hidrocarburos aromáticos policíclicos, se han desarrollado las primeras aplicaciones de la técnica de ángulo variable en fosforimetría, aplicándola a mezclas de tres y cinco hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Se ha llevado un estudio comparativo sobre dos tratamientos estadísticos: el de la IUPAC y el basado en la regresión lineal. Los distintos parámetros estadísticos de cada uno de los métodos propuestos (límite de detección y cuantificación, sensibilidad analítica, rango dinámico lineal, error relativo y desviación estándar relativa) se establecieron mediante el método basado en la regresión lineal.

Se ha realizado un amplio estudio de interferencias que suelen acompañar, tanto a los hidrocarburos aromáticos policíclicos como a los plaguicidas estudiados, en las diferentes matrices, estableciendo los niveles de tolerancia de cada uno de los posibles interferentes.

Con objeto de poner de manifiesto la aplicabilidad de los métodos analíticos propuestos, se han llevado a cabo estudios de recuperación de los diferentes compuestos en matrices de interés medioambiental, obteniendo unos factores de recuperación de alrededor del 100 %. Confirmando la utilidad de los mismos en casi todos los casos estudiados.



Abreviaturas

1 ^a D	Primera derivada sincrónica
2 ^a D	Segunda derivada sincrónica
a	Ordenada en el origen de la recta de regresión
Ace	Acenafteno
AIF	Análisis por inyección de flujo
ANOVA	Ácido β -naftiloxiacético
b	Pendiente de la recta de regresión
BaA	Benz[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
BeP	Benzo[e]pireno
BrCTA	Bromuro de cetiltrimetil amonio
Brij-35	Polioxietileno(23)dodecanol
\bar{c}	Media aritmética de los valores de concentración
CBL	Carbaril
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CGL	Cromatografía gas-líquida
c_i	Valores de concentración
CL	Cromatografía líquida
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
c.m.c.	Concentración micelar crítica
Coef.	Coefficiente
D	Directo
D.E.R.	Desviación estándar relativa
Desv.	Desviación
f_x	Factor de conversión de la coordenada X
f_y	Factor de conversión de la coordenada Y
F	F de Snedecor
FA	Fallo de ajuste
Fen	Fenantreno
Flt	Fluoranteno
Flu	Fluoreno
g.l.	Grados de libertad
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
$I_{\text{Fluor.}}$	Intensidad de fluorescencia
$I_{\text{Fosf.}}$	Intensidad de fosforescencia
LTP	Fosforescencia a baja temperatura
m	Número de repeticiones del análisis
m.p.f.	Mínimo período de flash
MC	Media de cuadrados
n	Número total de valores de la recta de regresión
NAD	α -Naftaleneacetamida
Naf	Naftaleno
P	Nivel de significación
Pir	Pireno

r	Coeficiente de correlación
r^2	Coeficiente de determinación
R	Media aritmética de los valores a partir de los m análisis
RTP	Fosforescencia a temperatura ambiente
\bar{R}	Media aritmética de todos los valores de la recta de regresión
S	Sincrónico
s_a	Desviación estándar de la ordenada en el origen
s_b	Desviación estándar de la pendiente
SC	Suma de cuadrados
SDS o NaDS	Dodecil sulfato sódico
$s_{R,c}$	Desviación estándar de regresión de R en c.
t_d	Tiempo de decaimiento
t_g	Tiempo de integración
TX-100	Tritón X-100 o polioxietileno(9'5)p-teroctil fenol
$\Delta\lambda$	Incremento de longitud de onda



Bibliografía

- AARON, J.J., KALEEL, E. M. y WINEFORDNER, J. D. (1979). *J. Agr. Food. Chem.*, 27, 1233.
- AARON, J.J. y WINEFORDNER, J. D. (1975). *Talanta*, 22, 707.
- AARON, J.J. y WINEFORDNER, J. D. (1979). "Heavy-atom effect on the room-temperature phosphorimetry of some aromatic pesticides". *Analisis*, 7, 168 .
- AARON, J.J. y SOME, N. (1982). "Fluorimetric analysis of carbaryl and 1-naphtholate in neutral and alkaline media". *Analisis*, 10(10), 481.
- ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT (1980). " Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry". *Anal. Chem.*, 52, 2242-2249.
- AGUILAR GALLARDO, A. (1990). "Contribución a la determinación de plaguicidas y aditivos alimentarios en alimentos y suelos mediante técnicas fluorimétricas". Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.
- AIJUN, T., YINGGUANG, W. y LONGDI, L. (1996). "Solid-substrate and micellar-stabilized room-temperature phosphorescence of two anilino-m-phthalenesulfonates". *Analytica Chimica Acta*, 322, 91-97.
- ALAK A. M., CONTOLINI N. y VO-DINH T. (1989). "Studies of cyclodextrin-enhanced room-temperature phosphorescence". *Anal. Chim. Acta*, 217, 171.
- ALAK A. M. y VO-DINH T. (1988). "Selective enhancement room-temperature phosphorescence using cyclodextrin treated cellulose substrate". *Anal. Chem.*, 60(6), 596-600.
- ALARCÓN MOLINA, A. (1992). "Nuevos métodos fotométricos de determinación de penicilinas", Tesis Doctoral, Universidad de Castilla La Mancha.
- ALBI, T. (1981). "Residuos de insecticidas en aceitunas. Método de determinación de carbamatos en aceitunas. Residuos de carbaril en los procesos de aderezo de aceitunas". *Grasas y Aceites*, 32, 381.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (1987). "Recommendations for the definition, estimation, and use of the detection limit". *Analyst*, 112, 199.
- ANDRÉ, J.C., BANDOT, Ph. y NICLAUSE, M. (1977). *Clin. Chim. Acta*, 76, 55-66.
- APPAIAH, K. M., RAMAKRISHNA, R., SUBBARAO, R. R. y KAPUR, O. (1983). "Spectrophotometric determination of carbaryl in grains". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 65(1), 32.

- ARCHER, T.E. y STOKES, J.D. (1983). "A method for the quantitative determination of ANA, 1-naphthalenylacetylaspartic acid and β -D-glucose-1-(1-naphthalene)acetate in grapes". *J. Agr. Food Chem.*, 31, 286.
- ARCHER, T.E. y STOKES, J.D. (1988). "Total residues of 2-naphthoxyacetic acid, 2-(6-hidroxy-naphthoxy) acetic acid and 2-(7-hydroxynaphthoxy) acetic acid in tomato plants and fruit by high-performance liquid chromatography". *J. Agric. Food Chem.*, 36(6), 1307-1309.
- ARES, J. (1992). *Anal. Chim. Acta*, 268, 135.
- ARGAUER, R. J., SHIMANUKI, H. y ALVÁREZ, C. (1970a). "Fluorimetric determination of carbaryl and 1-naphthol in honeybees (*Apis mellifera* L.) with confirmation by gas-chromatography". *J. Agr. Food Chem.*, 18(4), 688.
- ARGAUER, R. J. y BONTOYAN, W. (1970b). "Fluorimetric analysis of carbaryl insecticide in mixed formulations". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 53(6), 1166.
- ARGAUER, R. J. y WARTHEN, J. D. (1975). "Separation of 1- and 2-naphthols and determination of trace amounts of 2-naphthyl methylcarbamate in carbaryl formulations by HPLC with confirmation by spectrofluorimetry". *Anal. Chem.*, 47(14), 2472.
- ARMSTRONG, D.W., HINZE, W.L., BUI, K.H. y SINGH, H.N. (1981). "Enhanced fluorescence and room-temperature phosphorescence liquid detection in pseudo-phase liquid chromatography (PLC) [of polycyclic aromatic hydrocarbons]". *Anal. Lett.*, 14, 1659.
- ARNOLD, D., PLANK, C. y ERICKSON, E. (1958). *Chem. Eng. Data Ser.*, 3, 253.
- ARUNYANART, M. y CLINE LOVE, L.J. (1984). *Anal. Chem.*, 56, 1557.
- AYALA, J.H., ALFONSO, A.M. y GONZÁLEZ, V. (1991). "Spectrofluorimetric determination of carbaryl and 1-naphthol in micellar media". *Mikrochim. Acta*, I(3), 171-179.
- BACHE, C.A., EDGERTON, L.J. y LISK, D.J. (1962). "Determination of naphthalenacetic acid in apples". *Agr. and Food Chem.*, 10(5), 365.
- BAGHERI, H. y CREASER, C.S. (1991). "Determination of carbaryl and 1-naphthol in English apples and strawberries by combine gas chromatography-fluorescence spectrometry". *J. Chromatogr.*, 547(1-2), 345-353.
- BADGER, G.M. y KINBER, R.W.L. (1960). *J. Chem. Soc.*, 266.

- BADGER, G.M. y NOVOTNY, J. (1963). *Nature*, 198, 1086.
- BAEYENS, W.R.G. y DE KEUKELEIRE, D. (1991). "Luminiscence techniques in chemical and biochemical analysis". Marcel Dekker, Nueva York.
- BECKER, R. S. (1969). "Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence". Wiley, Nueva York, p 155.
- BELLO J. M. y HURTUBISE R. J. (1986a). *Appl. Spectrosc.*, 40, 790.
- BELLO J. M. y HURTUBISE R. J. (1986b). "Analytical conditions and data for cyclodextrin-induced-solid-surface room-temperature luminiscence of selected compounds". *Anal. Lett.*, 19, 775-796.
- BELLO J. M. y HURTUBISE R. J. (1987). *Anal. Chem.*, 59, 2395.
- BELLO J. M. y HURTUBISE R. J. (1988a). "Characterization of multi-component mixtures of polynuclear aromatic hydrocarbons with α -cyclodextrin-induced solid-surface room-temperature luminiscence". *Anal. Chem.*, 60, 1285-1290.
- BELLO J. M. y HURTUBISE R. J. (1988b). "Room-temperature luminiscence properties of benz[f]quinoline and phenanthrene adsorbed on α -cyclodextrin-sodium chloride mixtures", *Anal. Chem.*, 60, 1291-1296.
- BELLO J. M. y HURTUBISE R. J. (1988c). *Appl. Spectrosc.*, 42, 619.
- BENDER M. L. y KOMIYAMA M. (1978). "Cyclodextrin Chemistry". Springer-Verlag: Nueva York.
- BENSON, W. R. y FINOCCHIARO, J. M. (1965). "Rapid procedure for carbaryl residues: Modification of the Official Colorimetric method". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 48(3), 676.
- BERZAS NEVADO, J.J., LEMUS GALLEGO, J.M. y CASTAÑEDA PEÑALVO, G. (1992). "Detemination of sulfamethoxazole and trimethoprim by ratio spectra derivative spectrophotometry". *Fresenius J. Anal. Chem.*, 342, 723-728.
- BEYERS, D.W., CARLSON, C.A. y TESSARI, S.D. (1991). "Solid-phase extraction of carbaryl and malathion from pond and well water". *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 1425-1429.
- BEZUIDENHOUT, F. J. y VAN DYK, L. P. (1981). "Comparison of chromatographic and spectrophotometric methods for determination of carbaryl residues in cabbages". *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 26(6), 789 .

- BIRKS J. B. (1970). "Photophysics of Aromatic Molecules". Wiley-Interscience: Nueva York.
- BLYSHAK, L.A. y WARNER, I.M. (1990). "Sensitized phosphorescence with anchored naphthoate energy donors in reverse micelles". *Anal. Chem.*, 62, 1953-1958.
- BODEN, H. (1976). *J. Chrom. Sci.*, 14, 391.
- B.O.E. (1977). "O. M. Presidencia del Gobierno". 4 Enero, 71.
- BOHON, R. y CLAUSSEN, W. (1951). *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1571.
- BOOTH, H. y EVERSON, H. (1948). *Ind. Eng. Chem.*, 40, 1491.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. y HUNTER, J.S. (1978). "Statistic for experiments". Wiley, Nueva York, cap. 15.
- BRAYAN, J.G., HADDAD, P.R., SHARP, G.J., DILLI, S. y DESMARCHELIER, J.M. (1988). "Determination of organophosphate pesticides and carbaryl on paddy rice by reserved-phase high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 447(1), 249-255.
- BRAYAN, J.G., HADDAD, P.R., SHARP, G.J., DILLI, S. y DESMARCHELIER, J.M. (1992). "Extraction of carbaryl from stored rice, maize, peas and sunflower seed prior to chromatographic analysis". *Pestic. Sci.*, 34(3), 215-219.
- BROOKS, M.W., TESSIER, D., SODEEEEEERSTROM, D., JENKINS, J. y CLARK, J.M. (1990). "Rapid method for the simultaneous analysis of chlorpyrifos, isofenphos, carbaryl, iprodione and triadimefon in groundunter by solid-phase extraction". *J. Chromatogr. Sci.*, 8(9), 487-489.
- BROWN, R. y WASIK, S. (1974). *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A.*, 78, 453.
- BUSHWAY, R. J. (1981). "HPLC determination of carbaryl and 1-naphthol at residue levels in various water sources by direct injection and trace enrichment". *J. Chromatogr.*, 211, 135.
- BUSHWAY, R.J. (1988). "High-performance liquid chromatographic determination of carbaryl in fruits juices". *J. Chromatogr.*, 457, 437-441.
- CABANISS, S.E. (1991). "Theory of variable-angle synchronous fluorescence spectra". *Anal. Chem.*, 63, 1323-1327.
- CAMPIGLIA, A.D. y DE LIMA, C.G. (1987). "Room-temperature phosphorimetry of carbaryl in low background paper". *Anal. Chem.*, 59(23), 2822-2827.

- CAPITÁN-VALLVEY, L.F., DEL OLMO, M., AVIDAD, R. NAVALÓN, A., DE ORBE, I y VÍLCHEZ, J.L. (1995). "Close overlapping discrimination of polycyclic aromatic hydrocarbons by synchronous scanning at variable-angle solid-phase spectrofluorimetry". *Anal. Chim. Acta*, 302, 193-200.
- CARPENTER, C. P. y COL. (1961). "Mammalian toxicity of 1-naphthyl-N-methylcarbamate (Sevin Insecticide)". *J. of Agr. Food Chem.*, 9, 30.
- CELA, R. (1994). "Avances en quimiometría práctica". Universidad de Santiago de Compostela.
- CHAPUT, D. (1988). "Simplified multi-residue method for liquid-chromatographic determination of N-methylcarbamate insecticide in fruits and vegetables". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71(3), 542-546.
- CHEN, J. (1974). "Ph. D. Dissertation". Memphis State University, Memphis, TN.
- CHENG, H.H. (1969). *J. Agr. Food Chem.*, 17, 1174.
- CHIBA, M. y MORLEY, H. V. (1964). "TLC as a rapid screening method for the determination of carbaryl and 1-naphthol residues without cleanup". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 47(4), 667.
- CHRISTIAN, G.D., CALLÉN, J.B. y DAVIDSON, E.R. (1981). "In modern fluorescence spectroscopy". Whery, E.L., Plenum Press, Nueva York, vol. 4, 111-185.
- CIIC (Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cancer) (1976). "Some carbamates, thiocarbamates and carbazides". Lyon, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to man, 12, 45.
- CLARK, B.J., FELL, A.F., MILNE, K.T., PATTIE, D.G. y WILLIAMS, H. (1985). "Pharmaceutical applications of variable-angle synchronous scanning fluorescence spectroscopy". *Analytica Chimica Acta*, 170, 35-44.
- CLINE LOVE L. J., GRAYESKI M. L., NOROSKI J. y WEINBERGER R. (1985). "Room-temperature phosphorescence and fluorescence of licit and illicit drugs enhanced by organized media". *Anal. Chim. Acta*, 170, 3.
- CLINE LOVE L. J., HABARTA J. G. y DORSEY, J.G. (1984). "The micelle-analytical chemistry interface". *Anal. Chem.*, 56, 1132A-1134A.
- CLINE LOVE L. J., HABARTA J. G. y SKRILEC M. (1981). "Influence of analyte-heavy-atom-micelle dynamics on room-temperature phosphorescence lifetimes and spectra". *Anal. Chem.*, 53, 437-444.

- CLINE LOVE L. J., SKRILEC M. y HABARTA J. G. (1980). "Analysis by micelle-stabilized room temperature phosphorescence in solution". *Anal. Chem.*, 52, 754.
- COCHRANE, W.P. y LANOUILLE, M. (1979). "High performance liquid chromatography determination of ANA residues in apples". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 62(1), 100.
- COCHRANE, W.P, LANOUILLE, M. y GRANT, R. (1980). "HPLC determination of Namide residues in apples". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 63(1), 145.
- COGGINS, C.W.JR., JOLLIFFE, V.A., SHINDY, W.W. y KNAPP, J.C.F. (1972). "Naphthalenetic acid disappearance and residue studies in citrus". *J. Agr. Food Chem.*, 20(1), 76.
- COLVIN, B. M., ENGDAHL, B. S. HAKNS, A. R. (1974). "Determination of carbaryl in pesticide formulations and fertilizers by high performance liquid chromatography". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 57, 648.
- CRUCES BLANCO, C. (1983). "Análisis de pesticidas y magnesio a niveles de trazas mediante fotometría, fluorimetría y fluorescencia de derivadas. Determinación fluorimétrica de magnesio con salicilaldehído 2- pirilhidrazona". Tesina de Licenciatura, Universidad de Granada.
- CRUCES BLANCO, C. (1987). "Aplicación de las técnicas avanzadas fluorimétricas a la determinación de plaguicidas y sus metabolitos en el medio ambiente". Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.
- CRUCES BLANCO, C. y GARCÍA SÁNCHEZ, F. (1984a). "Determination of the fungicide dichlone by normal and first derivative spectrofluorimetry". *Analytica Chimica Acta*, 166, 277.
- CRUCES BLANCO, C. y GARCÍA SÁNCHEZ, F. (1984b). "Spectrofluorimetric and synchronous scanning first derivative spectrofluorimetry determination of magnesium with SAPH". *Anal. Chem.* 56, 2033.
- CRUCES BLANCO, C. y GARCÍA SÁNCHEZ, F. (1986). "Determination of gibberellic acid residues on fruits by synchronous scanning derivative spectrofluorimetry". *J. Ass. of Anal. Chem.*, 69(1), 105.
- CRUCES BLANCO, C. y GARCÍA SÁNCHEZ, F. (1988). "A spectrofluorimetric and spectrophotometric study of the chemical behaviour of the insecticide carbaryl: Ground and excited state pKa values of its metabolite 1-naphthol". *J. of Photochem. & Photobiol., A: Chemistry*, 42(2-3), 357-373.

- CRUCES BLANCO, C., GARCÍA CAMPAÑA, A.M., ALÉS BARRERO, F. y ROMÁN CEBA, M. (1993). "Trace simultaneous spectrofluorimetric analysis of molybdenum and boron in plant leaves". *Analytica Chimica Acta*, 283, 213-223.
- CUADROS RODRÍGUEZ, L., GARCÍA CAMPAÑA, A.M., JIMÉNEZ LINARES, C. y ROMÁN CEBA, M. (1993). "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment". *Analytical Letters*, 26(6), 1243-1258.
- CZARNECKI S. y KRYSZEWSKI M. (1963). *J. Polymer. Sci.*, 1A, 3067.
- DAVIDSON, A. W. (1970). "The spectrofluorimetric determination of 2-naphthoxyacetic acid". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53, 179-181.
- DAVIS, G. C., HEIN, M. B., NEELY, B. C., SHARP, C. R. y CARNES, M. G. (1985). "Strategies for the determination of plant hormones". *Anal. Chem.*, 57(6), 638A-640A.
- DAVIS, W.W., KRAHL, M.E. y CLOWES, G.H. (1942). *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 108.
- DE LA PEÑA, L, GÓMEZ-HENS, A. y PÉREZ-BENDITO, D. (1992). "Usefulness of stopped-flow mixing for the determination of fluorescent and absorbing species. Spectrofluorimetric determination of imipramine in serum". *Analytica Chimica Acta*, 269, 137-142.
- DE LIMA, C.G., ANDINO, M.M. y WINEFORDNER, J.D. (1986). "Effects of heavy atom-containing surfactans in the room-temperature phosphorescence of carbaryl". *Anal. Chem.*, 58(13), 2867-2869.
- DE LUCCIA F. J. y CLINE LOVE L. J. (1984). "Sensitized room-temperature biacetyl phosphorescence via molecular organization". *Anal. Chem.*, 56, 2811-2815.
- DE LUCCIA F. J. y CLINE LOVE L. J. (1985). "Effect of cyclodextrin cavity size on sensitization of room-temperature phosphorescence of biacetyl". *Talanta*, 32, 665.
- DEBERARDINIS, M. JR. y WARGIN, W. A. (1982). "HPLC determination of carbaryl and 1-naphthol in biological fluids". *J. Chromatogr.*, 246, 89.
- DEMING, S.N. y MORGAN, S.L. (1993). "Experimental design: A chemometric approach". Elsevier.
- DÍAZ GARCÍA M. E., FERNÁNDEZ DE LA CAMPA M. R., HINZE W. L., y SANZ-MEDEL A. (1988). *Mikrochim. Acta*, 3, 269.

- DÍAZ GARCÍA M. E. y SANZ-MEDEL A. (1986). "Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room temperature phosphorescence". *Anal. Chem.*, 58, 1436.
- DILL, K.A., KOPPEL, D.E., CANTOR, R.S., DILL, J.D., BENDEDOUCH, D. y CHEN, S.H. (1984). *Nature*, 309, 142.
- DONKERBROEK J. J., ELZAS J. J., GOOIJER C., FREI R. W. y VELTHORST N. H. (1981). "Some aspects of room-temperature phosphorescence in liquid solutions". *Talanta*, 28, 717-723.
- DONKERBROEK J. J., GOOIJER C., VELTHORST N. H. y FREI R. W. (1982). "Sensitized room-temperature phosphorescence in liquid solutions with 1,4-dibromonaphthalene and biacetyl as acceptors". *Anal. Chem.*, 54, 891-895.
- DONKERBROEK J. J., VAN EIKEMA HOMMES N. J. R., GOOIJER C., VELTHORST N. H. y FREI R. W. (1983). "Phosphorescence detection of polychloronaphthalenes and polychlorobiphenyls in liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 225, 581-590.
- DRISS, M.R., HEMNION, M.C. y BOUGUERRA, M.L. (1993). "Determination of carbaryl and some organophosphorus pesticides in drinking water using on line liquid chromatographic pre-concentration techniques". *J. Chromatogr.*, 639(2), 352-358.
- DUMBROFF, E. B., WALKER, M. A. y DUMDROFF, P. A. (1983). "Choice of methods for determination of abscisic acid in plant tissues". *J. Chromatogr.*, 256, 439-446.
- DURÁN PÉREZ, M.S. (1990). "Aplicaciones analíticas de la fluorescencia sincrónica y de derivadas a la determinación simultánea de productos de interés analítico". Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura.
- ELESPURU, R. (1974). "Nitrosocarbaryl as a potent mutagen of environmental significance". *Nature*, 247, 386.
- EPA Compendium of Registered Pesticides (1968). Vol. I. I-N-8.
- EPA Carbaryl decision document (1980). "Office of Pesticides and Toxic Substances", Diciembre.
- EPA Air toxic clearnhouse (1986-1989). "Information retrieval system quick look report, national particulate network, benzo[a]pireno/total suspended particulate data".

- ERNST, G. F., RODER, S. J., TJAN, G. H. y JANSEN, J. T. A. (1975). "TLC detection and indirect GC determination of three carbamate pesticides". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 58(5), 1015.
- ESPINOSA-MANSILLA, A., MUÑOZ DE LA PEÑA, A., SALINAS, F. y ZAMORA, A. (1992). "Simultaneous determination of pesticides by multivariate spectral analysis and derivative spectrophotometry". *Anal. Chim. Acta*, 258(1), 47-53.
- ESPINOSA-MANSILLA, A., MUÑOZ DE LA PEÑA, A., SALINAS, F. y MARTÍNEZ, M. (1993). "Simultaneous determination of 2-furfuraldehyde, 5-hydroxymethylfurfuraldehyde and malonaldehyde in mixtures by derivative spectrophotometric and partial least-squares analysis". *Anal. Chim. Acta*, 276, 141-149.
- FEMIA R. A. y CLINE LOVE L. J. (1984). "Micelle-stabilized room-temperature phosphorescence with synchronous scanning". *Anal. Chem.*, 56, 327.
- FEMIA R. A. y CLINE LOVE L. J. (1985). "Mixed organized media: effect of micellar-cyclodextrin solutions on the phosphorescence of phenanthrene". *Journal of Colloid and Interface Sci.*, 108(1), 271-277.
- FEMIA R. A. y CLINE LOVE L. J. (1986). "Synchronous wavelength scanning room temperature phosphorescence: comparison of cyclodextrin and micellar medium". *Spectrochim. Acta*, 42A, 1239.
- FENDLER J. H. (1982). "Membrane mimetic chemistry". Wiley, Nueva York.
- FENDLER J. H. (1984). *Chem. Eng. News*, 25.
- FERNÁNDEZ-BAND, B., LINARES, P., LUQUE DE CASTRO, M.D. y VALCARCEL, M. (1991). "Flow-through sensor for the direct determination of pesticide mixtures without chromatographic separation". *Anal. Chem.*, 63(17), 1672-1675.
- FERNÁNDEZ DE LA CAMPA M. R., DÍAZ GARCÍA M. E. y SANZ-MEDEL A. (1988). "Room-temperature liquid phosphorimetry of the aluminium-feron chelate in micellar media". *Anal. Chim. Acta*, 212, 235.
- FOURTH ANNUAL REPORT ON CARCENOGENS (1985). U.S. Department of Health and Human Services, 40.
- FRANCE, J.E. y VOORHEES, K.J. (1988). "Capillary supercritical-fluid chromatography with ultraviolet multi-channel detection of some pesticides and herbicides". *HRC CC J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 11(10), 692-696.

- FRANKS, F., GENT, M. y JOHNSON, H. (1973). *J. Chem. Soc.*, 2716.
- FREED, S y VISE, M.H. (1962). *Anal. Biochem.*, 5, 338.
- FRENCH, C.S. y CHURCH, A.B. (1954). Eppley, R.W., Carnegie Inst. of Washington Year Book, 53, 182.
- FUNK, W. (1991). *Merck Spectrum*, 2, 18.
- GAMMAGE, R.B., VO-DINH, T. HAWTHORNE, A.R., THORGATE, J.H. y PARKINSON, W.W. (1978). "Carcinogenesis". Vol. 3, P.W. Jones y R.I. Frendthand (Editores), p.155, Raven Press, Nueva York.
- GAINES, T. B. (1969). "Acute Toxicity of pesticides". *Tox. and Appl. Pharmac.*, 14, 515.
- GALGANI, F. y BOCQUENE, G. (1989). "Method for routine detection of organo phosphates and carbamates in sea-water". *Environ. Technol. Lett.*, 10(3), 311-322.
- GARCÍA CAMPAÑA, A.M. (1995). "Nuevas aplicaciones fluorimétricas del rojo de alizarina S. Utilización de medios micelares". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- GARCÍA SÁNCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. (1986). "Determination of the carbamate herbicide propham by synchronous derivative spectrofluorimetry following fluorecamine fluorogenic labelling". *Anal. Chem.*, 58, 73-76.
- GARCÍA SÁNCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. (1987). "Isodifferential derivative spectrometric assay for the carbamate pesticide and its metabolite in biological fluids and commercial formulations". *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 31(1), 23-40.
- GARCÍA SÁNCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. (1988a). "Spectrofluorimetric determination of pesticide residue mixtures by isodifferential derivative spectroscopy". *Anal. Chem.*, 60(4), 323.
- GARCÍA SÁNCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. (1988b). "A direct spectrofluorimetric determination of the herbicide flurecol in cultivated soils". *J. Agr. Food Chem.*, 36, 80.
- GARCÍA SÁNCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. (1988c). "A direct spectrofluorimetric method for the determination of naphthoxyacetic acid in residues in strawberries". *Anal. Letters*, 21, 889-899.
- GARCÍA SÁNCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. (1988d). "Determination of residues

of the plant growth regulator 2-(1-naphthyl) acetamide in apples using synchronous derivative spectrofluorimetry". *Quím. Anal.*, 7(3), 299-309.

GARCÍA SÁNCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. (1989). "Synchronous derivative room-temperature phosphorescence determination of warfarin in blood serum". *Analytica Chimica Acta*, 222, 177-188.

GARCÍA SÁNCHEZ, F. y CRUCES BLANCO, C. (1990a). "Determination of carbaryl and its metabolite 1-naphthol in commercial formulations and biological fluids". *Talanta*, 37(6), 573-578.

GARCÍA SÁNCHEZ, F., CRUCES BLANCO, C. y RAMOS RUBIO, A.L. (1990a). "Multicomponent fluorescent analysis by synchronous derivative method to determine mixtures of berberine, luguine and sanguinarine". *Talanta*, 37(6), 579-584.

GARCÍA SÁNCHEZ, F., FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. y CRUCES BLANCO, C. (1995). "Variable-angle scanning fluorescence spectrometry for the simultaneous determination of three diuretic drugs". *Analytica Chimica Acta*, 306, 313-321.

GARCÍA SÁNCHEZ, F. y HERNÁNDEZ LÓPEZ, M. (1986). "Trace zinc determination by synchronous derivative fluorimetry". *Talanta*, 33(10), 785-789.

GARCÍA SÁNCHEZ, F., RAMOS RUBIO, A.L., CERDÁ, V. y OMS, M.T. (1990b). "Variable-angle-scanning fluorescence spectrometry for the determination of closely overlapped pesticide mixtures". *Anal. Chim. Acta*, 228(2), 293-299.

GARCÍA SÁNCHEZ, F., NAVAS DÍAZ, A. y FERNÁNDEZ CORREA, R. (1992). "Spectrofluorimetric determination of the herbicide bentazone microenvironment effects on the analytical signal". *Analytical Chimica Acta*, 259, 61-66.

GARCÍA SÁNCHEZ, F., FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A. y CRUCES BLANCO, C. (1995). "Variable-angle scanning fluorescence spectrometry for the simultaneous determination of three diuretic drugs". *Anal. Chim. Acta*, 306, 313-321.

GAZDA, K., MAKUCH, B. y KAMINSKI, M. (1992). "Determination of propoxur and carbaryl in drinking water by HPLC". *Chem. Anal.*, 37(4), 419-425.

GIESE, A.T. y FRENCH, C.S. (1955). *Appl. Spectrosc.*, 9, 78.

GIOIA, S.M.C. y CAMPIGLIA, A.D. (1994). "Room-temperature phosphorescence of biogenic indoles in low background paper enhanced by heavy atom salts and sodium dodecyl sulfate". *Analytica Chimica Acta*, 287, 89-94.

- GÓMEZ-HENS, A. (1991). "Modern aspects of fluorimetry as applied to clinical chemistry". *Pure & Appl. Chem.*, 63(8), 1083-1088.
- GÖTZE, H.J., SCHNEIDER, J. y HERZOG, H.G. (1991). *Fresenius J. Anal.*, 339, 699.
- GREEN, G.L. y O'HAVER, T.C. (1974). *Anal. Chem.* 46, 2191-2196.
- GUILBAULT, G.G. (1970). "Fluorescence and Phosphorescence spectrometry". Amer. Chem. Soc. Washington.
- GUILBAULT, G.G. (1973). "Practical fluorescence: Theory, Methods and Techniques by G.G. Guilbaut". Marcel Dekker, Inc. Nueva York.
- GUPTA, A. y SINGH, M. (1987). "Rapid determination of carbaryl in okra (*Abelmoschus esculentus* Moench) fruits by modified Miskus et al method (Anal. Abstr., 1960, 7, 2502)". *Pesticides*, 21(10), 48-49.
- HAMAI S. (1989). "Room-temperature phosphorescence from 1:1:1 inclusion compounds of β -cyclodextrin with brominated alcohols and acenaphthene". *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 3954.
- HAMMOND, V.J. y PRICE, W.C. (1953). *J. Opt. Soc. Amer.*, 43, 924.
- HARGREAVES, P. A. y MELKSHAM. K. J. (1983). "A rapid HPLC method for the determination of carbaryl residues in wheat grain". *Pestic. Sci.*, 14, 347.
- HASSAN, A. y SANTOLUCITO, J. (1971). "Pharmacological effects of carbaryl. Modifications of serotonin metabolism in the rat brain". *Experientia*, 27, 287.
- HAUTALA, R.R., SCHORE, N.E. y TURRO, N.J. (1973). *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 5508.
- HAYASHI, M. y SASAKI, T. (1956). *Bull. Chem. Soc. Jp.*, 29, 857.
- HAYNES, H. L. (1957). *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 18, 507.
- HILL, A. (1922). *J. Am. Chem. Soc.*, 44, 1163.
- HINZE, W.L. (1979). "Solution Chemistry of Surfactants". Mittal K.L. Ed. Plenum Press, Nueva York, 79.
- HINZE, W.L., SINGH, H.N., BABA, Y. y HARVEY, N.G. (1984). "Micellar-enhanced analytical fluorimetry". *Trends in Anal. Chem.*, 3, 193-199.

- HORGAN R. y NEILL, S. (1979). "Column conditioning for trace analysis of abscisic acid [from plant material] by gas chromatography". *J. Chromatogr.*, 177, 116-117.
- HORNSTEIN, I. (1958). "Spectrophotofluorimetry for pesticide determinations". *J. Agr. Food Chem.*, 6, 32-34.
- HUNTER, T.F. y SZCZEPANSKI, A.J. (1984). *J. Phys. Chem.*, 88, 1231.
- HURTUBISE R. J. (1981). "Solid surface luminescence analysis: Theory instrumentation and applications". M. Dekker: Nueva York.
- HURTUBISE R. J. (1983). "Phosphorimetry". *Anal. Chem.*, 55, 669A-670A.
- HURTUBISE R. J. (1990). "Phosphorimetry. Theory, instrumentation and applications". VCH. Nueva York.
- IMASAKA, T., NISHITANI, K. y ISHIBASHI, N. (1991). *Analyst*, 116, 1407.
- IUPAC (1978). "Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation". *Spectrochim Acta B*, 33B, 242-245.
- JENTOFT, R.E. y GOUW, T.H. (1970). *J. Chrom. Sci.*, 8, 138.
- JENTOFT, R.E. y GOUW, T.H. (1976). *Anal. Chem.*, 48, 2195.
- JOLLIFFE, V.A. y COGGINS, C.W. Jr. (1970). "A fluorimetric method for the determination of ANA residues in citrus". *J. Agr. Food Chem.*, 18(3), 394.
- JONES, B.T., MULLINS, N.J. y WINEFORDNER, J.D. (1989). "Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons by low-temperature phosphorimetry with a moving sample cooling device". *Anal. Chem.*, 61, 1182-1185.
- JONES, A. S., LOUIS, A. y FELTON, F. L. (1982). "Rapid, direct HPLC method for simultaneous quantitative determination of carbaryl and 1-naphthol in aqueous samples". *J. Agr. Food Chem.*, 30(5), 997.
- JONH, P. y SOUTAR, I. (1976). "Identification of crude oils by synchronous excitation spectrofluorimetry". *Anal. Chem.*, 48, 520-524.
- JÚNIOR, J.R.F. y CAMPIGLIA, A.D. (1995). "Solid-surface room-temperature phosphorescence detection of serotonin, tryptamine and gramine enhanced by inorganic salts and sodium dodecyl sulfate". *Talanta*, 42, 1505-1512.
- KALYANASUNDARAM K., GRIESER F. y THOMAS J. K. (1977). *Chem. Phys. Lett.*, 51, 501.

- KALYANASUNDARAM K. y THOMAS, J.K. (1976). *J. Phis. Chem.*, 80, 1462.
- KANNANGARA, T., DURLEY, R. C. y SIMPSON, G. M. (1978). "High-performance liquid-chromatographic analysis of cytokinins in *sorghum bicolor* leaves" *Physiol. Plant.*, 44, 295-299.
- KANNANGARA, T., SIMPSON, G. M., RAJKUMAR, K. y MURPHY, B. D. (1984). "Analysis of abscisic acid in wheat leaves by a combination of high-performance liquid chromatography and radio-immuno-assay". *J. Chromatogr.*, 283, 425-430.
- KASHA M. (1952). *J. Chem. Phys.*, 20, 71.
- KAWAI, S. (1987). "Simple HPLC method for determination of carbaryl deposited after aerial application". *Bunseki Kagaku*, 36(9), 574-576.
- KAWAI, S., GOTO, K., KANO, K. y KUBOTA, T. (1988). "Determination of carbaryl by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". *J. Chromatogr.*, 442, 451-454.
- KAWAOKA K., KHAN A. U. y KEARNS P. R. (1967). *J. Chem. Phys.*, 46, 1842.
- KENDRICK, P.N., TRIM, A.J., ATWAL, J.K. y BROWN, P.N. (1991). "Direct gas-chromatographic determination of carbaryl residues in honeybee (*Apis mellifera*) using a nitrogen-phosphorus detector with confirmation by formation of a chemical derivative". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 46(5), 654-661.
- KHAN, M.S. (1989). "Method for analysis of secondary carbamate pesticides". *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 31(3), 167-170.
- KIERS, R.J., BRITT, Jr. y WENTWORTH, W.E. (1957). *Anal. Chem.*, 29, 202.
- KIM, T.J., EO, Y.W. y RHEE, J.S. (1991). "Study on the simultaneous analysis of regulated pesticide residues from rice and poya bean". *J. Korean Chem. Soc.*, 35(5), 560-568.
- KRAUSE, R. T. (1978). "Further characterization and refinement of an HPLC postcolumn fluorometric labeling technique for the determination of carbamate insecticides". *J. Chromatogr. Science*, 16, 281.
- KRAUSE, R. T. (1979). "Resolution, sensitivity and selectivity of a HPLC postcolumn fluorogenic labeling technique for determination of carbamate insecticides". *J. Chromatogr.*, 185, 615 .
- KRAUSE, R. T. (1980). "Multiresidue method for determining N-methylcarbamate insecticides in crops, using HPLC". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 63(5), 1114.

- KRAUSE, R. T. y AUGUST, M. (1983). "Applicability of a carbamate insecticide multi-residue method for determining additional types of pesticides in fruits and vegetables". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 66, 124.
- KRAUSE, R. T. (1983). "Liquid chromatography determination of N-methylcarbamate insecticides and metabolites in crops. Analytical characteristics and residue findings". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 68(4), 734.
- KRAUSE, R.T. (1988). "High-performance liquid-chromatographic determination of aryl N-methyl carbamate residues using post-column hydrolysis electrochemical detection". *J. Chromatogr.*, 442, 333-343.
- KUBIC, T.A., KANABROCK, T. y DWYER, J. (1980). "Communication presented in the 32nd Annual Congress of the American Academy of Forensic Sciences".
- KUBIC, T.A., LASHER, C.M. y DWYER, J. (1983). "Individualization of automobile engine oils. II. Introduction of variable-separation synchronous-excitation fluorescence to engine oils analysis". *J. Forensic Sci.*, 28, 186-199.
- KUBIC, T.A. y SCHEMAN, F.X. (1983). "Individualization of automobile engine oils. II. Application of variable-separation synchronous-excitation fluorescence to analysis of used automobile engine oils". *J. Forensic Sci.*, 28, 345-350.
- KUMARAN, S. y TRAN-MINH, C. (1992). "Insecticide determination with enzyme electrodes using different enzyme immobilization techniques". *Electroanalysis*, 4(10), 949-954.
- LARKIN, M. J. y DAY, M. J. (1979). "Direct fluorimetric determination of carbaryl insecticide and its hydrolysis product 1-naphthol". *Anal. Chim. Acta*, 108, 425.
- LATTER, W.B. (1991). *The Astrophysical J.*, 377, 187.
- LAWRENCE, J. F. y LEDUC, R. (1978a). "HPLC with ultraviolet absorbance or fluorescence detection of carbaryl in potato and corn". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 61(4), 872.
- LAWRENCE, J. F. y LEDUC, R. (1978b). "HPLC analysis of carbofuran and two non-conjugated metabolites in crops as fluorescent dansyl derivatives". *J. Chromatogr.*, 152, 507.
- LAWRENCE, J. F. y TURTON, D. (1978). *J. Chromatogr.*, 159, 207.
- LESAGE, S. (1991). *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339, 516.

- LEVILLAIN, P. y FOMPEYDIE, D. (1986). "Spectrophotometric dérivée: Intérêt, limites et applications". *Analisis*, 14(1), 1-20.
- LI, Y.Q., HUANG, X.Z., XU, J.G. y CHEN, G.Z. (1992). *Anal. Chim. Acta*, 256, 285.
- LIN, C., ZHANG, X., HE, T. y YING, F. (1989). "Determination of carbaryl and impurities in technical product by high-performance liquid chromatography". *Sepu*, 7(6), 354-356.
- LIU, Y. M., FERNÁNDEZ DE LA CAMPA, M. R., DÍAZ GARCÍA, M. E. y SANZ-MEDEL A. (1990). "Phosphorescence detection in flowing systems: selective determination of aluminium by flow-injection liquid room-temperature phosphorimetry". *Anal. Chim. Acta*, 234, 233.
- LIU, Y., PEREIRO-GARCÍA, R., VALENCIA-GÓMEZ, M.J. DÍAZ-GARCÍA, M.E. y SANZ-MEDEL, A. (1994). "Evaluation of some immobilized room-temperature phosphorescent metal chelates as sensing materials for oxygen". *Anal. Chem.*, 66, 836-840.
- LLOYD, J.B.F. (1971). "Nature and evidential value of luminiscence of automobile-engine oil and related materials. I. Synchronous excitation of fluorescence emission". *J. Forensic Sci. Soc.*, 11, 83-94.
- LLOYD, J.B.F. (1975). *Analisis*, 100, 82.
- LLOYD, J.B.F. (1971). *Nature Phys. Sci.*, 231, 64-67.
- LLOYD, J.B.F. y EVETT, I.W. (1977). "Prediction of peak wavelengths and intensities in synchronously fluorescence emission spectra". *Anal. Chem.* 50, 1710-1715.
- LONG, D.E. (1969). "Simplex optimization of the response from chemical systems". *Anal. Chim. Acta*, 46, 193-206.
- LÓPEZ, A., BLANCO, E., GARCÍA, J.I. y SANZ-MEDEL, A. (1992). *Chromatographia*, 33, 225.
- MACKAY, D. y SHIU, W. (1975). *Can. J. Chem. Eng.*, 53, 239.
- McAULIFFE, C. (1966). *J. Phys. Chem.*, 70, 1274.
- MALI, B.D., GARAD, M.V. y PADALIKAR, S.V. (1990). "Specific detection of carbaryl on thin-layer chromatographic plates". *J. Indian Acad. Forensic Sci.*, 29(29) 3-7.

- MARENGO, E., GENNARO, M.C., BAIOCCHI, C. y BERTOLO, P.L. (1992). *Anal. Chim. Acta*, 258, 93.
- MARTÍN ANDRÉS, A. y LUNA DEL CASTILLO, J.D. (1990). "Bioestadística para las ciencias de la salud". Ed. Norma, Madrid.
- MARVIN, C.H., BRINDLE, I.D., HALL, C.D. y CHIBA, M. (1990a). "Automated high-performance liquid chromatography for the determination of pesticides in water using solid-phase extraction". *Anal. Chem.*, 62(14), 1495-1498.
- MARVIN, C.H., BRINDLE, I.D., SINGH, R.P., HALL, C.D. y CHIBA, M. (1990b). "Simultaneous determination of trace concentration of benomyl, carbendazin (MBC) and nine other pesticides in water using an automated on line pre-concentration high-performance liquid chromatographic method". *J. Chromatogr.*, 518(1), 242-249.
- MARVIN, C.H., BRINDLE, I.D., HALL, C.D. y CHIBA, M. (1990c). "Development of an automated high-performance liquid chromatographic method for the on line pre-concentrations of pesticides in drinking water". *J. Chromatogr.*, 503(1), 167-176.
- MASSEY, K.A., VAN ENGELEN, D.L. y WARNER, I.M. (1995). "Determination of carbaryl as its primary metabolite 1-naphthol by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorometric detection". *Talanta*, 42, 1547-1463.
- MATTERN, G.C., SINGER, G.M., LOUIS, T., ROBSON, M. y ROSEN, J.D. (1990). "Determination of several pesticides with a chemical-ionization ion-trap detector". *J. Agric. Food Chem.*, 38(2), 402-407.
- MAY, W.E., WASIK, S.P. y FREEMAN, D.H. (1978). *Anal. Chem.*, 50, 997.
- McCLURE D. (1949). *J. Chem. Phys.*, 17, 905.
- McDERMOTT, W. H. y DUVALL, A. H. (1970). "Carbaryl insecticide analysis of formulations by colorimetry". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 53(5), 896.
- McDERMOTT, W. H. (1980). "HPLC determination of carbaryl insecticide in formulations". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 63(3), 650.
- McGLYNN S. P., AZUMI T. y KINOSHITA M. (1969). "Molecular Spectroscopy of the Triplet State". Prentice-Hall, Englewood Cliffs: N.J., 1969.
- McGLYNN S. P., NEELY, B.T. y NEELY, W.C. (1963). *Anal. Chim. Acta*, 28, 472.

- McINTIRE, G.L. (1990). *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 21, 257
- MENGER, F.M. (1979). *Acc. Chem. Res.*, 12, 111.
- MENZEI, C.A., POTOCKI, B.B. y SANTODONATO, J. (1992). *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1278,
- MILLER, J.C. Y MILLER, J.N. (1988). "Statistics for analytical chemistry". Ellis Horwood Limited, Chichester, UK.
- MILLER, J.N. (1981). "Room-temperature phosphorimetry -a promising trace analysis method". *Trends in Anal. Chem.*, 1, 31-34.
- MILLER, J.N., AHMAD, T.A. y FELL, A.F. (1982). "Derivative fluorescence spectroscopy". *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, 19, 37-41.
- MINCZEWSKI, J. (1956). "2-Naphthoxyacetic acid. I. Analytical study. II. Determination by a fluorimetric method". *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2(1), 62-68.
- MISKUS, R., GORDON, H. T. y GEORGE, D. A. (1959). "Colorimetric determination of 1-naphthyl-N-methylcarbamate in agricultural crops". *Agr. Food Chem.*, 7(9), 613.
- MORELLI, B. (1994). "Simultaneous determination of ceftriaxone and streptomycin in mixture by ratio-spectra 2nd derivative and zero-crossing 3rd derivative spectrophotometry". *Talanta*, 41(5), 673-683.
- MORI, Y., GOTO, S., ONODERA, S., NAITO, S., TAKITANI, S. y MATSUSHITA, H. (1993). *Fresenius J. Anal. Chem.*, 345, 63.
- MORRISON, J.D. (1953). *J. Chem. Phys.*, 21(10), 1767.
- MOYE, H. A. y WINEFORDNER, J. D. (1965). "Phosphorimetric study of some common pesticides". *J. Agric. Food Chem.*, 13, 516-518.
- MOYE, H. A. y WINEFORDNER, J. D. (1965). "Determination of urinary p-nitrophenol by thin-layer chromatography and phosphorimetry". *J. Agric. Food Chem.*, 13, 533-536.
- MUKERJEE, P. (1979). "Solution Chemistry of Surfactans". Mittal K.L. Ed. Plenum Press, Nueva York, 153.
- MUÑOZ DE LA PEÑA, F. (1985). "Determinación de magnesio con ácido 2-quinizarin sulfónico mediante fluorescencia convencional y combinación de fluorescencia y de derivadas". Tesina de Licenciatura, Universidad de Extremadura.

- MUÑOZ DE LA PEÑA, A., DURÁN-MERÁS, I., SALINAS, F., WARNER, I.M. y NDOU, T.T. (1991). "Cyclodextrin-induced fluid solution room-temperature phosphorescence from acenaphthene in the presence of 2-bromoethanol". *Anal. Chim. Acta*, 255, 351-357.
- MUÑOZ DE LA PEÑA, A., NDOU, T.T., ANIGBOBU, V.C. y WARNER, I.M. (1991). "Solution studies of β -cyclodextrin-pyrene complexes under reversed-phase liquid chromatographic conditions: effect of alcohols as mobile-phase modifiers". *Anal. Chem.*, 63, 1018-1023.
- MUÑOZ DE LA PEÑA, A., SALINAS, F., GÓMEZ, M.J., SÁNCHEZ-PEÑA, M. y DURÁN-MERÁS, I. (1993). "Host-guest stabilized room-temperature phosphorescence in β -cyclodextrin/bromoalcohol solutions from 2-naphthyl-oxy-acetic acid and 1-naphthyl-acetic acid". *Talanta*, 40(11), 1657-1664.
- MURREL J. N. (1960). *Mol. Phys.*, 3, 319.
- MURINO, M.A., GANDARA, J.S. y LOZANO, J.S. (1991). "Simultaneous determination of pentachlorophenol and carbaryl in water". *Chromatographia*, 32(5-6), 238-246.
- NAGASAWA, K., UCHIYAMA, H., OGAMO, A. y SHINOZUKA, T. (1977). "GC determination of microamounts of carbaryl and 1-naphthol in natural water as sources of water supplies". *J. Chromatogr.*, 144, 77.
- NAKAMOTO, R.J. y PAGE, M. (1986). "Simplified determination of carbaryl in rainbow trout liver tissue". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 37(3), 415-420.
- NEDLER, J.A. y MEAD, R. (1965). *Comput. J.*, 7, 308.
- NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) (1976). "Criteria for a recommended standard: Occupational exposure to carbaryl". Cincinnati, OH. Publicación n° 77, 107.
- NUGARA, N.E. y KING, A.R. Jr. (1989). "Light absorption and mixed micelle composition as factors in determining intensities of room-temperature phosphorescence". *Anal. Chem.*, 6, 1431-1435.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (1982). "Límites recomendados por razones de salud en la exposición profesional a los plaguicidas". Serie de informes técnicos, 677, 40.
- OMS, M.T., FORTEZA, R., CERDÁ, V., MOSPOCH, S., COELLO, J. y BLANCO, M. (1990). "Simultaneous determination of two components by spectrofluorimetric techniques". *Analytica Chimica Acta*, 233, 159-163.

- ORTEGA LABAJOS, M.C. (1988). "Espectrofluorimetría de barrido sincrónico unidireccional y programable". Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.
- OTT, D. E., ITTIG, M. y FRIEDSTAD, H. O. (1971). "Automated steam distillation and fluorometry for screening for carbaryl as 1-naphthol in fruits and vegetables". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 54(1), 160.
- PADALIKAR, S.V., SHINDE, S.S. y SHINDE, B.M. (1988). "Specific spray reagents for the detection of carbaryl bi thin-layer chromatography". *Analyst*, 113(11), 1747-1748.
- PAL, A., WATTS, W., CARAWAY, J. y VO-DINH, T. (1992). "Enhanced room-temperature phosphorescence using sodium lauryl sulfate treated solid substrate". *Analisis*, 20, 149-153.
- PANADERO, S., GÓMEZ-HENS, A. y PÉREZ-BENDITO, D. (1994). "Usefulness of the stopped-flow mixing technique for micelle-stabilized room-temperature liquid phosphorimetry". *Anal. Chem.*, 66, 919-923.
- PANADERO, S., GÓMEZ-HENS, A. y PÉREZ-BENDITO, D. (1995). "Fast determinación of naproxen in serum by stopped-flow/room temperature liquid phosphorescence". *Anal. Lett.*, 28, 1405.
- PANNE, U., LEWITZKA, F. y NIESSNER, R. (1992). *Analisis*, 20, 533.
- PANG, G. y WANG, B. (1989). "High-performance liquid-chromatographic determination of residues of carbaryl and carbofuran in maize". *Sepu*, 7(2), 110-112.
- PARKER C. A. y HATCHARD C. G. (1962). *J. Phys. Chem.*, 30, 276.
- PEASE, H. y GARDINER, G.A. (1969). "Fluorimetric and colorometric procedures for determining residues of benomyl". *J. Agric. Food. Chem.*, 17, 267-270.
- PELIZZETTI, E. y PRAMAURO, E. (1985). "Analytical applications of organized molecular assemblies". *Anal. Chim. Acta*, 169, 1-29.
- PÉREZ-RUIZ, T., MARTÍNEZ-LOZANO, C., TOMÁS, V. y SIDRACH DE CARDONA, C. (1993). "Flow-injection fluorimetric determination of trimeprazine and trifluoperazine in pharmaceutical preparations". *Talanta*, 40(9), 1361-1365.
- PIEPER, G. R. (1979). "Residue analysis of carbaril on forest foliage and in stream water using h.p.l.c.". *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 22, 167-171.
- QUINTERO, M.C., SILVA, M. y PÉREZ-BENDITO, D. (1988). "Stopped-flow

- determination of carbaryl and its hydrolysis products in mixtures in environmental samples". *Talanta*, 35(12), 943-948.
- QUINTERO, M.C., SILVA, M. y PÉREZ-BENDITO, D. (1989). "Simultaneous stopped-flow determination of 1- and 2-naphthol". *Talanta*, 36(7), 717-722.
- QUINTERO, M.C., SILVA, M. y PÉREZ-BENDITO, D. (1991). "Enzymatic determination of N-methylcarbamate pesticides at the nanomolar level by the stopped-flow technique". *Talanta*, 38(11), 1273-1277.
- RAJU, J. y GUPTA, V.K. (1989). "Simple spectrophotometric method for the determination of carbaril in [plant] grains and insecticide formulations using diazotized-4'-aminoacetophenone". *Microchem. Acta*, 40(3), 286-291.
- RAJU, J., SHIVHAU, P. y GUPTA, V.K. (1992). "Rapid and sensitive screening method for the determination of carbaryl and propoxur using p-nitroaniline". *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 49(3), 111-115.
- RAMASAMY S. M. y HURTUBISE R. I. (1989). "Room-temperature luminiscence of the volatile compounds, 1- and 1-naphthol, and other compounds, 5,6-benzoquinoline, 4-phenylphenol, phenanthrene, triphenylene and p-aminobenzoic acid, adsorbed on filter paper treated with salts and cyclodextrins". *Microchem. J.*, 40, 317.
- RAMIS RAMOS, G., GARCÍA-ÁLVAREZ-COQUE, M.C., BERTHOD, A. y WINEFORDNER, J.D. (1988). "Fluorescence in microemulsions and reversed micelles". *Analytica Chimica Acta*, 208, 1-19.
- RAMIS RAMOS, G., KHASAWNEHT, I.M., GARCÍA-ÁLVAREZ-COQUE, M.C. y WINEFORDNER, J.D. (1988). "Room-temperature phosphorimetry of polyaromatic hydrocarbons with organized media and paper substrate: a comparative study". *Talanta*, 35(1), 41-46.
- RAMOS RUBIO, A.L. (1984). "Desarrollo de métodos fluorimétricos sincrónico-derivados para la determinación conjunta de los alcaloides berberina, luguina y sanguinarina". Tesina de Licenciatura, Universidad de Málaga.
- RAMOS RUBIO, A.L., CRUCES BLANCO, C. y GARCÍA SÁNCHEZ, F. (1986). "Synchronous scanning first and second derivate spectrofluorimetric determination of the alkaloid boberine". *Fresenius Z' Anal. Chem.*, 323, 153.
- RANDALL, R.C. (1970). "UV determination of naphthalenacetic acid in apples and potatoes". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 53(1), 149.

- RANGASWAMY, J. R. y MAJUMDER, S. K. (1974). "Colorimetric method for estimation of carbaryl and its residue on grains". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 57(3), 592.
- RATHORE, H.S. y SAXENA, S.K. (1990). "New indicator and test for the semi-quantitative determination of traces of carbaryl in water". *Anal. Lett.*, 23(1), 93-118.
- RATHORE, H.S., KHAN, H.A. y SHARMA, R. (1991). "Thin-layer-chromatographic separation, detection and quantitation of carbaryl in water". *J. Planar Chromatogr.*, 4(6), 494-496.
- RATHORE, H.S. y SHARMA, R. (1992). "Sequential thin-layer chromatography of carbaryl and related compounds". *J. Liq. Chromatogr.*, 15(10), 1703-1717.
- REEVE D. R. y CROZIER, A. (1980). "Quantitative analysis of plant hormones". Ed. J. McMillan, Springer Verlag: Berlin.
- RENDELL, D. (1987). "Fluorescence and phosphorescence". Ed. Mowthorpe, D., John Wiley, London.
- RICHMOND M. D. y HURTUBISE R. J. (1989a). "Room-temperature luminiscence of a variety of compounds on 1 % α -cyclodextrin-NaCl mixture". *Appl. Spectrosc.*, 43, 810-812.
- RICHMOND M. D. y HURTUBISE R. J. (1989b). "Analytical characteristics of β -cyclodextrin/salt mixtures in room-temperature solid-surface luminiscence analysis". *Anal. Chem.*, 61, 2643.
- ROBBAT, A., LIU, T.Y. y ABRAHAN, M.D. (1992). *Anal. Chem.*, 64, 1477.
- ROBINSON G. W. (1967). *J. Chem. Phys.*, 46, 572.
- ROOS, A.H., VAN MUNSTEREN, A.J., NAB, F., TUISTRA, L.G.M. (1987). "Universal extraction-cleanup procedure for screening of pesticides by extraction with ethyl acetate and size-exclusion chromatography". *Anal. Chim. Acta*, 196, 95-102.
- ROMÁN CEBA, M., FERNÁNDEZ GUTIERREZ, A. Y MAHEDERO, M. C. (1983). "Determinación espectrofluorimétrica del N-metilcarbamato de naftilo". *Afinidad*, Tomo XL n° 386,.
- ROSSI, M.T., DESILETS, D.J. y PARDUE, H.L. (1984). *Anal. Chim. Acta*, 161, 191.

- ROSSI, M.T. y PARDUE, H.L. (1985). *Anal. Chim. Acta*, 153, 173.
- ROTH, M. (1967). "Phosphorescence at normal temperature: selective and non-destructive method for the detection of certain aromatic compounds in chromatography on paper or cellulose". *J. Chromatogr.*, 30, 276-278.
- RUBIO, S. GÓMEZ-HENS, A. y VALCÁRCEL, M. (1985). "Analysis of binary and ternary mixtures of titanium, zirconium and hafnium by derivative synchronous fluorescence spectrometry". *Anal. Chem.*, 57, 1101-1106.
- RUBIO, S. GÓMEZ-HENS, A. y VALCÁRCEL, M. (1986). "Analytical applications of synchronous fluorescence spectroscopy". *Talanta*, 33(8), 633-640.
- RUBIO BARROSO, S., LÓPEZ LÓPEZ, D., VAL ONTILLERA, C. y POLO DÍEZ, L. (1991). "Estudio espectrofluorimétrico de PAHs en medios organizados de β -ciclodextrina y pluronic-F 68.". *Química Analítica*, 10(2), 127-136.
- RYAN, P.B., BARR, R.L. y TODD, H.D. (1980). "Simplex techniques for non-linear optimization". *Anal. Chem.*, 52(9), 1460-1467.
- SAENGER W. (1980). *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19, 344.
- SALINAS, F., MUÑOZ DE LA PEÑA, A. y DURÁN, M.S. (1991). "Analysis of mixtures of oxytetracycline and riboflavine by first-derivative synchronous spectrofluorimetry". *Analyst*, 116, 291-296.
- SALINAS, F., MUÑOZ DE LA PEÑA, A. y MUÑOZ DE LA PEÑA, F. (1985). *Mitrochim. Acta (Wien)*, III, 361.
- SALVADOR, A., DE BENZO, Z.A. y DE LA GUARDIA, M. (1990). "Direct derivative spectrophotometric determination of carbaryl and carbofuran in water samples". *Mickochem. J.*, 42(2), 187-196.
- SANCENON, J., CARRIÓN, J.L. y DE LA GUARDIA, M. (1989). "Fluorimetric determinación of carbaryl in micelar media". *Talanta*, 36(12), 1165-1169.
- SANCENON, J., CARRIÓN, J.L. y DE LA GUARDIA, M. (1990). "Fluorimetric determination of 1-naphthol and mixtures of carbaryl and 1-naphthol in micelar media". *Fresenius J. Anal. Chem.*, 336(5), 389-393.
- SÁNCHEZ, F.G., RUBIO, A.L.R., CERDÁ, V. y OMS, M.T. (1990). *Anal. Chim. Acta*, 228, 293-299.
- SANDERS, L. B., y WINEFORDNER, J. D. (1972). *J. Agr. Food. Chem.*, 20, 166.

- SANTANA, J.J., SOSA, Z., AFONSO, A. y GONZÁLEZ, V. (1991). *Anal. Chim. Acta*, 255, 107.
- SANTANA, J.J., SOSA, Z., AFONSO, A. y GONZÁLEZ, V. (1992). *Talanta*, 39, 1611.
- SANTANA RODRÍGUEZ, J.J., HERNÁNDEZ GARCÍA, J., BERNAL SUÁREZ, M.M. y BERMEJO MARTÍN-LÁZARO, A. (1993). "Analysis of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in sea-water by synchronous fluorescence spectrometry in organized media". *Analyst*, 118, 917-921.
- SANZ-MEDEL A., MARTÍNEZ GARCÍA P. L. y DÍAZ GARCÍA M. E. (1987). "Micelle-stabilized room-temperature liquid phosphorimetry of metal chelates and its application to niobium determination". *Anal. Chem.*, 59, 774.
- SASTRY, C. S. P., VIJAYA, D. y RAO, K. E. (1986). "Sensitive spectrophotometric determination of carbaryl and propoxur in formulations, water, grains and pulses". *Food Chem.*, 20(2), 157.
- SASTRY, C.S.P., VIJAYA, D. y MANGALA, D.S. (1987). "Spectrophotometric determination of carbaryl and propoxur using aminophenols and phenylenediamine". *Analyst*, 112(1), 75-78.
- SCHLENK W. y SAND D. M. (1961). *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 2312.
- SCHUETTE, J.M. y WARNER, I.M. (1994). "Structural considerations and fluorescence spectral definition of cyclodextrin/perylene complexes in the presence of 1-pentanol". *Talanta*, 41(5), 647-649.
- SCHULMAN E. M. y WALLING C. J. (1972). *Science*, 53, 178.
- SCHULMAN E. M. y WALLING C. J. (1973). *J. Phys. Chem.*, 77, 902.
- SCYPINSKI S. y CLINE LOVE L. J. (1984a). "Room-temperature phosphorescence of polynuclear aromatic hydrocarbons in cyclodextrins". *Anal. Chem.*, 56, 322.
- SCYPINSKI S. y CLINE LOVE L. J. (1984b). "Cyclodextrin-induced room-temperature phosphorescence of nitrogen heterocycles and bridged biphenyls". *Anal. Chem.*, 56, 331.
- SHE, L. K., BRINKMAN, J. A. T. y FREI, R. W. (1984). "Liquid chromatography residue analysis of carbaryl based on a post-column catalytic reactor principle and fluorogenic labelling". *Anal. Lett.*, 17(A10), 915.

- SIE, S.T. y RIJNDERS, G.W..A. (1967). *Sep. Sci.*, 2, 755.
- SIEBENMORGEN, R. y KRÜGEL, E. (1992). *Astrom. Astrophys.*, 259, 614.
- SIGRIST, R., TEMPERLI, A. y HURTER, J. (1974). "A fluorimetric method for the determination of residues of naphthalenacetic acid and naphthalenacetamide on apples". *J. Agr. Food Chem.*, 22(4), 568.
- SKOOG, D.A., WEST, D.M. y HOLER, F.J. (1995). "Química analítica". Mc. Graw-Hill, Saunders College Publishing.
- SKRILEC M. y CLINE LOVE L. J. (1980). "Room-temperature phosphorescence characteristics of substituted arenes in aqueous thallium lauryl sulfate micelles". *Anal. Chem.*, 52, 1559.
- SKRILEC M. y CLINE LOVE L. J. (1981a). "Micelle-stabilized room-temperature phosphorescence characteristics of carbazole and related derivatives". *J. Phys. Chem.*, 85, 2047.
- SKRILEC M. y CLINE LOVE L. J. (1981b). *J. Phys. Chem.*, 85, 2047.
- SMITH, R.D., FJELDSTED, J.C. y LEE, M.L. (1982). *J. Chrom.*, 247, 231.
- SOMMER, L., LANGOVÁ, M. y KUBÁN, V. (1978). "Examination of molecular absorption spectrometry in visible and U.V. an analytical method with respect to inorganic analytes". *Scripta Fac. Sci. Natur. Vjep Brunasis Chemia 1*, 8, 13.
- SPARACINO, C. M. y HINES, J. W. (1976). "HPLC of carbamate pesticides". *J. of Chromatogr. Science*, 14, 549.
- SPENDLEY, W., HEXT, G.R. y HIMSWORTH, F.R. (1962). *Technometrics*, 4, 441.
- SPITTLER, T. D., MARAFIOTI, R. A., HELFMAN, G. W. y MORSE, R. A. (1986). "Determination of carbaryl in honeybees and pollen by high performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 352, 439 .
- STEARNS, R.R., OPPENHEIMER, H., SIMON, E. y HARKINS, W. (1974). *J. Chem. Phys.*, 14, 496.
- STRAIT, J.R., THORNWALL, G.C. y EHRICH, M. (1991). "Sensitive high-performance liquid chromatographic analysis for toxicological with carbaryl". *J. Agric. Food Chem.*, 39(4), 710-713.
- SUSUKI, O., HATTORI, H., LIU, T., SENO, H. y KUMAZAWA, T. (1990). "Positive

and negative ion mass spectrometry and rapid cleanup of some carbamate pesticides". *Forensic Sci. Int.*, 4683), 169-180.

SUTTON, C. y CLAEDER, J.A. (1975). *J. Chem. Eng. Data.*, 20, 320.

SZEJTLI J. (1982). "Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes". Akademiai Kiado: Budapest.

TACHIBANA, M. y FURUSAWA, M. (1992). "Selective and simultaneous determination of trace amounts of 5H-benzo[b]carbazole and nephthacene in a variety of analogous chemicals using the zone-melting technique and synchronous fluorescence spectrometry". *Analyst*, 117, 1485-1490.

TACHIBANA, M. y FURUSAWA, M. (1995). "Solvent extraction of acenaphthene from dodecane into aqueous β -cyclodextrin medium and application to synchronous spectrofluorimetric determination in kerosene". *Analyst*, 120, 437-441.

TENA, M.T., LUQUE DE CASTRO, M.D. y VALCARCEL, M. (1992). "HPLC post-column derivatizing-integrated-retention-detection system for the determination of carbaryl and its hydrolysis products". *J. Chromatogr. Sci.*, 30(7), 276-279.

THADEO, R. J. y MOWERY, D. F. (1984). "Synthesis and testing of the insecticide carbaryl". *J. of Chem. Education*, 61(8), 742.

THOMAS, J.K. (1977). *Acc. Chem. Res.*, 10, 133.

THOMAS, J.K. (1980). *Chem. Rev.*, 80, 283.

TRAUTWEIN, N. L. y GUYON, J. C. (1983). "Determination of the pesticides 2,4-D, 2-naphthoxy-acetic acid and silvex by low temperature phosphorimetry". *Microchimica Acta*, I, 413-418.

TREVELLIN, W.R., VIDAL, L.H., LANDGRAF, M.D., SILVA, I.C.E. y REZENDE, M.O.O. (1992). *Anal. Chim. Acta*, 268, 67.

TSUBONURA H. y MULLIKEN R. (1960). *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 5966.

TUBUSHI I., FUJITA K. y YUAN L. C. (1977). *Tetrahedrom. Lett.*, 29, 2503.

TURRO N. J. y AIKAWA M. J. (1980). "Phosphorescence and delayed fluorescence of 1-chloromaphthalene in micellar solution". *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 4866.

TURRO N. J., BOLT J. D., KURODA Y. y TABUSHI I. (1982a). "A study of the kinetics of inclusion of halonaphthalenes with β -cyclodextrin via time correlated phosphorescence". *Photochem. Photobiol.*, 35, 69.

- TURRO N. J., OKUBO T., CHUNG C. J. (1982b). "Analysis of static and dynamic host-guest associations of detergents with cyclodextrins via photoluminescence methods". *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 1789.
- TURRO N. J., OKUBO T. y WEED G. C. (1982c). *Photochem. Photobiol.*, 35, 325.
- TURRO N. J., COX G. S. y LI X. (1983). "Remarkable inhibition of oxygen quenching of phosphorescence by complexation with cyclodextrins". *Photochem. Photobiol.*, 37(2), 149.
- TURRO N. J., LIU K., CHOW M. y LEE P. (1978). *Photochem. Photobiol.*, 27, 523.
- UCC (Union Carbide Chemicals) (1975). 30-U1A15-4, 1.
- UCHIYAMA, M. (1975). "Mutagenicity of nitroso derivatives of N-methylcarbamate insecticide in microbiological method". *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, 14, 589.
- VALCÁRCEL, M., GÓMEZ-HENS, A. y RUBIO, S. (1985). "Simultaneous determination of epinephrine [adrenaline] and norepinephrine [noradrenaline] in urine by derivative synchronous fluorescence spectroscopy". *Clin. Chem.*, 31, 1790-1794.
- VANDECASTEELE, C. y BLOCK, C.B. (1993). "Modern methods for trace element determination". Wiley, Chichester, Gran Bretaña.
- VANELLI, J. J. y SCHULMAN, E. M. (1984). "Solid-surface RTP of pesticides". *Anal. Chem.*, 56(6), 1030.
- VELASCO, J., LABORDA, R. y BALASCH, S. (1992). *Tech. Lab.*, 14, 202.
- VELAPOLDI, R.A., WHITE, P.A., MAY, W.E. y EBERHARDT, K.R. (1983). *Anal. Chem.*, 55, 1896.
- VERMILLION, H. (1939). Ph.D. Thesis, Duke University, Durhan, N.C..
- VILCHEZ, J.L., DEL OLMO, M., AVIDAD, R. y CAPITÁN-VALLVEY, L.F. (1994). "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons residues in water by synchronous solid-phase spectrofluorimetry". *Analyst*, 119, 1211-1214.
- VO-DINH T. (1978). *Anal. Chem.*, 50, 396-401.
- VO-DINH T. (1981). "Modern fluorescence spectroscopy: Synchronous excitation spectroscopy". Ed. E.L. Wehry, Plenum Press, Nueva York.

- VO-DINH T. (1982). *Appl. Spectrosc.*, 36, 576-581.
- VO-DINH T. (1984). "Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis". Willey: Nueva York.
- VO-DINH T. y ALAK A. M. (1987). "Enhanced room-temperature phosphorescence of anthracene on cyclodextrin-treated filter paper". *Appl. Spectrosc.*, 41, 963-966.
- VO-DINH, T., GAMMAGE, R.B., HAWTHORNE, A.R. y THORNGATE, J.H. (1978). "Synchronous spectroscopy for analysis of polynuclear aromatic compounds". *Environ. Sci. Technol.* 12, 1297-1302.
- VO-DINH, T., GAMMAGE, R.B. y MARTÍNEZ, P.R. (1981). *Anal. Chem.*, 53, 253.
- VO-DINH, T. y MARTÍNEZ, P.R. (1981). *Analytical Chimica Acta*, 125, 13.
- WAKEMAN, S.G. (1977). *Environ. Sci. Technol.*, 11, 272.
- WARD, J.L., WALDEN, G.L. y WINEFORDNER, J. D. (1981). *Talanta*, 28, 201.
- WEIJUN, J. y CHANGSONG, L. (1993a). "Study on five polycyclic aromatic hydrocarbons by chemical deoxygenation micelle-stabilized room-temperature phosphorimetry". *Microchemical Journal*, 48, 94-103.
- WEIJUN, J. y CHANGSONG, L. (1993b). "Luminiscence rule of polycyclic aromatic hydrocarbons in micelle-stabilized room-temperature phosphorescence". *Anal. Chem.*, 65, 863-865.
- WEIJUN, J., YANSHENG, W., WENSHENG, D., CHANGSONG, L. y SUSHE, Z. (1994). "Study of naphthalene and phenanthrene by microemulsion room-temperature phosphorimetry". *Analytica Chimica Acta*, 287, 95-100.
- WEIL, C. S. y col. (1972). "Current status of tests of carbaryl for reproductive and teratogenic effect". *Tox. and Appl. Pharmacol.*, 21, 390.
- WEIL, C. S. y col. (1973). "Studies on rat reproduction and guinea pig teratology of carbaryl fed either in the diet or by stomach". *Tox. and Appl. Pharmacol.*, 26, 621.
- WEINBERGER R., YARMCHUK P. y CLINE LOVE L. J. (1982). "Liquid chromatographic phosphorescence detection with micellar chromatography and postcolumn reaction modes". *Anal. Chem.*, 54, 1552.
- WENDLANDT, W.W. y HECHT, H.G. (1966). "Reflectance spectroscopy". Wiley, New York.

- WEYER, L. G. (1974). "GLC method for the analysis of carbaryl insecticide formulations". *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 57, 648.
- WHERY, E.L. (1976-1984). "Modern fluorescence spectroscopy". Tomos I y II (1976). Tomos III y IV (1984). Plenum Press. Nueva York.
- WHERY, E.L. (1982). *Anal. Chem.*, 54, 131R.
- WHERY, E.L. (1984). *Anal. Chem.*, 56, 156R.
- WIEDEMANN E. (1888). *Ann. Physik. (Leipzig)*, 34, 446.
- WINEFORDNER, J.D. (1988). "Trace analysis. Spectroscopic methods for elements". Wiley, Nueva York.
- WINEFORDNER, J.D. y LATZ, H.W. (1963). *Anal. Chem.*, 35, 1517.
- WINEFORDNER, J.D., SCHULMAN, S.G. y O´HAVER, T.C. (1972) "Luminiscence spectrometry in analytical chemistry". Wiley, Nueva York.
- WOLF, T. (1981a). *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 85, 145.
- WOLF, T. (1981b). *J. Colloid. Interfase Sci.*, 83, 658.
- WUEEST, O. y MEIER, W. (1983). "Determination of seven carbamate insecticides on fruits and vegetables by capillary gas chromatography and thermionic detection". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 177(1), 25.
- YAMADA, S. (1992). *Anal. Chim. Acta*, 264, 1.
- YANSHENG, W., WEIJUN, J., ROHUA, Z., CHANGSONG, L. y SUSHE, Z. (1994). "Determination of the pesticide carbaryl by chemical deoxygenation micellar-stabilized room-temperature phosphorescence". *Talanta*, 41(10), 1617-1621.
- YAO QUN, L., XIAN ZHI, H., JIN GOU, X. y GUO ZHEN, C. (1991a). "Rapid simultaneous determination of vitamin B₂ and vitamin B₆ by variable-angle synchronous spectrofluorimetry". *Fenxi Huaxue*, 19(5), 538-541.
- YAO QUN, L., XIAN ZHI, H., JIN GOU, X. y GUO ZHEN, C. (1991b). "Reverse variable-angle synchronous spectrofluorimetry for rapid simultaneous determination of chlorophyll A and chlorophyll B". *Chinese Chemical Letters*, 2(1), 23-26.
- YAO QUN, L., XIAN ZHI, H., JIN GOU, X. y GUO ZHEN, C. (1992). "Derivative constant-energy synchronous fluorescence for simultaneous analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons mixtures". *Analytica Chimica Acta*, 256, 285-291.

- YAO QUN, L., DAN QUN, C., XIAN ZHI, H. y JIN GOU, X. (1993). "Variable-angle synchronous spectrofluorimetry for rapid simultaneous determination of phenol and aniline". *Fenxi Huaxue*, 21(12), 1420-1422.
- YARMCHUK, P., WEINBERGER, R., HIRSCH, R.F. y CLINE LOVE, L.J. (1982). *Anal. Chem.*, 54, 2233.
- YARMCHUK, P., WEINBERGER, R., HIRSCH, R.F. y CLINE LOVE, L.J. (1984). *J. Chromatogr.*, 283, 47.
- YASUDA, Y., WATANABE, N., HAYAKAWA, T., YAMADA, M., YAMAZAKI, K. y FUNASAKA, R. (1990). "Simple and rapid determination of 1-naphthyl-N-methylcarbamate (carbaryl) in river water by HPLC (high-performance liquid chromatography)". *Suishitsu Odaku Kankyu*, 13(3), 189-192.
- YAÑEZ-SEDENO, P., NOVA NOVA, C. y POLO DÍEZ, L.M. (1988). "Spectrophotometric determination of carbaryl by flow-injection analysis". *Microchem. J.*, 38(13), 370-375.
- YOSHIDA, T., TANIGUCHI, H., OTUKA, S. y NAKANO, S. (1989). "Fluorimetric determination of 1-naphthol and carbaryl with 3-aminoquinoline-2(1H)-thione". *Chem. Pharm. Bull.*, 37(7), 1823-1826.
- YOUNG, H.Y., SHIMABUKURO, S. y AONO, L. (1963). "Spectrophotometric microdetermination of 1-naphthylacetic acid in pineapple". *Agr. and Food Chem.*, 11(2), 133.
- ZANDER, M. (1968). "Phosphorimetry, the application of phosphorescence to the analysis of organic compounds". Academic Press, New York.
- ZHANG, X., LIN, C., HE, T., HE, L. y VIN, F. (1989). "Simultaneous determination of 1-naphthol and 2-naphthol by reserved-phase high-performance liquid chromatography". *Huaxue Shiji*, 11(3), 129-131.
- ZWEIG, G., ARCHER, T.E. y RAZ, D. (1962). "Residue determination of naphthalenacetic acid and its methyl ester in potatoes by a combination of gas chromatography and ultravioletic spectrophotometry". *Agr. Food Chem.*, 10(3), 199.
- ZWEIG, G., GUTNICK, D.L., GULLI, R., ARCHER, T.E. y HANTMANN, H.T. (1964). "Residue determination of naphthalenacetic acid in olives". *Agr. and Food Chem.*, 12(1), 59.
- ZWEIG, G. y HARVEY, J. Jr. (1980). "Pesticide Analytical Methodology". ACS Symposium Series 136, American Chemical Society, Washington, D. C..