

V.4. ESTUDIO DE LAS RENDIJAS DE EXCITACION Y EMISION

Para comprobar la influencia que ejerce la anchura de la rendija de excitación y emisión sobre la intensidad de fluorescencia, se preparó una muestra que contenía 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada hasta 500 mL.

Se transfirió a un frasco de polietileno y se añadieron 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH = 5.00 y 100 mg de resina SP C-25.

Tras agitar durante 15 minutos, filtrar y llenar la cubeta se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5, 5, 10 y 15 nm y rendija de emisión de 2.5 y 5 nm (pues para anchuras superiores se satura el fotomultiplicador), factor de sensibilidad 0.5 y temperatura 20°C .

En la tabla V.4 se indican los resultados obtenidos que se representan en la figura V.5.

Tabla V.4. Anchura de las rendijas

$\Gamma_{em} = 2.5 \text{ nm}$		$\Gamma_{em} = 5 \text{ nm}$	
Γ_{exc} (nm)	%IFR	Γ_{exc} (nm)	%IFR
2.5	71.6	2.5	259.4
5	59.2	5	215.3
10	36.8	10	137.0
15	28.8	15	112.5

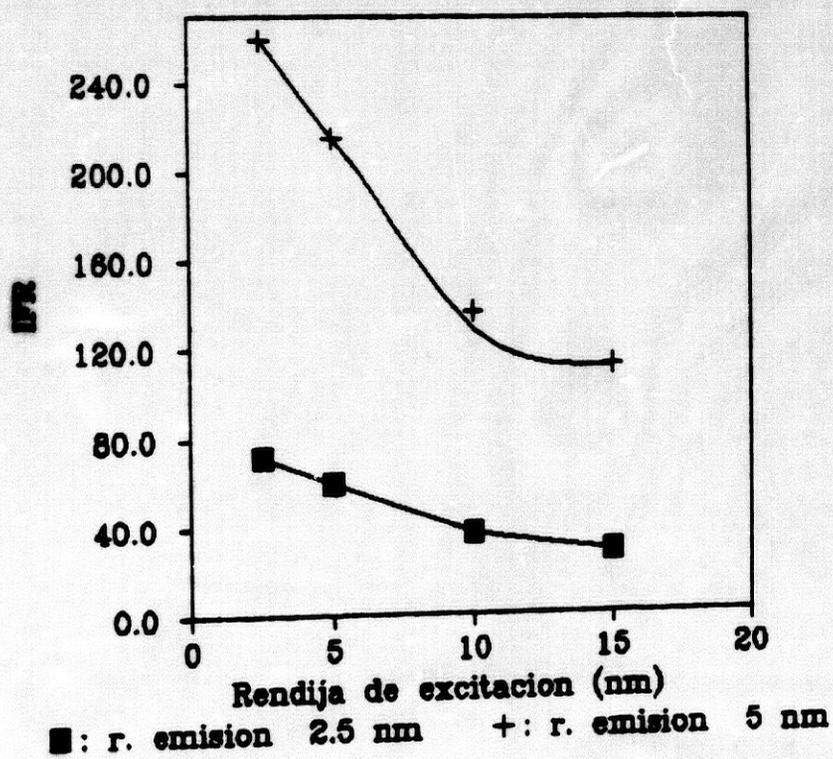


Figura V.5. Influencia de las rendijas de excitación y emisión sobre la intensidad de luminiscencia

Se observa en la figura anterior, que:

- 1) Al variar las rendijas de excitación, se observa que al aumentar ésta, disminuye la intensidad de luminiscencia.
- 2) Al variar las rendijas de emisión, se observa que al aumentar ésta, aumenta notablemente la intensidad de luminiscencia.

Este comportamiento, que está de acuerdo con las previsiones teóricas (26,167), así como con los resultados obtenidos en el sistema Be(II)-morina-QAE, nos induce a fijar en 2.5 nm la anchura de la rendija de excitación, valor que al mismo tiempo que origina la máxima señal de fluorescencia, posee menor ancho de banda y, por tanto, menor dispersión de la radiación luminiscente emitida. Por esta última razón, la rendija de emisión se fijó en 2.5 nm aunque el valor de la señal luminiscente medida sea el más bajo.

V.5. CARACTERISTICAS ESPECTRALES

V.5.1. Espectros de fluorescencia total del complejo Al(III)-morina en fase resina Sephadex SP C-25

Como ya se ha indicado en el Capítulo III, la obtención de los espectros de fluorescencia total ha sido posible gracias a la comunicación establecida entre el espectrofluorímetro y un ordenador, al empleo de un programa de recogida y tratamiento de datos (FLUOFACK) y a un programa de representación tridimensional (GOLDEN SOFTWARE). Las características de ambos programas han sido descritas con anterioridad en el Capítulo III.

Para la obtención de los espectros de fluorescencia total del sistema morina-Al(III) en fase resina se preparó un matraz aforado de 500 mL en el que se introdujeron 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada.

Se transvasó a una botella de polietileno y se añadieron 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M), que es el tampón más ampliamente empleado en disolución (46), de pH = 5.00 que es la zona de pH idónea según se deduce del estudio cualitativo previo (pag 88). Asimismo se añadieron 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

Analogamente se introdujeron 500 mL de agua bidestilada en otra botella de polietileno añadiéndose los mismos volúmenes de reactivos indicados anteriormente.

Después de una agitación de 15 minutos, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se procedió a registrar los espectros en las siguientes condiciones: intervalo de emisión entre 450 y 550 nm; intervalo de excitación entre 350 y 450 nm variando de 2 en 2 nm para cada barrido de emisión (pues el programa Fluopack realiza 50 barridos), rendijas de excitación y emisión 2.5 nm y factor de sensibilidad 0.1.

Los espectros obtenidos de la muestra y el blanco se representaron haciendo uso del programa Golden ya comentado en el Capítulo III. Los resultados se muestran en la figura V.6.

Como puede observarse en la figura V.6 indicada, debido a los intervalos de longitudes de onda empleados para la excitación y emisión, aparece la línea Rayleigh en aquellos casos en que coinciden ambas longitudes de onda (es decir las posiciones de los monocromadores). Los elevados valores de esta intensidad Rayleigh determinan que, por razones puramente de escala, la intensidad de emisión fluorescente del sistema Sephadex SP-mcrina-A (III) aparezca algo atenuada.

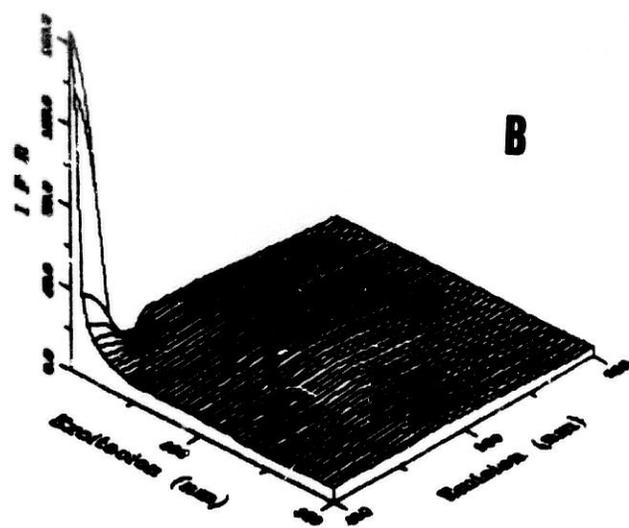
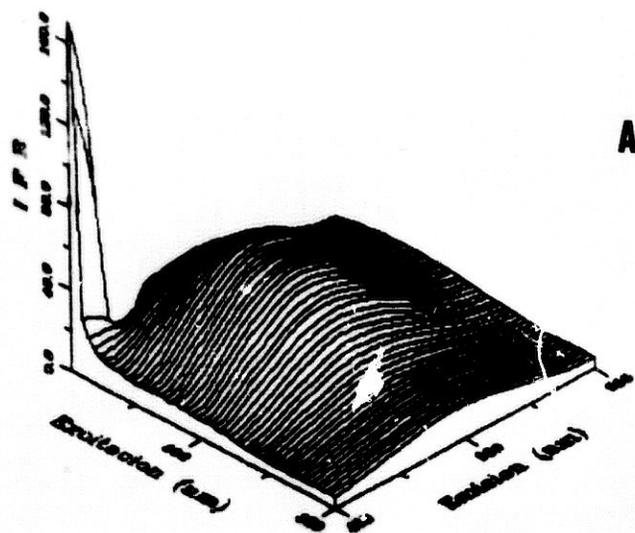


Figura V.6. Espectros tridimensionales de la muestra (A) y del blanco (B)

V.5.2. Espectros diferencia

Con objeto de hacer desaparecer la línea Rayleigh de la representación y obtener el espectro de luminiscencia total del sistema, se restó, utilizando la opción correspondiente del programa Fluopack, el espectro del blanco al del sistema y el espectro resultante se representa con distintas vistas (figuras V.7 y V.8) por rotación alrededor del eje Z.

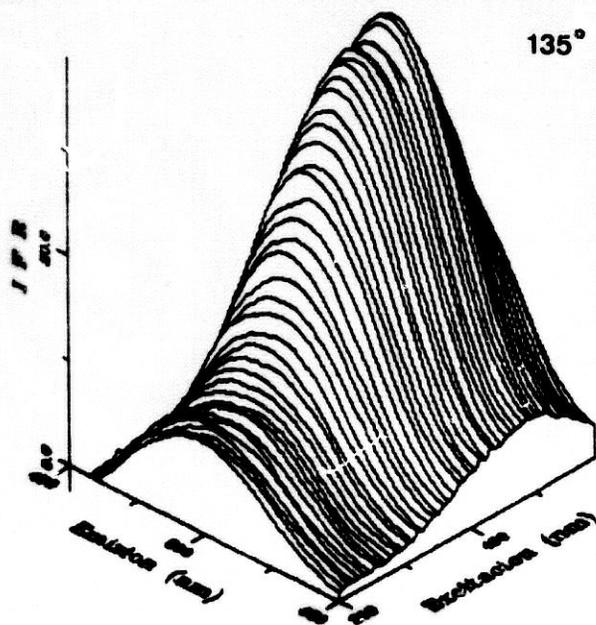
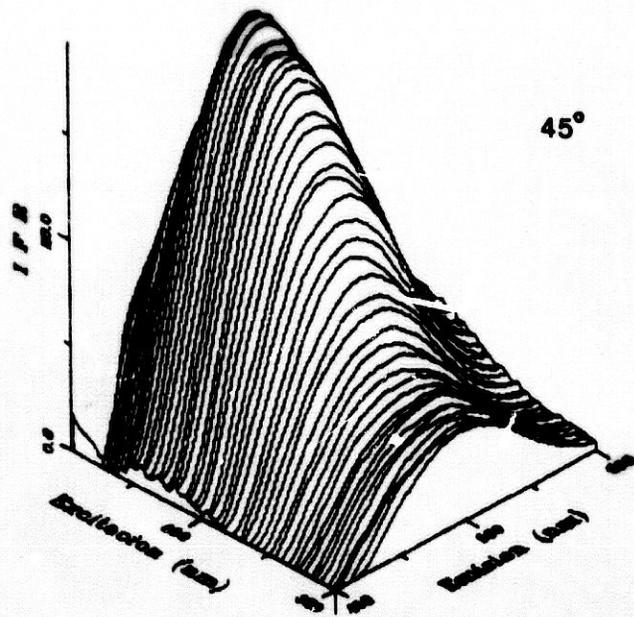


Figura V.7. Espectro de luminiscencia total del sistema visto según diferentes ángulos de rotación alrededor del eje Z.

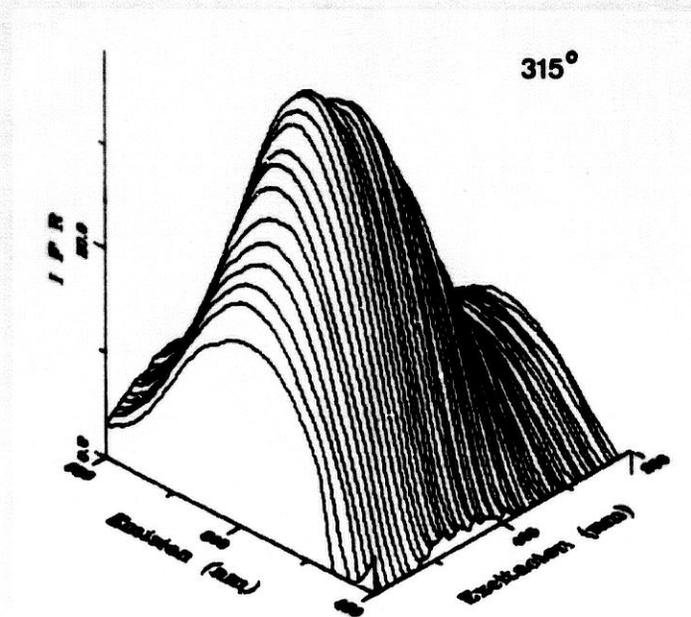
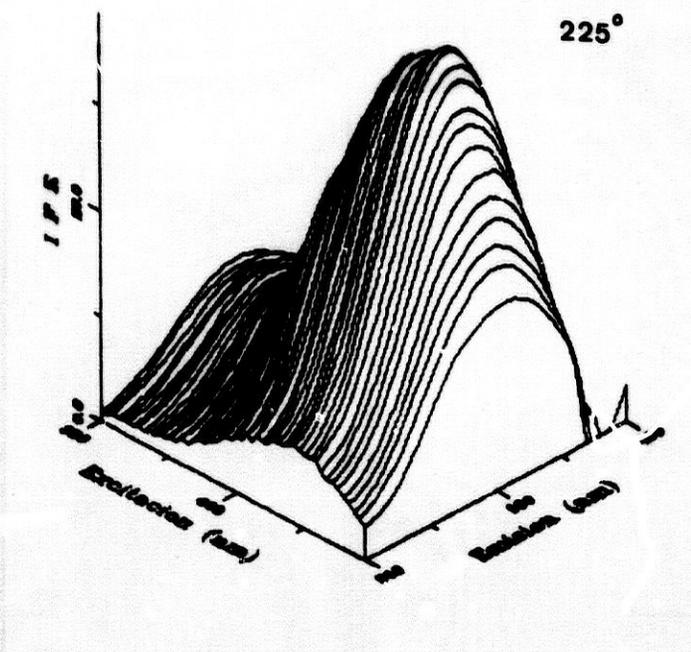


Figura V.8. Espectro de luminiscencia total del sistema visto según diferentes ángulos de rotación alrededor del eje Z

V.5.3. Curvas de nivel

En las figuras V.9 y V.10, se representan los topogramas del sistema morina-Al, del blanco de morina y de la diferencia. Como puede observarse los dos ejes normales representan las longitudes de onda de excitación y de emisión mientras que las intensidades se expresan con una serie de curvas de nivel.

Este complejo presenta un máximo de emisión a 496 nm y un máximo a una longitud de onda de excitación de 426 nm.

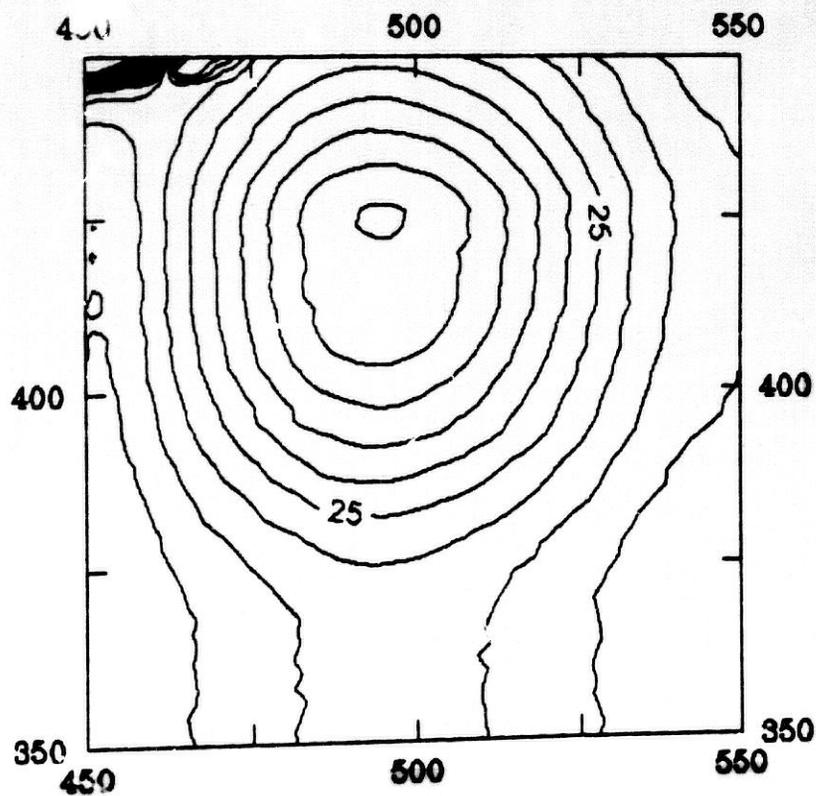
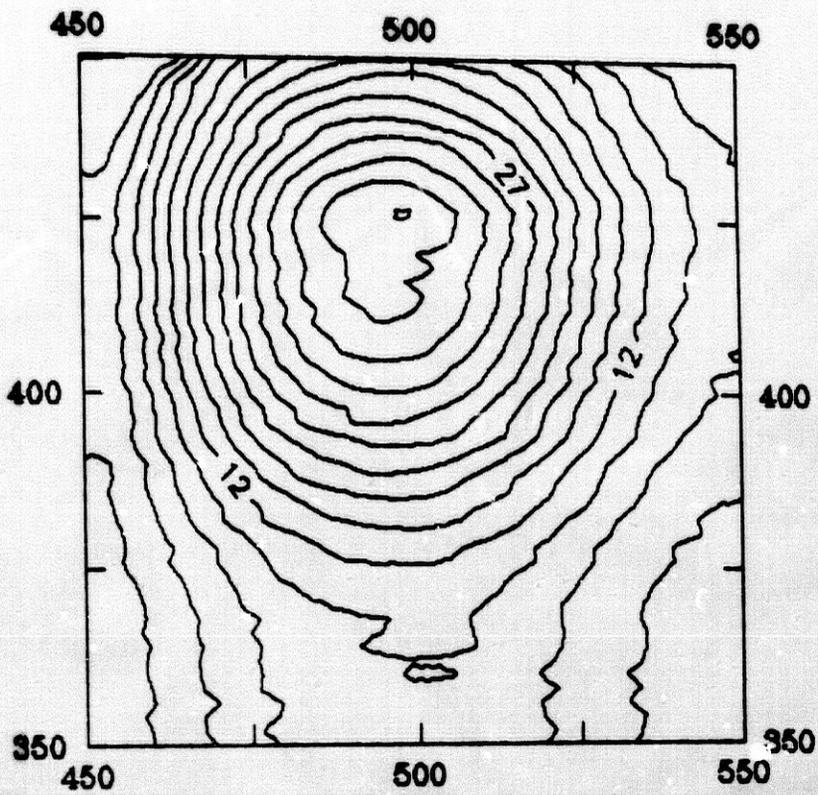
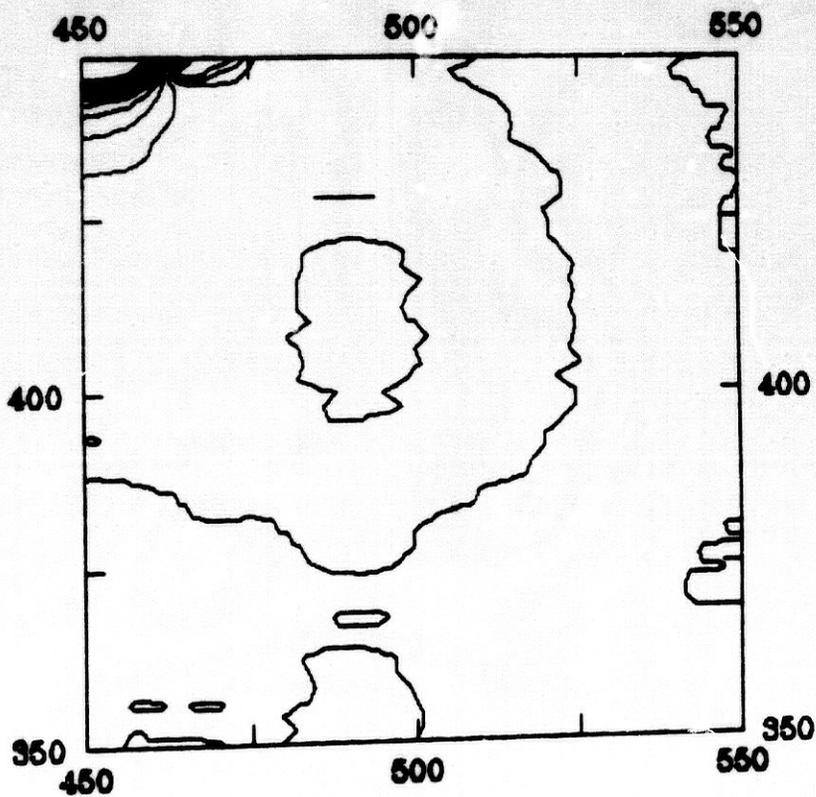


Figura V.9. Topograma del sistema SP C.25-morina-Al(III)



A



B

Figura V.10. Topogramas de la diferencia del sistema SP C.25-
morina-Al(III) y el blanco (a) y del blanco (b).

V.5.4. Espectros bidimensionales en fase resina

El espectro de luminiscencia total, como se ha indicado anteriormente, nos permite tener una visión global del comportamiento fluorescente del sistema y poder elegir las características espectrales óptimas representando, mediante la opción correspondiente del programa utilizado, los espectros de excitación y emisión más intensos del conjunto. En nuestro caso según se observa en la figura anterior esto coincide con el espectro de excitación y emisión que se representa en la figura V.11.

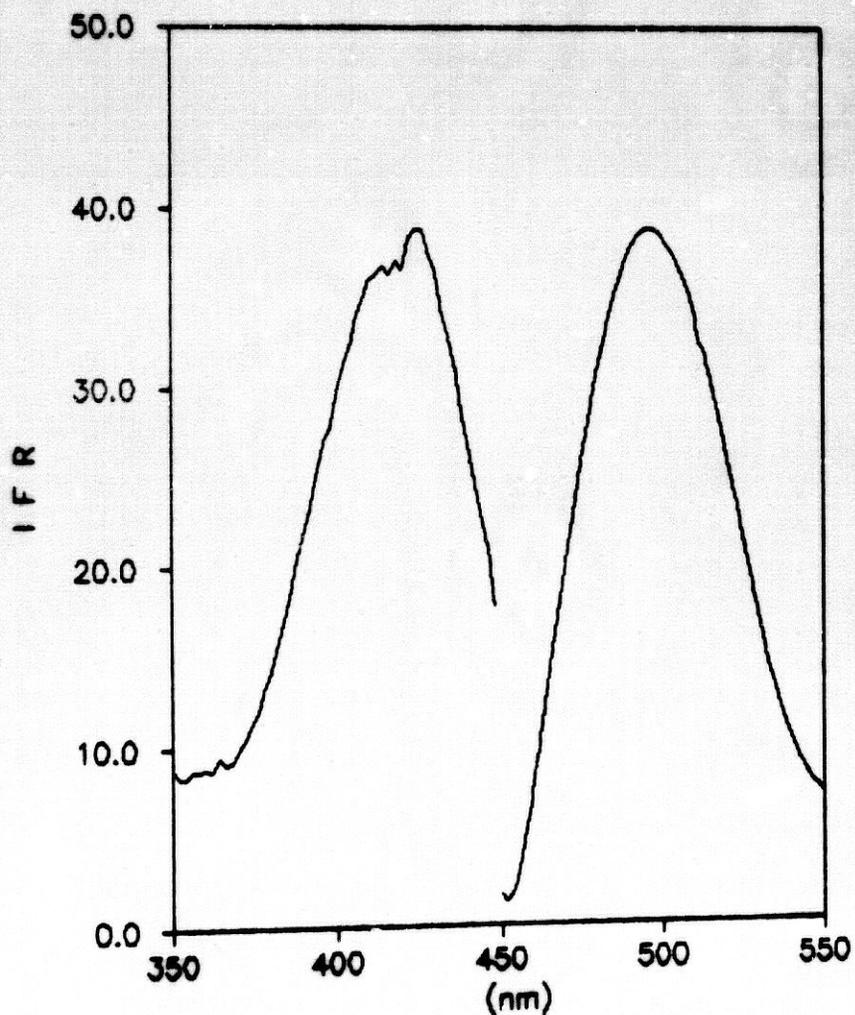


Figura V.11. Espectros de excitación y emisión del sistema SP-morina-Al(III)

V.5.5. Espectros bidimensionales en disolución

Con objeto de estudiar las variaciones que en sus características espectrales pueda sufrir el sistema como consecuencia de su fijación en el gel se han obtenido también los espectros de excitación y emisión del sistema morina-Al(III) en disolución.

Se han establecido los espectros de excitación y emisión del sistema morina-Al(III) en disolución. Para ello, en un matraz aforado de 50 mL se introdujeron 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} , 2 mL de disolución etanólica de morina al $1.2 \times 10^{-3}\%$, 1 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de $\text{pH} = 5.00$ y agua bidestilada hasta el enrase. Se preparó asimismo un blanco que no contenía aluminio.

Las longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión se han obtenido realizando un "pre-scan" secuencial de excitación y emisión, lo que nos permite conocer las longitudes de onda de dichos máximos. Se obtuvieron valores para la longitud de onda de excitación y emisión hasta conseguir una pareja de valores que se repitiera un número de veces representativo.

La figura V.12 muestra los espectros obtenidos. De su observación puede deducirse que el espectro de excitación presenta un máximo a la longitud de onda de 431 nm, mientras que el de emisión tiene un máximo a una longitud de onda de 512 nm, por lo que representa un desplazamiento Stokes de 3670.61 cm^{-1} .

Las condiciones operatorias para el registro de los espectros fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 431 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 6.0 y temperatura 20°C .

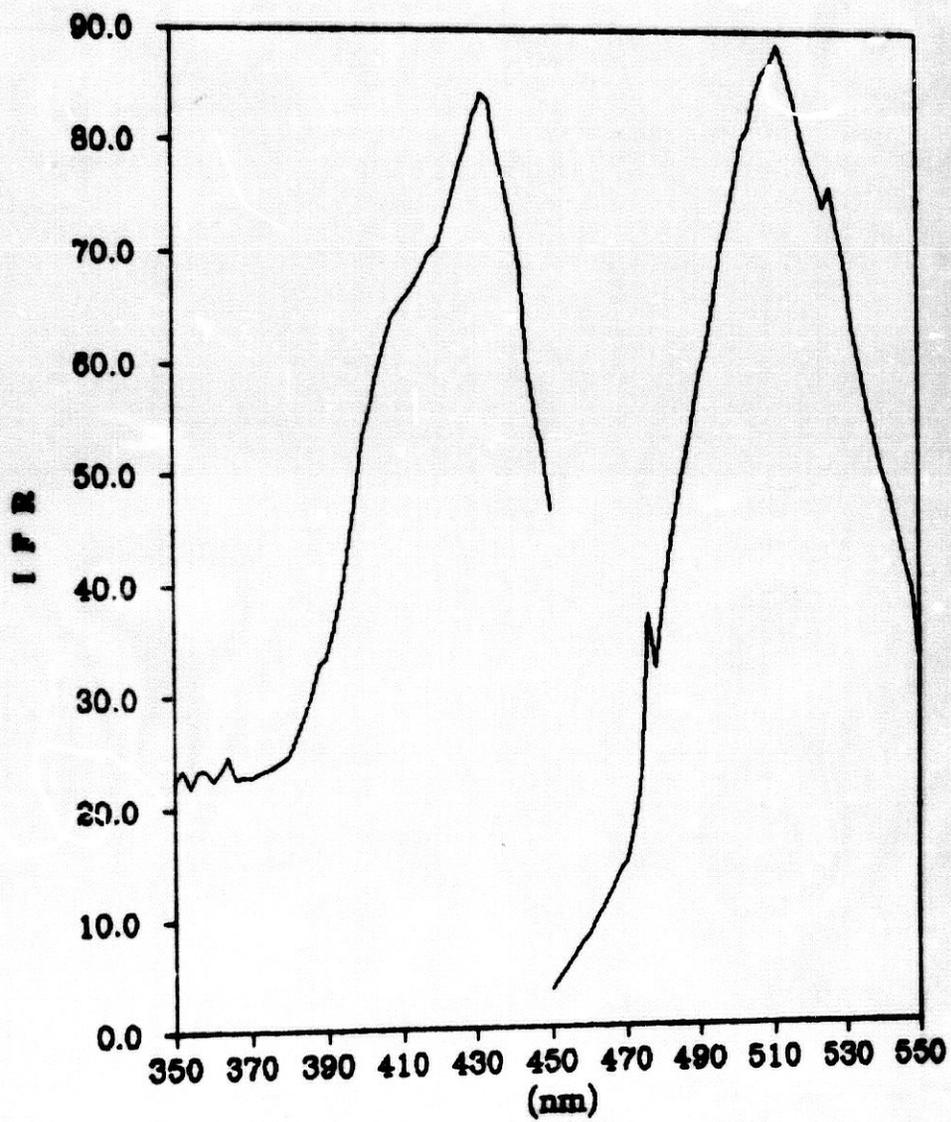


Figura V.12. Espectros de excitación y emisión del sistema morina-Al(III) en disolución

La comparación de las anteriores figuras V.11 y V.12, donde se muestran los espectros de excitación y emisión del sistema morina-Al(III) en disolución y en fase resina, nos permite afirmar que:

- 1) Las longitudes de onda de los máximos de emisión son diferentes para el sistema en disolución y en fase resina (512 y 496 nm).
- 2) La longitud de onda del máximo del espectro de excitación en fase resina ($\lambda_{exc} = 426$ nm) sufre un ligero desplazamiento hacia longitudes de onda menores respecto a la observada en disolución ($\lambda_{exc} = 431$ nm).
- 3) La modificación del ambiente que rodea al complejo en fase resina con respecto a disolución, determina probablemente la modificación del espectro de fluorescencia. La principal diferencia entre el aspecto de los espectros de ambos sistemas es la mejor resolución del espectro en fase resina y la menor anchura de pico que caracteriza el espectro en disolución.

Un efecto similar se observó en el sistema Be(II)-morina fijado en Sephadex QAE A-25 (Capítulo IV), y en el complejo Al(III)-morina inmovilizado en celulosa (198).

Según la bibliografía consultada, el complejo estudiado en disolución por Will (34), presenta una longitud de onda de excitación y de emisión (440 y 525 nm, respectivamente) similares a las encontradas por nosotros en el estudio comparativo realizado en disolución.

En algunos trabajos publicados acerca del complejo Al(III)-morina se observa alguna modificación con respecto a los valores obtenidos en disolución; las longitudes de onda encontradas son parecidas a las del sistema Al(III)-morina-SP C.25. Así, para el complejo extraído en metilisobutilcetona (73) las longitudes de onda son $\lambda_{exc} = 418$ nm y $\lambda_{em} = 495$ nm, el complejo con agente surfactante (127) presenta una $\lambda_{exc} = 430$ nm y $\lambda_{em} = 495$ nm y en el caso del complejo inmovilizado sobre celulosa (198) la $\lambda_{exc} = 420$ nm y $\lambda_{em} = 488$ nm. Estos datos se resumen en la tabla V.5.

Tabla V.5. Longitudes de onda del sistema Al(III)-morina en disolución y en fase sólida

procedimiento	longitud de onda (nm)		referencia
	excitación	emisión	
disolución (pH = 3.0)	440	525	(34)
disolución (pH = 5.3)	431	512	ésta Memoria
extracción en MIBK	418	495	(73)
agente surfactante	430	495	(127)
fijado sobre celulosa	420	488	(198)
fijado en Sephadex SP	426	496	ésta Memoria

V.6. DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DEL ESTADO EXCITADO

Para éste estudio se han seguido las consideraciones expuestas con anterioridad en ésta Memoria Doctoral (Capítulo IV).

La determinación del tiempo de vida media del estado excitado la hemos realizado a una única temperatura (20°C).

La muestra se ha preparado operando sobre una disolución que en un volumen final de 500 mL, contenía 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L⁻¹ y agua bidestilada hasta el enrase.

Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno y se añadieron 1.2 mL de disolución etanólica de morina 6.2x10⁻³%, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.00 y 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

Tras agitar durante 15 minutos, se filtró la disolución, transfiriéndose la resina a la cubeta de 1 mm de espesor.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, rendija de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.3 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla V.6 y se han representado graficamente en la figura V.13.

Tabla V 6. Tiempo de vida media

$t \times 10^3$ (s)	IFR (%)	Ln IFR
0.01	316.55	5.76
0.02	27.30	3.31
0.03	2.20	0.79

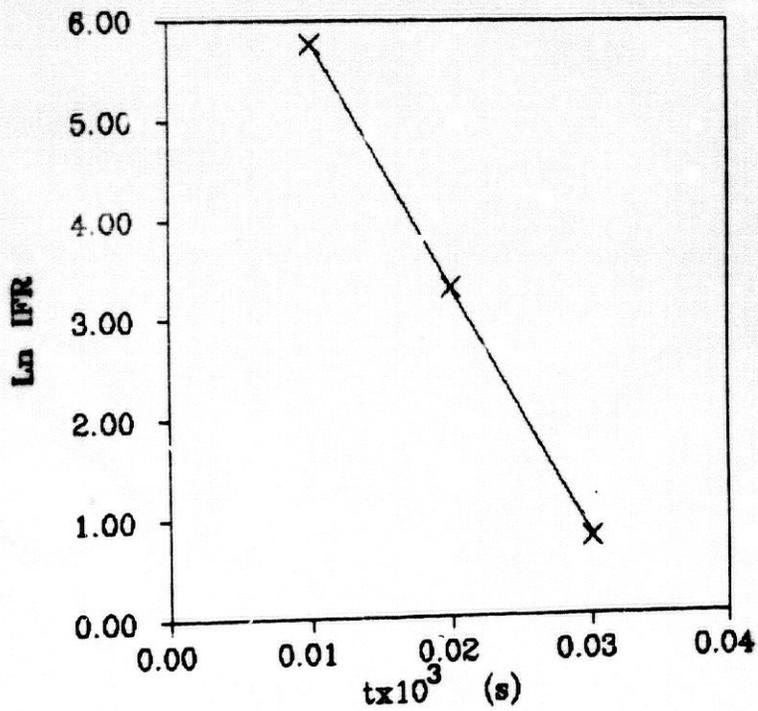


Figura V.13. Tiempo de vida media del estado excitado

De la anterior figura se deduce un valor del tiempo de vida media, $\tau = 4.02 \times 10^{-6}$ s.

Dado que, según datos determinados con anterioridad (29), la vida media de la caída del pulso de la lámpara de xénon es de éste orden de magnitud, lo único que podemos afirmar en ésta experiencia es que el tiempo de vida media del proceso luminiscente es inferior a 5×10^{-6} s. Esto nos hace pensar que, a la temperatura de trabajo (20°C), se trate de un proceso de fluorescencia y no de fosforescencia.

OPTIMIZACION DE VARIABLES

V.7.1. INFLUENCIA DE LA ACIDEZ

Se ha estudiado la influencia que la acidez produce sobre el complejo morina-Al(III) en fase resina, para lo cual se ha seguido el siguiente método operatorio.

Se preparó una serie de disoluciones que contenían todas ellas 1 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta un volumen final de 500 mL.

Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se añadieron las cantidades de NaOH y HCl necesarias hasta lograr el pH deseado. Se añadieron a continuación 2 mL de disolución etanólica de morina al 0.02 % y 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se han preparado los blancos correspondientes, que fueron sometidos al mismo tratamiento que la muestra.

Tras agitar durante 30 minutos, tiempo fijado arbitrariamente, se filtró la disolución y se introdujo la resina en la cubeta de medida con la ayuda de una pipeta.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.2 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla V.7 y se han representado gráficamente en la figura V.14.

Tabla V.7. Influencia del pH

pH	%IFR _(F)	%IFR _(CB)	ΔIFR(%)
1.40	22.0	22.0	0.0
2.09	22.0	22.0	0.0
3.50	22.6	22.1	0.5
4.03	38.0	22.2	15.8
4.45	55.4	24.0	31.4
4.73	64.2	22.0	42.2
5.42	67.1	22.1	45.0
6.05	66.6	22.8	43.8
6.35	53.2	21.8	31.4
6.52	22.4	21.2	1.2

La observación de la figura V.14 nos muestra un intervalo de pH comprendido entre 4.70 y 6.00 que es óptimo para la formación y fijación del complejo. Para valores de pH inferiores a 3.50 o superiores a 6.60 el complejo no se forma y/o no se fija en el cambiador iónico.

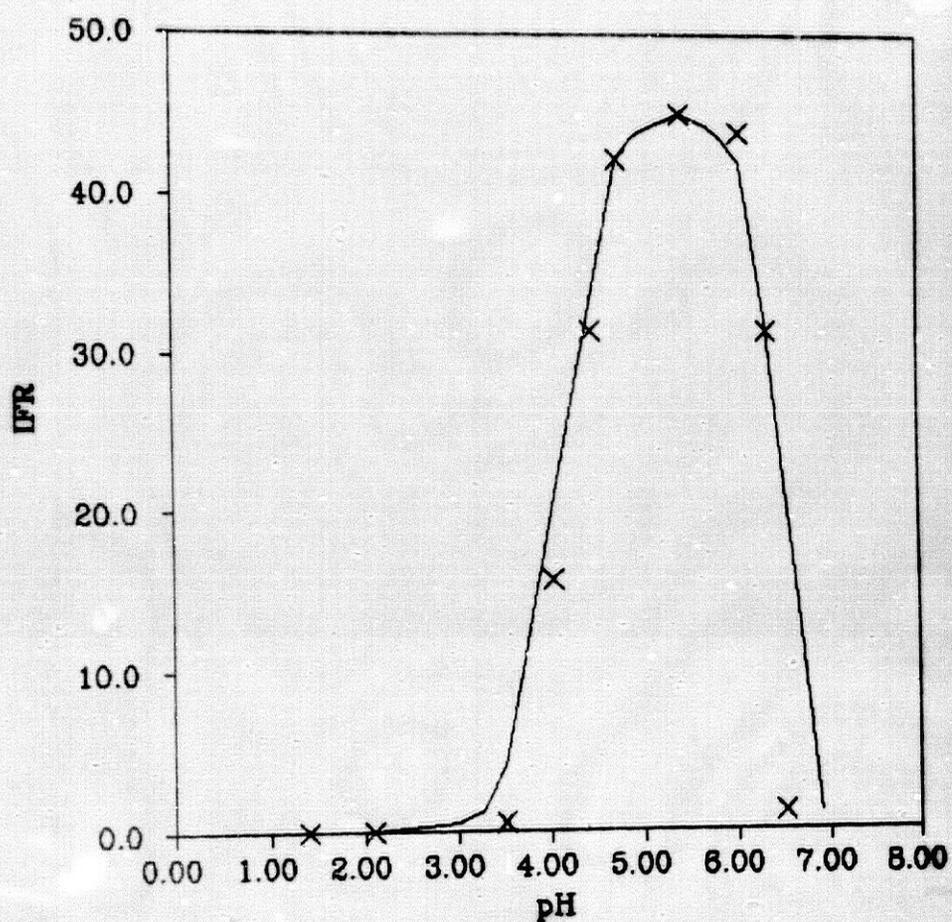


Figura V.14. Influencia de la acidez

La forma de la curva representada en la figura V.14, es similar a la observada en la bibliografía en el estudio del complejo Al(III)-morina al que se añade un agente surfactante (127) aunque en éste caso la diferencia máxima entre la fluorescencia del sistema y el blanco se obtiene a un pH comprendido entre 3.5 y 4.0. Emplean disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH 3.8 para ajustarlo.

Se observa asimismo, que la intensidad de fluorescencia del blanco en nuestro estudio, permanece constante en el rango de pH estudiado, comprendido entre 1.40 y 6.50. Sin embargo, *Medina Escriche y col* (127), observan una dependencia de la intensidad de fluorescencia de los blancos de morina-agente surfactante con el pH. Para un pH comprendido entre 1.0 y 3.0 apenas hay señal, pero esta se incrementa a partir de éste pH y se hace máxima a pH entre 4.0 y 5.0, a partir del cual comienza a descender la intensidad de fluorescencia hasta que a pH 6.0 la medida es mínima.

Un estudio del complejo Al(III)-morina extraído en metilisobutilcetona (73) en función del pH, indica que el máximo de fluorescencia se obtiene a un pH comprendido entre 2 y 3. No obstante, un estudio de la variación de la señal de fluorescencia en función del tiempo a distintos valores de pH, nos muestra que para valores inferiores a 3.5, la fluorescencia del complejo es muy inestable. Se observa que a partir de un pH de 3.5, ajustado con una disolución reguladora de HCl/KCl la intensidad de fluorescencia es constante a partir de 1 hora. Aunque el máximo de fluorescencia se obtiene en el intervalo de pH 2-3, la inestabilidad del sistema es la razón por la que se emplea como pH de trabajo un valor algo superior.

Es de resaltar que el intervalo de pH óptimo en fase resina sufre un desplazamiento hacia valores superiores con respecto al intervalo encontrado por los diferentes autores (34,73,75,127,198,200-202) para el mismo sistema en disolución y que está comprendido entre 3 y 4.

En la tabla V.8 se indica de forma comparativa el pH óptimo del complejo Al(III)-morina, según el procedimiento y condiciones empleado, así como la disolución reguladora utilizada en cada caso.

Tabla V.8

<i>procedimiento</i>	<i>pH óptimo</i>	<i>disolución reguladora</i>	<i>referencia</i>
agente surfactante	3.8	AcH/AcNa	(127)
extracción en MIBK	3.7-3.8	HCl/KCl	(73)
disolución	3.3	AcH	(75)
disolución	3.0±0.3	AcH	(34)
fijado en SP C-25	5.30	AcH/AcNa	ésta Memoria

V.7.1.1. Elección de la disolución reguladora

Una vez puesto de manifiesto la influencia del pH y dada la necesidad de ajustar éste en la zona óptima, es necesario seleccionar el tampón más conveniente para ello así como su valor de pH más adecuado mediante el empleo de esta disolución reguladora. Se han seleccionado para su estudio aquellas consideradas más adecuadas en el rango de pH observado como óptimo para la fijación del complejo, esto es, ácido acético/acetato sódico, ácido ftálico/hidrógeno ftalato y ácido monocloroacético/monocloroacetato sódico.

Para dilucidar cual de ellas es más conveniente para el sistema en estudio, se prepararon tres series de disoluciones que en un volumen final de 500 mL contenían 1 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L⁻¹ y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 2 mL de disolución etanólica de

morina al 0.02 %, 10 mL de la disolución reguladora escogida en cada caso y 100 mg de resina SP C-25.

Los correspondientes blancos para cada disolución reguladora se trataron igual que la muestra.

Tras 30 minutos de agitación, se filtraron las disoluciones y realizaron las medidas de la intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron, en todos los casos: $\lambda_{exc} = 426$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, rendijas de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.2 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.9, y se han representado graficamente en la figura V.15.

Tabla V.9. Influencia del pH

Tampón ácido acético/acetato sódico

pH	%IFR _(E)	%IFR _(B)	Δ IFR(%)
3.96	46.0	22.0	24.0
4.20	60.0	21.8	38.2
4.52	73.9	23.1	50.8
4.80	77.4	22.4	55.0
5.33	80.7	22.9	57.8
5.90	79.3	22.9	56.4
6.20	64.0	22.0	42.0
6.39	48.5	22.0	26.5

Tampón ácido ftálico/hidrógeno ftalato

pH	%IFR _(F)	%IFR _(B)	ΔIFR(%)
3.26	50.4	21.8	28.6
4.08	51.3	21.5	29.8
4.48	52.5	22.0	30.5
5.03	54.5	22.0	32.5
5.47	55.6	22.3	33.3
5.83	53.6	21.8	31.8
6.12	50.5	21.7	28.8

Tampón monocloroacético/monocloroacetato sódico

pH	%IFR _(F)	%IFR _(B)	ΔIFR(%)
3.32	61.0	21.8	39.2
4.14	74.1	21.8	52.3
4.70	76.5	22.3	54.2
5.24	76.9	22.0	54.9
5.74	75.0	22.3	52.7
6.04	71.4	21.9	49.5
6.59	65.7	21.9	43.8

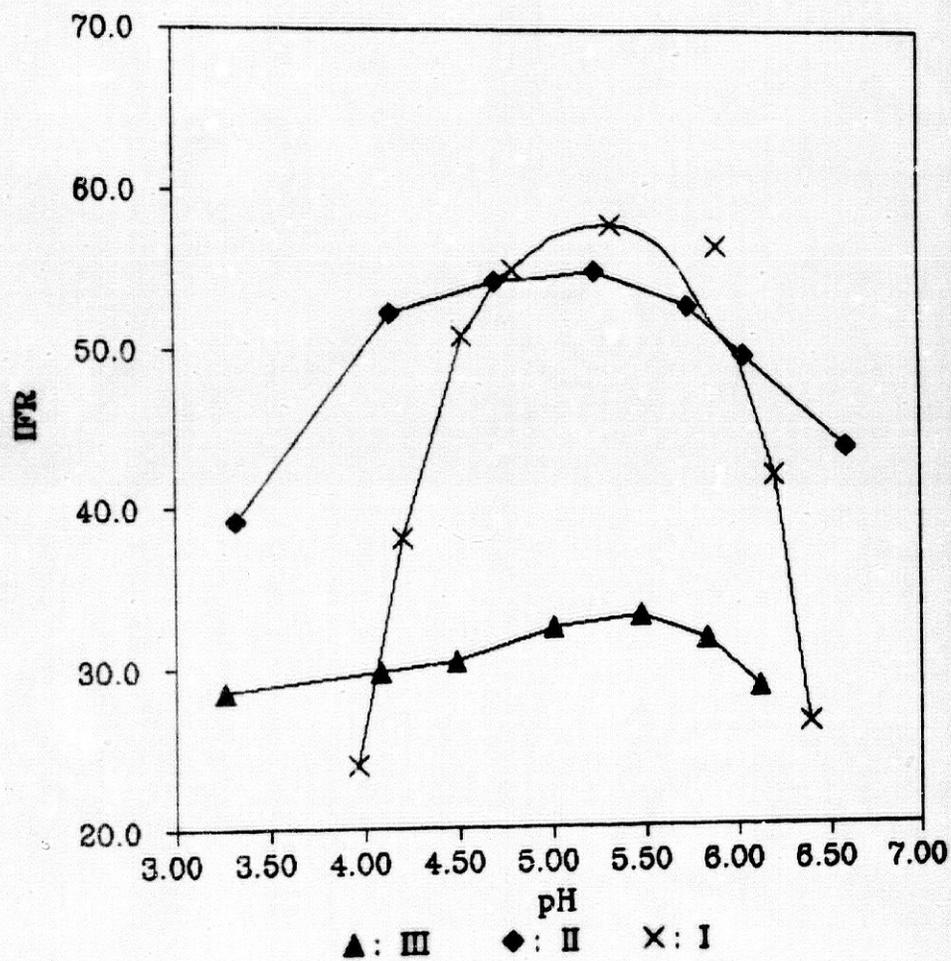


Figura V.15. Influencia del pH con diversas disoluciones reguladoras

- (I) *Tampón ácido acético/acetato sódico*
- (II) *Tampón monocloraacético/monocloraacetato sódico*
- (III) *Tampón ácido ftálico/hidrógeno ftalato*

De la observación de la figura V.15, donde se representa la intensidad de fluorescencia en función del pH empleando las disoluciones reguladoras: ácido acético/acetato sódico, ácido ftálico/hidrógeno ftalato potásico y ácido monoclora-acético/monocloraacetato sódico, puede deducirse:

- Los tres tampones presentan cualitativamente un intervalo de influencia similar centrado alrededor de 5.3, decreciendo la intensidad de fluorescencia relativa tanto para valores superiores como inferiores de pH.
- El tampón ácido acético/acetato sódico, cuyo comportamiento es el que más se asemeja al de la disolución sin tamponar, produce los valores mayores en la intensidad de fluorescencia relativa para esta misma zona de pH. Por éstas razones hemos seleccionado la disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) para posteriores experiencias, a un pH de 5.30.

V.7.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LA DISOLUCION REGULADORA

Una vez establecido el pH óptimo y la disolución reguladora más adecuada para el sistema, se ha estudiado la influencia que la concentración de ésta ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del complejo morina-Al(III) en fase resina

Para ello se preparó una serie de disoluciones que, en un volumen final de 500 mL, contenían 1 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Las disoluciones se trasvasaron a sus correspondientes frascos de polietileno a cada uno de los cuales se le añadieron 2 mL de disolución etanólica de morina 0.02 %, volúmenes crecientes de disolución reguladora ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

Tras agitar durante 30 minutos y procediendo de forma habitual, se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.2 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.10 y se han representado graficamente en la figura V.16.

Tabla V.10. Influencia de la disolución reguladora

Vol. Tampón (mL)	pH	%IFR
2	5.03	74.4
5	5.16	76.7
8	5.27	80.0
10	5.29	80.1
15	5.30	79.5
20	5.30	79.3
25	5.30	77.8

La observación de la figura V.16, nos pone de manifiesto que la intensidad de fluorescencia del sistema en estudio depende ligeramente de la concentración de la disolución reguladora. Para volúmenes de ésta comprendidos entre 8 y 20 mL, la intensidad de fluorescencia del sistema permanece constante.

Por otra parte, el volumen de disolución reguladora que mantiene constante el pH de la disolución es a partir de 10 mL.

Por ésta razón, se ha seleccionado el volumen de 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 para experiencias posteriores.

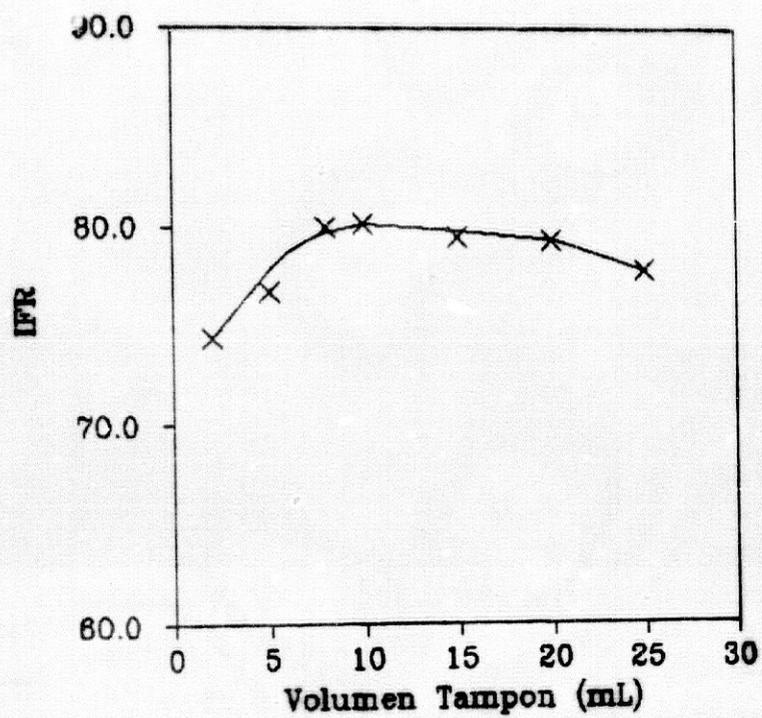


Figura V.16. Influencia de la concentración de la disolución reguladora

V.7.3. INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA

Para establecer la influencia que la fuerza iónica ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del sistema en estudio, se realizó la siguiente experiencia.

Se prepararon una serie de matraces aforados de 500 mL que contenían 1 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se adicionaron 2 mL de disolución etanólica de morina 0.02%, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de $\text{pH} = 5.30$, y volúmenes de 0, 1.50, 2.25, 3.00, 4.50, 6.00 y 7.50 mL de NaClO_4 0.5 M. A continuación se añadieron 100 mg de resina SP C-25.

Se equilibraron durante 30 minutos mediante agitación mecánica, se filtraron las disoluciones y se midió la intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.2 y temperatura 20°C .

En la tabla V.11 se pone de manifiesto los valores de fuerza iónica obtenidos para las diferentes adiciones de sal y se representa en la figura V.17.

Tabla V.11. Influencia de la fuerza iónica

$I \times 10^3$	%IFR
6.00	80.3
7.50	79.4
8.25	81.1
9.00	79.4
10.50	77.6
12.00	73.9
13.50	68.1

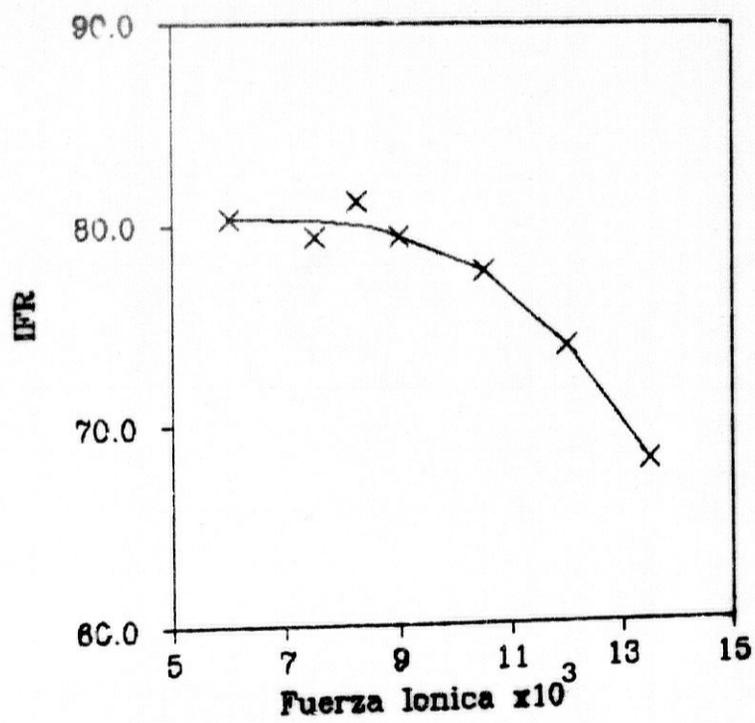


Figura V.17. Influencia de la fuerza iónica

Puede deducirse, por tanto, que la fuerza iónica ajustada con NaClO_4 , es independiente de la intensidad de fluorescencia hasta un valor de 10^{-2} . Para valores superiores decrece de acuerdo con la ecuación $\text{IFR} = 2.71 \times I^{-1/3}$. Este efecto puede atribuirse a la competición de los iones presentes en el medio con el complejo catiónico morina- Al(III) en el equilibrio de cambio iónico.

V.7.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACION DE LA RESINA

Se ha determinado la influencia de esta variable para volúmenes de disolución de 250, 500 y 1000 mL respectivamente. El procedimiento operatorio para todos los volúmenes fué el mismo, así y como se describe a continuación.

En primer lugar se preparó una serie de matraces en los que se introdujeron 0.5 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta un volumen final de 250 mL.

Se transvasaron las disoluciones a frascos de polietileno y se añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 5 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

A continuación, con objeto de estudiar la influencia que ejerce el tiempo de agitación del sistema sobre la intensidad de fluorescencia para volúmenes de 500 mL, se introdujeron 1 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el volumen final.

Se transvasaron las disoluciones a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad, y se les añadieron 6 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

Para un volumen final de 1000 mL se adicionó 2 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Estas disoluciones se transfirieron a unos frascos de polietileno de 2 L de capacidad y se les añadieron 12 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

El procedimiento seguido para todos ellos fué el siguiente: se agitó con períodos de tiempo crecientes, se filtró, se llenaron las cubetas y se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia en todos los casos, fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación de 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se recogen en las tablas V.12, que se han representado graficamente en la figura V.18.

Tabla V.12. Influencia del tiempo de agitación

t (min)	%IFR _(250mL)	%IFR _(500mL)	%IFR _(1000mL)
5	32.1	77.1	90.3
10	32.2	78.7	90.1
15	32.3	78.6	91.4
20	32.6	78.0	91.1
25	32.1	72.8	93.3
30	30.8	61.2	96.4
40	26.1	51.0	97.1
50	19.3	42.1	97.3
60	13.9	33.1	88.9
70		24.5	56.7
80		20.0	

Puede observarse en la figura V.18, que existe una clara dependencia del tiempo de agitación con la intensidad de fluorescencia para los tres volúmenes finales ensayados.

Se considera un tiempo óptimo de 10, 15 y 40 minutos, para 250 mL, 500 mL y 1000 mL de disolución, respectivamente.

Se aprecia en todos los casos un fuerte decrecimiento de la luminiscencia a partir de 20 minutos sobre el tiempo óptimo de agitación. La disminución en la intensidad de fluorescencia del sistema a partir del tiempo óptimo correspondiente a cada volumen y hasta 60 minutos, de un 57% para un volumen de 250 mL, 58% para 500 mL y 8% para 1000 mL de disolución.

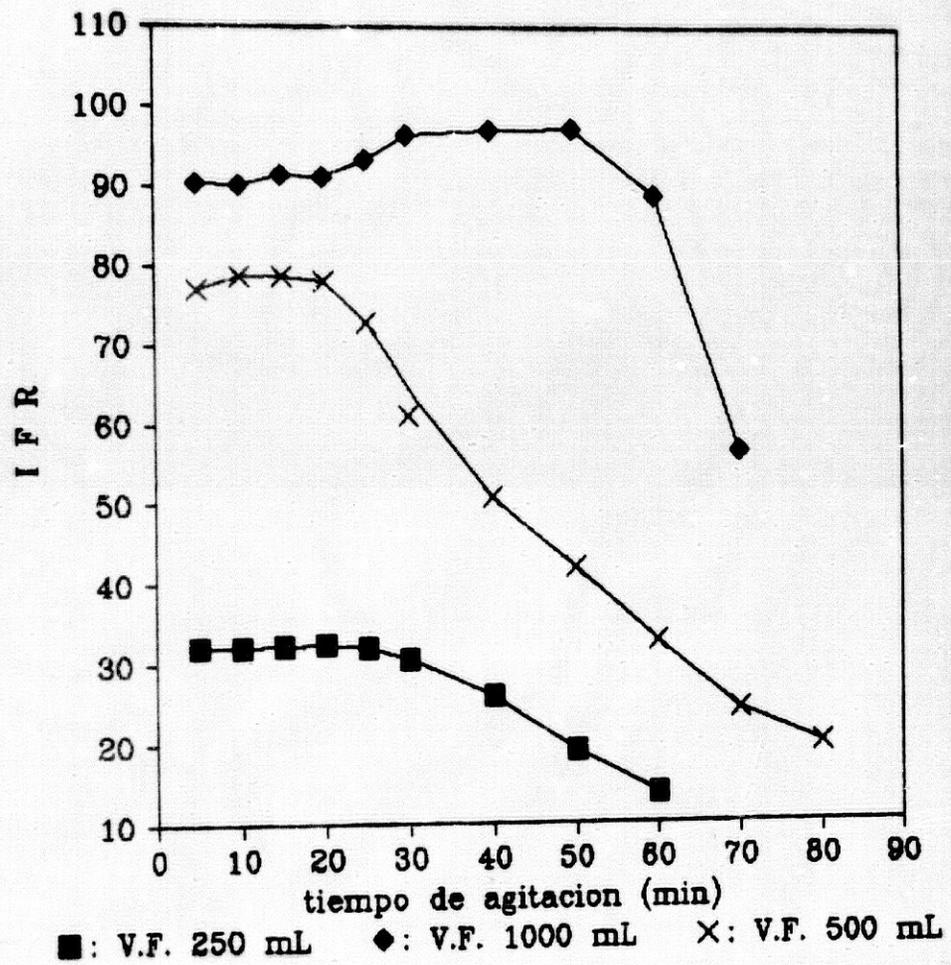


Figura V.18. Influencia del tiempo de agitación para volúmenes finales de 250, 500 y 1000 mL

Con objeto de conocer la causa del fuerte decrecimiento de la intensidad de fluorescencia relativa con el tiempo de agitación, se mantiene durante 15 minutos el complejo en disolución y posteriormente se añade la resina y se equilibra durante 15 minutos. El resultado se compara con el de una disolución equivalente pero sometida a agitación durante los 30 minutos en presencia de resina. La intensidad de fluorescencia en el primer caso, es de 111.3, y la señal del complejo sometido a una agitación de 30 minutos es de 81.2 (tabla V.12). Se deduce, por tanto, que la intensidad de fluorescencia es menor cuando se incrementa el tiempo de contacto entre el cambiador iónico y el complejo. Parece, por tanto, que es el contacto resina-complejo el que favorece la disminución de la intensidad de fluorescencia relativa que podría atribuirse a la existencia de algún equilibrio de cambio iónico competitivo con el de fijación del complejo Al(III)-morina.

V.7.5. ESTABILIDAD DEL COMPLEJO EN FASE RESINA

Para estudiar la estabilidad del sistema se preparó una disolución que en un volumen final de 500 mL, contenía 1 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase. Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno de 1 L de capacidad y se añadieron 2 mL de disolución etanólica de morina 0.02 %, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

Tras agitar la mezcla durante 15 minutos, filtrar y llenar la cubeta se realizó la medida de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo.

Las condiciones operatorias fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos para los intervalos de tiempo se recogen en la tabla V.13 y se representan en la figura V.19.

Tabla V.13. Estabilidad del complejo fijado en la resina

<i>t</i> (minutos)	IFR (%)
0	87.9
5	88.0
10	88.0
15	88.0
20	88.3
25	88.5
30	88.3
35	88.5
40	88.3
50	87.9
60	86.9
70	85.1
80	83.2
90	81.2
100	79.2
110	76.7
130	74.6

La observación de la figura V.19 nos pone de manifiesto que la intensidad de fluorescencia del complejo fijado en la resina permanece constante desde su formación y fijación hasta al menos una hora, tiempo más que suficiente para realizar la medida espectrofluorimétrica.

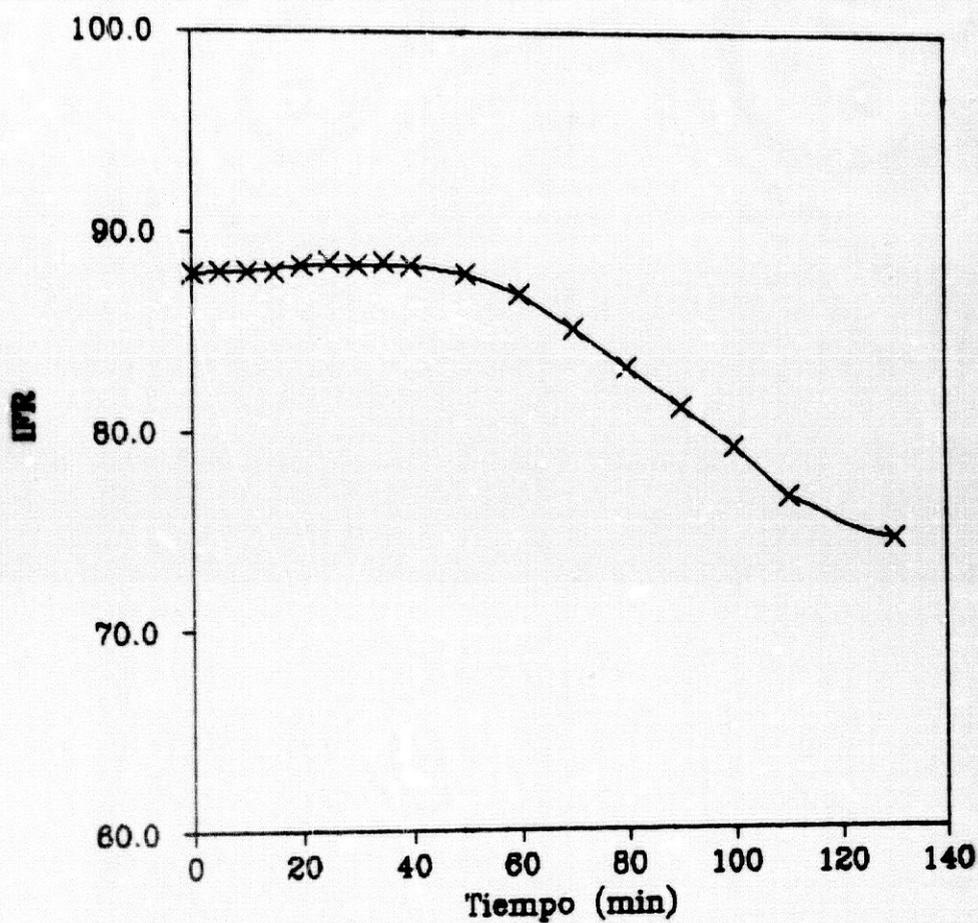


Figura V.19. Estabilidad del complejo fijado en la resina

En la bibliografía consultada, el complejo en disolución presenta un comportamiento similar, pues si bien comienza a ser estable a partir de 15 o 20 minutos de formarse (75), este tiempo es el que transcurre mientras el sistema se agita en fase sólida.

En el estudio del complejo Al-morina extraído en metilisobutilcetona (73) se observa una relación entre el pH y la estabilidad del complejo. Del estudio de la estabilidad del complejo a diferentes valores de pH se deduce que para un valor de pH inferior a 3.5 la intensidad de fluorescencia del complejo es muy inestable y decrece considerablemente con el tiempo durante al menos 3 horas (del orden del 70%), a partir de las cuales la medida se mantiene. Para un pH igual o superior a 3.5, el complejo es estable desde su formación y durante al menos 4 horas. Por otra parte, los blancos son estables en todo el rango de pH estudiado comprendido entre 1 y 10.

En nuestro estudio, es importante señalar que la temperatura debe mantenerse constante a 20°C, puesto que a temperaturas superiores (25°C), el complejo Al(III)-morina fijado en SP Sephadex C-25 muestra una disminución de la señal de fluorescencia inmediata a la formación del complejo. En los primeros 25 minutos la pérdida de intensidad de fluorescencia es del orden del 10%.

En la tabla V.14, se reflejan los resultados obtenidos que se han representado en la figura V.20.

Tabla V.14. Estabilidad del complejo fijado en la resina a temperatura superior (25°C)

<i>t</i> (minutos)	IFR (%)
0	84.9
5	81.8
10	81.6
15	78.8
20	76.3
25	75.3

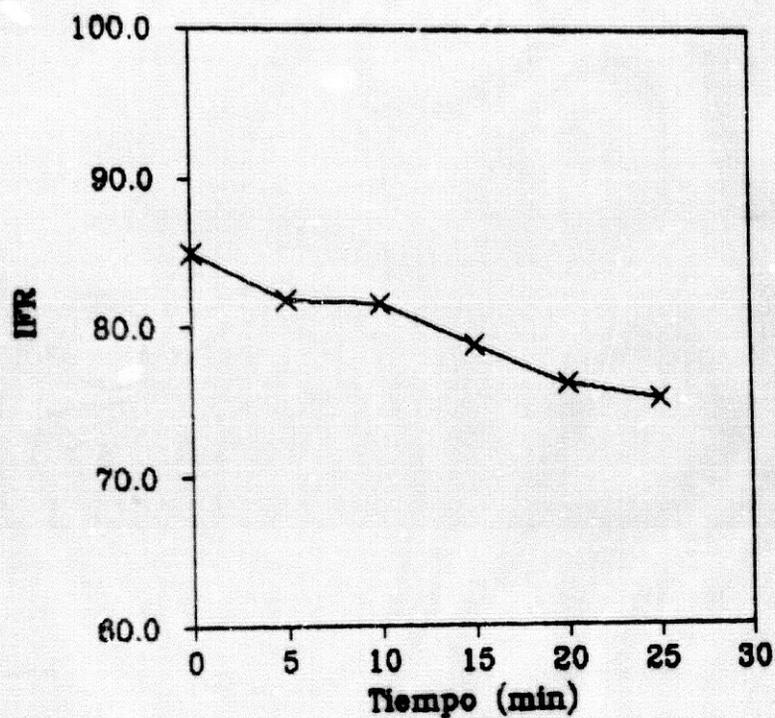


Figura V.20. Estabilidad del complejo fijado en la resina (25°C)

Por otra parte y al objeto de conocer la influencia del tiempo de contacto del complejo fijado en el cambiador con la disolución madre sobre la señal de fluorescencia, se realiza la siguiente experiencia.

Una vez equilibrado el complejo con el cambiador SP C-25 y realizado el procedimiento descrito anteriormente, se filtra la disolución y se mide la intensidad de fluorescencia en las

mismas condiciones indicadas. A continuación, el complejo SP-morina-Al(III) contenido en la cubeta de medida se vierte en el frasco de polietileno, que contiene el resto de la disolución y se mantiene en ella durante el intervalo de medida. En esta experiencia se observa una notable disminución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo (10% en los primeros 30 minutos y 20% hasta 1 hora).

Este ensayo corrobora la dependencia del contacto complejo con la disolución encontrado en el estudio del tiempo de agitación.

En la tabla V.15, se indican los resultados obtenidos que se representan en la figura V.21.

Tabla V.15. Estabilidad del complejo fijado en la resina y en contacto con la disolución

<i>t</i> (minutos)	IFR(%)
0	86.5
5	85.4
10	84.0
20	82.8
30	77.9
40	75.1
50	72.2
60	70.0
70	67.9
30	65.8
90	63.0
100	59.8
110	56.0

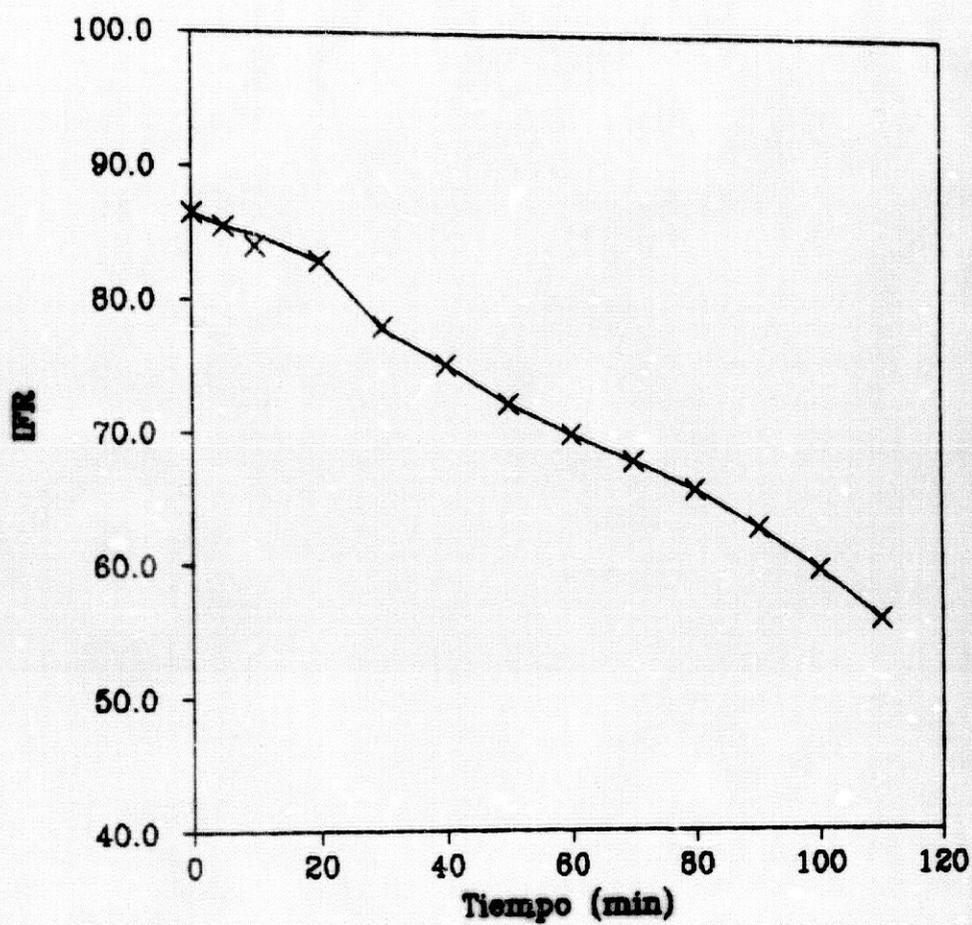


Figura V.21. Estabilidad del complejo fijado en el gel y en contacto con la disolución

Se concluye, por tanto, que el complejo es estable después de su equilibración hasta al menos 1 hora, operando a 20°C y evitando que el tiempo de contacto del complejo con la disolución sea superior al optimizado al estudiar el tiempo de agitación. Para ello, se recomienda que no se deje el complejo una vez fijado en la resina en contacto con la disolución sino que se proceda inmediatamente a su filtración y medida.

V.7.6. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE REACTIVO

Para estudiar la influencia que ejerce la concentración de morina sobre la intensidad de fluorescencia del sistema, se siguió el siguiente método operatorio.

A una serie de matraces aforados de 500 mL se añadieron 1 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada. Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad y se les añadieron las cantidades de etanol del 99.5% y disolución etanólica de morina 0.02 %, de la forma en que se especifica a continuación, tabla V.16, al objeto de mantener el porcentaje etanólico del medio y con ello el pH.

Tabla V.16

Matraz	Vol. Morina (mL)	Vol. Etanol (mL)
1	0.15	4.85
2	0.30	4.70
3	0.40	4.60
4	0.50	4.50
5	0.60	4.40
6	0.70	4.30
7	0.80	4.20
8	1.00	4.00
9	1.30	3.70
10	1.50	3.50
11	1.80	3.20
12	2.00	3.00
13	2.50	2.50
14	3.00	2.00
15	3.50	1.50
16	4.00	1.00

A continuación, se añadieron a cada uno de los frascos, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético y acetato sódico (0.1M) y 100 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se han preparado los blancos correspondientes, que contienen los mismos reactivos excepto el aluminio y fueron sometidos al mismo tratamiento.

Tras agitar durante 15 minutos, filtrar y llenar las cubetas, se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$,

rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.2 y temperatura 20°C.

En la tabla V.17 se muestran los resultados obtenidos y la dependencia de la concentración del reactivo con la intensidad de fluorescencia relativa se muestra en la figura V.22.

Tabla V.17. Influencia de la concentración de reactivo

[Morinal] $\times 10^6$ M	[Morinal]/[Al(III)]	%IFR _(F)	%IFR _(E)	Δ IFR(%)
0.18	2.4	38.0	25.1	12.9
0.36	4.8	48.8	24.8	24.0
0.47	6.4	54.2	26.0	28.2
0.59	8.0	59.3	28.8	30.5
0.71	9.6	64.4	32.5	31.9
0.83	11.2	67.2	33.8	32.4
0.95	12.8	70.8	35.0	34.8
1.18	16.0	75.8	37.4	38.4
1.54	20.8	81.2	39.9	41.3
1.77	24.0	82.4	41.0	41.4
2.13	28.8	84.8	45.6	39.2
2.36	32.0	86.0	43.9	42.1
2.96	40.0	86.0	47.0	39.0
3.55	48.0	84.8	43.5	41.3
4.14	56.0	85.2	45.6	39.6
4.73	64.0	87.6	47.4	40.2

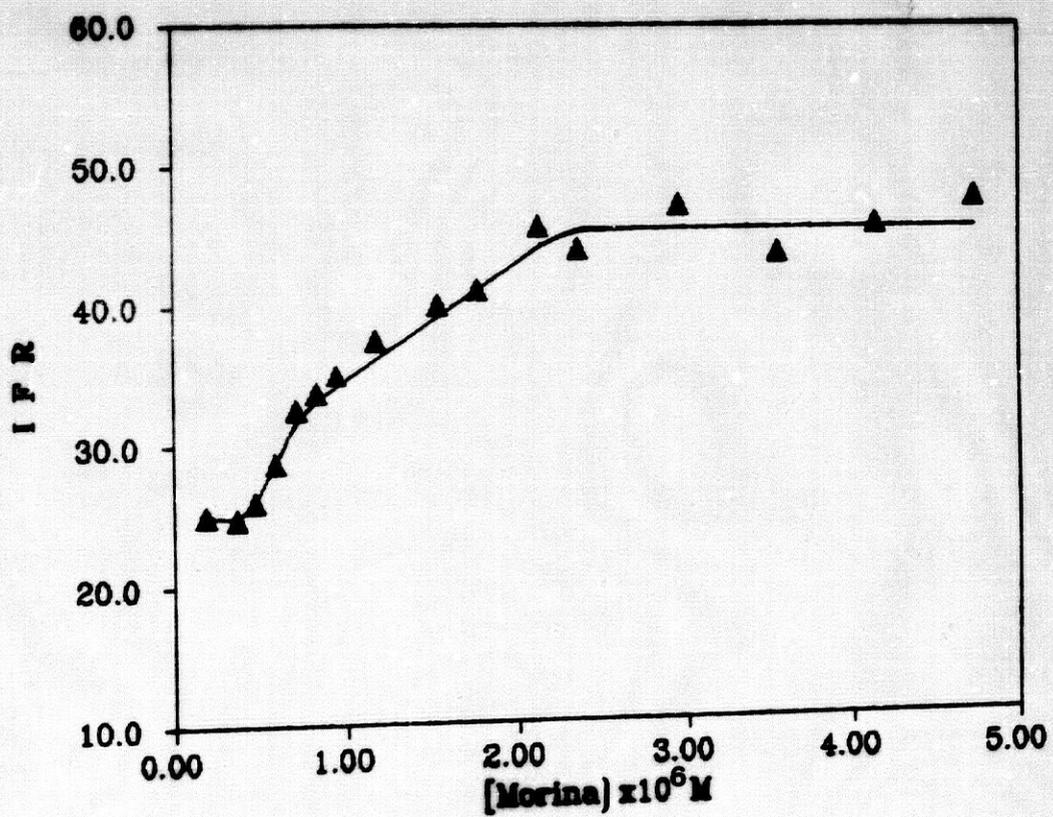
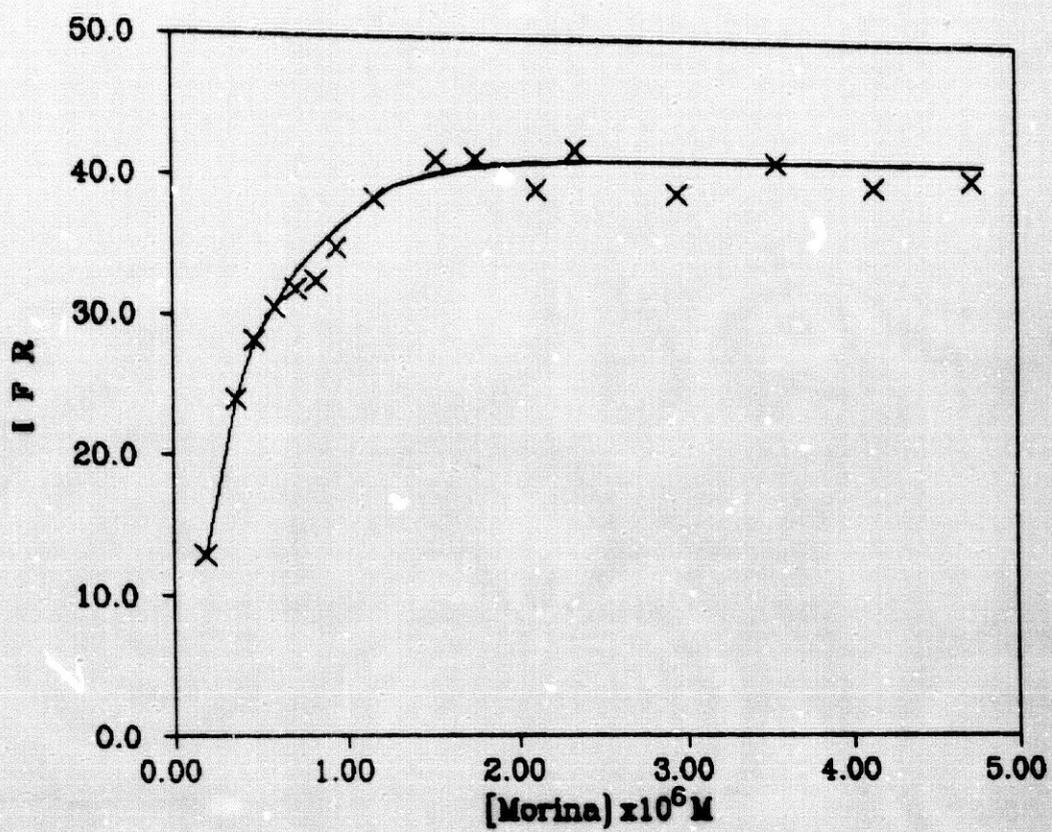


Figura V.22. Influencia de la concentración de reactivo sobre la intensidad de fluorescencia del complejo (A) y del blanco (B)

Se observa, por una parte, un incremento de la intensidad de fluorescencia de los blancos al aumentar la concentración de morina, hasta un valor de $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ a partir del cual permanece prácticamente constante. Por otra parte, puede deducirse que aumenta la intensidad de fluorescencia relativa del sistema hasta un valor de la concentración de morina de $1.8 \times 10^{-6} \text{ M}$, esto es $6.1 \times 10^{-5} \%$, permaneciendo constante para concentraciones superiores.

Este comportamiento (ausencia de atenuación) se atribuye a la naturaleza aniónica de la morina al pH de trabajo, y por tanto a la exclusión de la morina por la resina por efecto Donnan. El exceso de reactivo permanece en disolución, hecho que se corrobora con el filtrado coloreado que se observa a altas concentraciones de morina.

En disolución se observa una dependencia de la concentración de morina del mismo tipo (34), es decir, no se observa un efecto de atenuación de fluorescencia al aumentar la concentración de reactivo. La concentración de morina óptima en este estudio es de $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ (0.1 %).

Este efecto es opuesto al obtenido en sistemas en los que el ligando se fija en la resina de cambio iónico, donde se produce un efecto de atenuación. Este efecto se ha observado en el sistema Be(II)-morina fijado en QAE Sephadex (Capítulo IV).

Empleamos una concentración óptima de disolución etanólica de morina de $7.3 \times 10^{-7} \text{ M}$, esto es $2.5 \times 10^{-5} \%$, que corresponde a una relación molar $[\text{Morinal}]/[\text{Al(III)}] \approx 30$. Este valor es inferior al propuesto por Will ($3.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) en su estudio en disolución (34) y al propuesto por Medina Escriche (73,127) de $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($5 \times 10^{-3} \%$) también en disolución.

V.7.7. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE CAMBIADOR IONICO

La experiencia se llevó a cabo preparando una serie de disoluciones a las que se añadieron cantidades crecientes de cambiador iónico comprendidas entre 50 y 200 mg.

Estas disoluciones contenían en un volumen final de 500 mL, 5 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} enrasando con agua bidestilada.

Se transfirieron a sus respectivos frascos de polietileno, añadiéndose a cada uno de ellos, 3 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y cantidades crecientes de resina SP Sephadex C-25.

Tras agitar durante 15 minutos, se filtraron las disoluciones y se llenaron las cubetas de medida.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se han recogido en la tabla V.18 y se han representado gráficamente en la figura V.23.

Tabla V.18. Influencia de la cantidad de cambiador iónico

m (mg)	IFR(%)
50	43.6
80	36.8
100	31.4
150	25.4
200	23.3

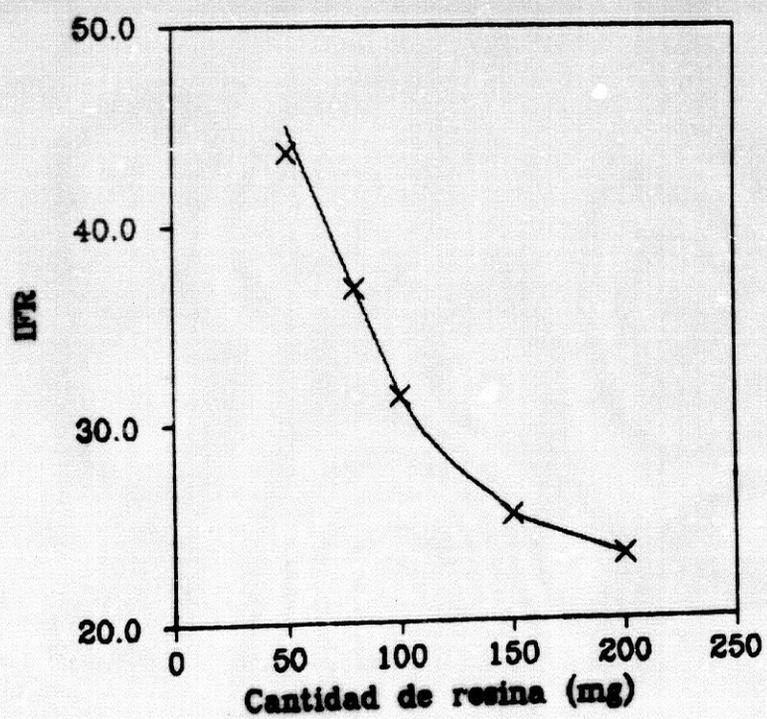


Figura V.23. Influencia de la cantidad de cambiador iónico

Como puede apreciarse en la anterior figura, al aumentar la cantidad de gel añadido disminuye la intensidad de fluorescencia. Como consecuencia, la cantidad de cambiador iónico óptimo a utilizar debe ser el menor posible. Este valor viene limitado por la cantidad mínima necesaria para el llenado de la cubeta de medida de una manera cómoda, valor que nosotros hemos fijado en 60 mg.

La cantidad de resina que se propone en este estudio es inferior a la empleada para la fijación del complejo Be(II)-morina (80 mg). Esto es debido al pH de trabajo. Un valor de pH muy básico, dificulta la recogida con la pipeta de la resina y el llenado de la cubeta, mientras que el pH empleado en éste sistema facilita el procedimiento operatorio.

V.7.8. ORDEN DE ADICION

Al objeto de conocer la influencia del orden de adición óptimo de los reactivos sobre la intensidad de fluorescencia se realizó la siguiente experiencia.

Se fijó que el analito fuese la primera especie a añadir y el cambiador iónico la última. Se prepararon una serie de matraces aforados de 500 mL que contenían 3 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad y se añadió a cada uno de ellos, con diferente orden de adición (tabla V.19), 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de $\text{pH} = 5.30$ y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Tras agitar durante 15 minutos, filtrar y llenar las cubetas, se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5 nm y rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.05 y temperatura 20°C .

Tabla V.19. Orden de adición de los reactivos

<i>orden de adición</i>	<i>%IFR</i>
Morina-Tampón	24.5
Tampón-Morina	24.9

Según muestran los resultados de la tabla V.19, la secuencia seguida en la adición de los reactivos es independiente de la intensidad de fluorescencia, por lo que mantenemos el orden seguido en las anteriores experiencias que es Al(III)-Morina-Tampón-Resina Sephadex SP C-25.

V.7.9. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

De todos los pasos del protocolo experimental seguido en el procedimiento operatorio, hay dos sobre los que la temperatura puede experimentar una mayor influencia:

- *proceso de cambio iónico*
- *intensidad de fluorescencia en fase resina*

A continuación hemos abordado el estudio que la temperatura ejerce sobre ellos por separado.

V.7.9.1. Influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico del sistema SP C.25-morina-Al(III)

Con objeto de estudiar esta influencia, se preparó una serie de matraces aforados de 500 mL que contenían todos ellos 2 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Como era necesario mantener la disolución a una determinada temperatura durante todo el proceso y debido a la imposibilidad de termostatar el agitador por su gran tamaño, fué necesaria la modificación del sistema. La agitación se realizó en vaso de precipitados con un agitador magnético convencional

provisto de termostato. La temperatura se midió con ayuda de un termómetro situado dentro de la disolución agitada.

En consecuencia, las disoluciones se transfirieron a un vaso de precipitados de 1 L de capacidad y se añadieron 1.20 mL de disolución etanólica de morina 6.2×10^{-3} %, 10 ml de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se sometió a una agitación de 15 minutos, manteniendo el sistema a una temperatura constante y distinta en cada caso.

Una vez transcurrido este tiempo, se filtró la disolución, transfiriéndose la resina a una cubeta de 1 mm de espesor y se realizó la medida de su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 426$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, rendija de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura de 20°C.

En la tabla V.20 se recogen los resultados obtenidos, y se han representado gráficamente en la figura V.24.

Tabla V.20. Influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico

$T^{\circ} (^{\circ}C)$	IFR(%)
5	67.0
10	58.6
15	53.9
20	45.4
25	37.8
30	31.1
35	25.9
40	19.6
45	15.4
50	12.9
55	12.0
60	11.8

De la observación de la figura V.24, puede deducirse que existe una dependencia del proceso de cambio iónico con la temperatura, midiéndose en todos los casos la intensidad de fluorescencia relativa a 20°C.

La dependencia puede describirse por la ecuación polinómica: $IFR = 60.7 + 0.3 T - 6.3 \times 10^{-2} T^2 + 7.2 \times 10^{-4} T^3$, (desviación estandar del ajuste 0.6490). Comportamiento que es similar al encontrado en el estudio del complejo Be(II)-morina fijado en QAE, anteriormente estudiado (Capítulo IV).

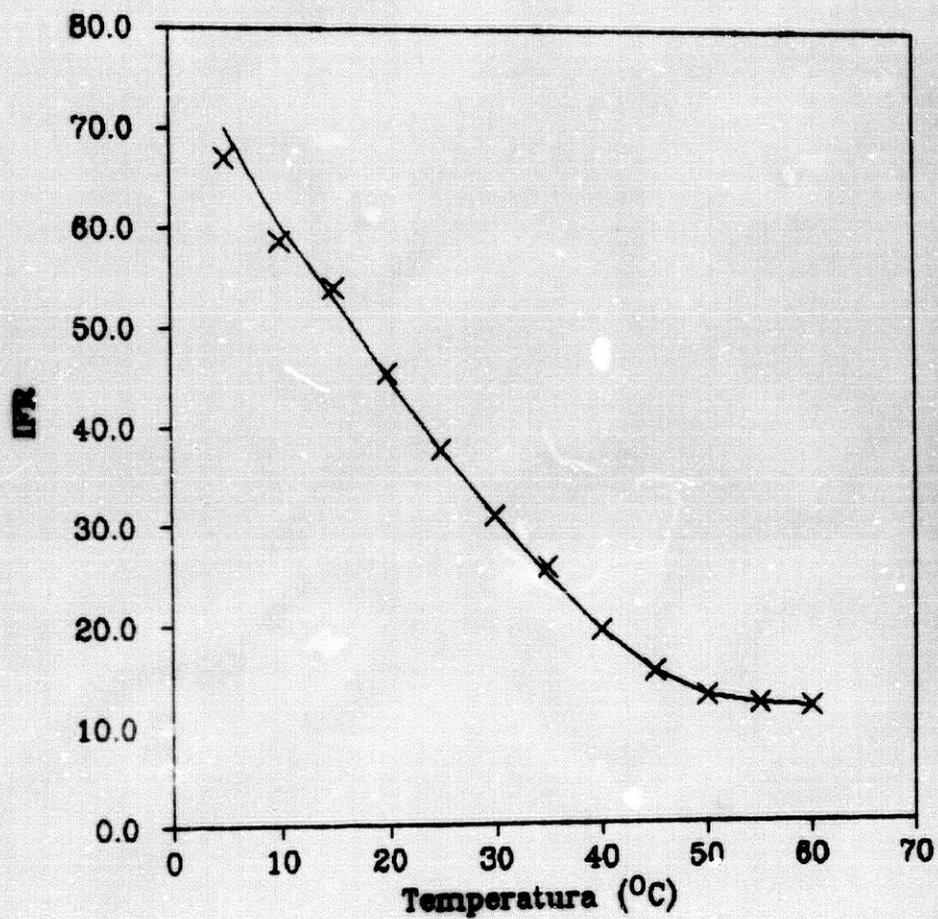


Figura V.24. Influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico

V.7.9.2. Influencia de la temperatura sobre la medida de la intensidad de fluorescencia

Con objeto de estudiar la influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia, se preparó un matraz aforado de 500 mL en el que se introdujeron 3 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno de 1 l de capacidad y se añadieron 1.60 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de $\text{pH} = 5.30$ y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se sometió a una agitación durante 15 minutos, transcurridos los cuales se filtró la disolución, transfiriéndose la resina a la cubeta y se procedió a la lectura de su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.2 y temperatura variable.

En la tabla V.21 se recogen los resultados obtenidos que han sido representados gráficamente en la figura V.25.

Tabla V.21. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia

<i>calentamiento</i>		<i>enfriamiento</i>	
$T^{\circ} (^{\circ}C)$	%IFR	$T^{\circ} (^{\circ}C)$	%IFR
5	55.9	80	25.0
10	52.3	75	25.2
15	48.3	70	25.3
20	44.8	65	25.3
25	41.2	60	25.3
30	38.0	55	25.2
35	34.9	50	25.1
40	32.6	45	25.0
45	29.8	40	24.8
50	27.9	35	24.8
55	26.2	30	24.9
60	25.4	25	24.9
65	25.4	20	24.6
70	25.3	15	24.6
75	25.3	10	23.3
80	25.3	5	19.2

Existe dependencia del sistema con la temperatura; la intensidad de fluorescencia decrece cuando la temperatura se incrementa. El decrecimiento en la intensidad de fluorescencia es de un 26% hasta 25°C, 42% hasta 40°C y 54% hasta 60°C. A partir de esta temperatura la señal se mantiene constante hasta 80°C.

La ecuación experimental obtenida para el calentamiento es $IFR = 59.7 - 7.5 T - 5.1 \times 10^{-4} T^2 + 5.6 \times 10^{-5} T^3$. (Desviación estandar del ajuste 0.3887).

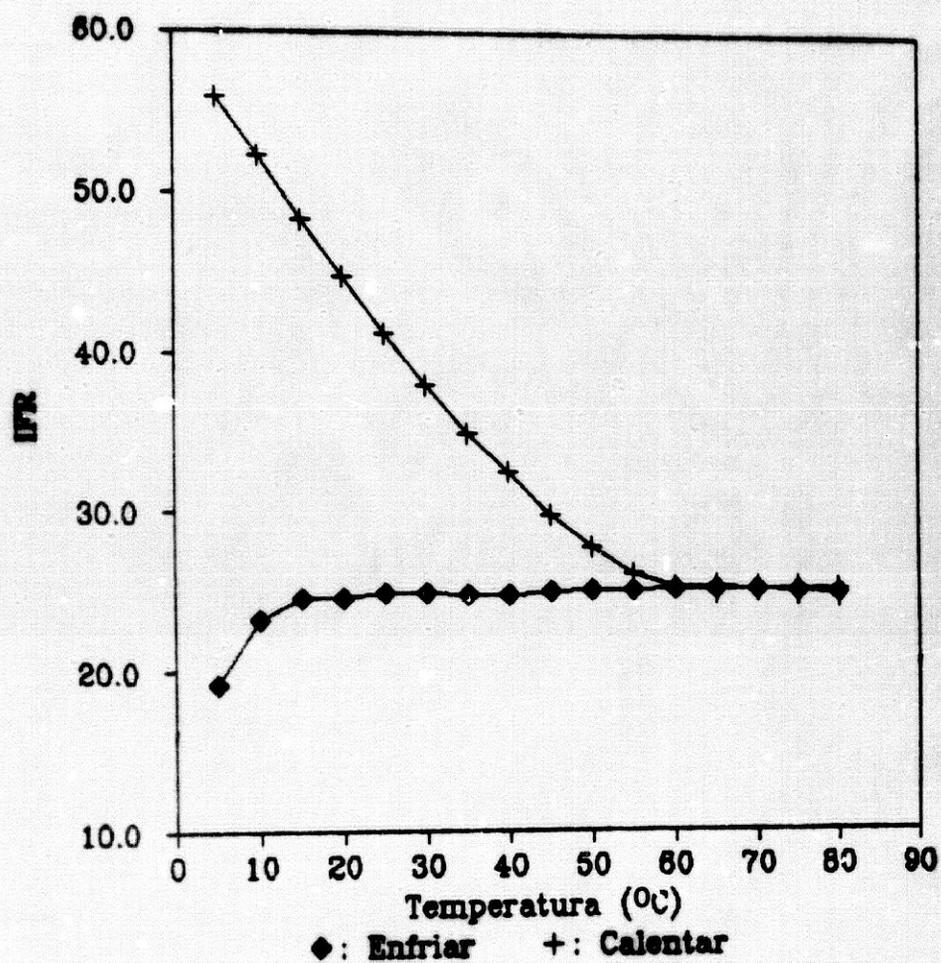


Figura V.25. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia

Aquí la temperatura parece ejercer dos claros efectos. En primer lugar, el habitual de favorecer la relajación no radiativa de las moléculas de fluorógeno y por otra parte, acelerar una reacción química irreversible fuertemente dependiente de la temperatura.

Esta inestabilidad del complejo Al(III)-morina con la temperatura en disolución ha sido puesto de manifiesto por diversos autores, siendo los datos a menudo contradictorios (34,94,127,162,199,203).

Los datos de la disminución de la fluorescencia en disolución pueden ajustarse a una ecuación polinomial similar a la del sistema resina-morina-Al(III). Así, del estudio en disolución de la influencia de la temperatura sobre el complejo Al(III)-morina (199) se obtiene una ecuación $IFR = 54.7 - 1.4 T + 4.8 \times 10^{-2} T^2 - 1.1 \times 10^{-3} T^3$; (desviación estandar del ajuste: 0.4999).

Por otra parte, la intensidad de fluorescencia del complejo Al(III)-morina extraído en metilisobutilcetona (73), no presenta gran dependencia con la temperatura en el rango de 15 a 40°C estudiado, a diferencia de la sensible dependencia que presenta el complejo en ausencia de metilisobutilcetona. Sin embargo, desde el punto de vista del comportamiento del sistema fluorescente, éste no es idéntico a las diferentes temperaturas estudiadas. Así a temperaturas inferiores a 25°C, la fluorescencia decrece gradualmente con el tiempo, mientras que a temperaturas superiores se observa un débil incremento con el tiempo.

El estudio del complejo en disolución en presencia de un agente surfactante (127), muestra un comportamiento diferente. Por un lado muestra un notable incremento de la fluorescencia al aumentar la temperatura entre 15 y 25°C mientras que a partir de ésta temperatura se observa un decrecimiento, aunque menos acentuado hasta 40°C.

Este efecto de la temperatura sobre el complejo morina-Al(III) en fase resina es opuesto al encontrado en el estudio del sistema Be(II)-morina fijado en QAE (Capítulo IV), en el que la temperatura afecta a la señal de fluorescencia pero de forma reversible. Este comportamiento diferente puede atribuirse

a la distinta naturaleza de las especies fijadas en la resina de cambio iónico.

Así, en la resina Sephadex SP sólo puede estar presente el complejo catiónico morina-Al(III), y enlazado probablemente a través del ion Al(III); mientras que en la resina Sephadex QAE se fija un exceso de ligando junto con el complejo aniónico morina-Be(II). Este exceso de morina fijado dentro de la resina podría ejercer una doble acción, por una parte preservar de la oxidación al complejo, lo cual evitaría la disminución de su señal fluorescente, y por otra, la morina en exceso podría "recambiar" las moléculas oxidadas.

Además el hecho de que la fijación previa de morina estabiliza el complejo viene corroborado en el estudio de la variación de la intensidad de fluorescencia con la temperatura realizado para la morina sólo, fijada en QAE, (Capítulo III), en el que la influencia observada es reversible.

A partir del estudio realizado sobre la influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico y sobre la intensidad de fluorescencia, pensamos que podría originarse el mismo fenómeno ya antes sugerido: hidrólisis del anillo heterocíclico de la morina y condensación u oxidación de la estructura del anillo cerrado formado (162).

Se concluye, que la intensidad de fluorescencia del complejo Al(III)-morina-SP C.25 es dependiente de la temperatura, por lo que es importante termostatar antes de realizar su medida. Hemos fijado la temperatura de trabajo en $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, próxima a la ambiental, fácilmente alcanzable mediante el empleo de un termostato y a la que se ha comprobado la estabilidad del sistema (pag 411).

V.7.10. RESUMEN DE LA OPTIMIZACION DE VARIABLES

En el estudio de la formación y fijación del sistema fluorescente que forma la morina con el Al(III) en presencia de cambiadores iónicos se ha escogido, en primer lugar, el soporte adecuado en el cual el complejo muestra mayor capacidad de intercambio iónico, resultando ser el gel Sephadex catiónico SP C-25. Se ha optimizado la posición de la cubeta con respecto a la radiación, así como los valores de las anchuras de las rendijas de excitación y de emisión.

En segundo lugar, una vez elegidas las longitudes de onda de excitación y de emisión del sistema, se han optimizado aquellas variables que afectan a la intensidad de fluorescencia. En la siguiente tabla V.22 se resumen las condiciones óptimas que se han seleccionado tras su estudio.

Tabla V.22

<i>variable</i>	<i>condición óptima</i>
rendija de excitación	2.5 nm
rendija de emisión	2.5 nm
longitud de onda de excitación	426 nm
longitud de onda de emisión	496 nm
pH	5.30
disolución reguladora	AcH/AcNa
volumen disolución reguladora	10 mL
concentración de morina	$2.5 \times 10^{-5}\%$
estabilidad	al menos 1 hora
temperatura	$20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$
cantidad de cambiador iónico	60 mg
tiempo de agitación del sistema	10, 15 y 40 min para 250, 500 y 1000 mL
orden de adición	Al(III)-Morina-Tampón

ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS

ANALITICAS DEL SISTEMA

V.8.1. INFLUENCIA DEL VOLUMEN SOBRE LA SENSIBILIDAD Y LIMITE DE DETECCION DEL METODO

Al objeto de conocer cómo influye el volumen de disolución sobre la intensidad de fluorescencia, se preparó una serie de disoluciones que en volúmenes finales, comprendidos entre 100 y 1750 mL, contenían cantidades crecientes de disolución de Al(III) de 0.6 mg.L^{-1} , de tal forma que la concentración final después de enrasar con agua bidestilada, fuese siempre igual a $0.6 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III).

Las disoluciones se transfirieron a frascos de polietileno de 1 y 2 L de capacidad, respectivamente, y se añadió a cada disolución la cantidad necesaria de disolución etanólica de morina 0.02 %, para que la concentración de ésta fuese constante e igual a $5.91 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Asimismo, se añadieron cantidades crecientes de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH = 5.30 de forma que la fuerza iónica fuese siempre constante y, por último, 60 mg de SP Sephadex C-25.

Tras una agitación de 15 minutos, se filtraron, se llenaron las cubetas y se procedió a la medida de la intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron:
 $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.12 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos así como los volúmenes añadidos se recogen en la tabla V.23 y se han representado gráficamente en la figura V.26.

Tabla V.23. Influencia del volumen final de disolución

<i>V. final</i> (mL)	<i>V. Al (III)</i> (.L)	<i>V. Morina</i> (mL)	<i>V. Tampón</i> (mL)	<i>IFR (%)</i>
100	0.10	0.10	2	25.4
250	0.25	0.25	5	35.6
500	0.50	0.50	10	48.9
750	0.75	0.75	15	59.2
1000	1.00	1.00	20	64.6
1250	1.25	1.25	25	68.8
1500	1.50	1.50	30	68.6
1750	1.75	1.75	35	69.1

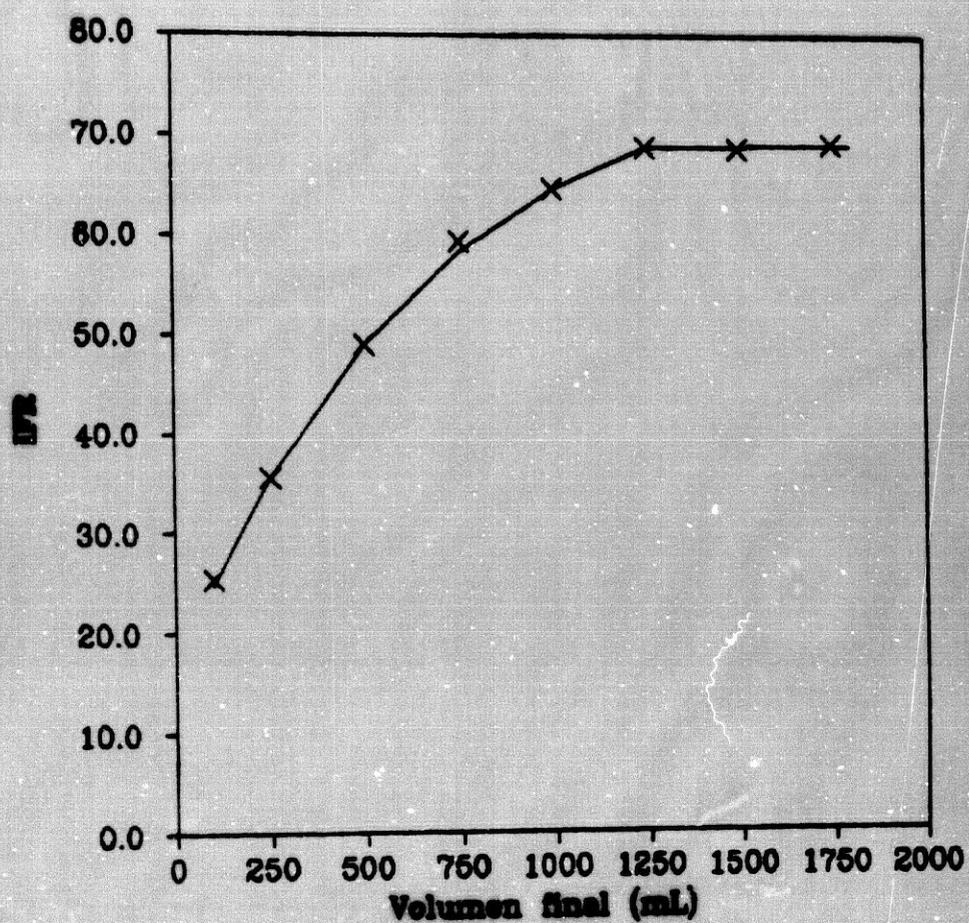


Figura V.26. Influencia del volumen sobre la sensibilidad del método

La figura V.26, pone de manifiesto un incremento de la señal de fluorescencia con el volumen de muestra (V), hasta que se hace prácticamente independiente del mismo para valores superiores a 1250 mL. Este hecho sugiere la necesidad de realizar el estudio de optimización de las diferentes variables que influyen en el proceso para cada volumen concreto de disolución.

La dependencia encontrada, similar al comportamiento del sistema Be(II)-morina (Capítulo IV), sugiere una dependencia de tipo exponencial. La ecuación linealizada $\ln(\text{IFR}/A - 1) = CV$, presenta un buen ajuste para una concentración de Al(III) de $0.6 \mu\text{g.L}^{-1}$ y $A = 69$, $C = -2.52 \times 10^{-3}$ y $r = 0.988$. La ecuación tiene peor ajuste para altos volúmenes de muestra debido a la fluctuación de las medidas de fluorescencia. Esta fluctuación es del mismo orden que el ruido del fluorímetro en nuestras condiciones experimentales.

V.8.2. RECTAS DE CALIBRADO

Una vez optimizadas todas las variables que influyen sobre la formación y fijación del complejo Al(III)-morina en la resina Sephadex SP C-25, se han establecido las rectas de calibrado para volúmenes finales de 250, 500 y 1000 mL. El rango de concentraciones de Al(III) ensayado es el comprendido entre 0.4 y 1.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para 250 y 500 mL y entre 0.2 y 1.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para 1000 mL de muestra, intervalo en el cual la intensidad de fluorescencia del sistema en estudio es una función lineal de la concentración de catión metálico.

V.8.2.1. Rectas de calibrado para un volumen final de 250 mL

Se preparó a tal fin, en primer lugar, una serie de matraces .forados de 250 mL en los que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} , comprendidos entre 1 y 4 mL y se enrasó con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 1 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se agitaron durante 10 minutos, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los datos obtenidos, una vez restados del blanco, se recogen en la tabla V.24 y han sido representados gráficamente en la figura V.27.

Tabla V.24. Curva de calibrado. Volumen final 250 mL.

ppb Al(III)	%IFR
0	0
0.4	3.
0.8	9.5
1.2	18.2
1.6	22.9

Como puede observarse en la figura V.27, existe una buena linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de Al(III), en el intervalo de concentraciones ensayado.

La ecuación correspondiente a ésta recta de calibrado, ajustada por mínimos cuadrados es:

$$\text{IFR} = 15.10 [\text{Al(III)}] - 1.24$$

donde la [Al(III)] viene expresada en $\mu\text{g.L}^{-1}$.

El coeficiente de correlación encontrado es 0.991.

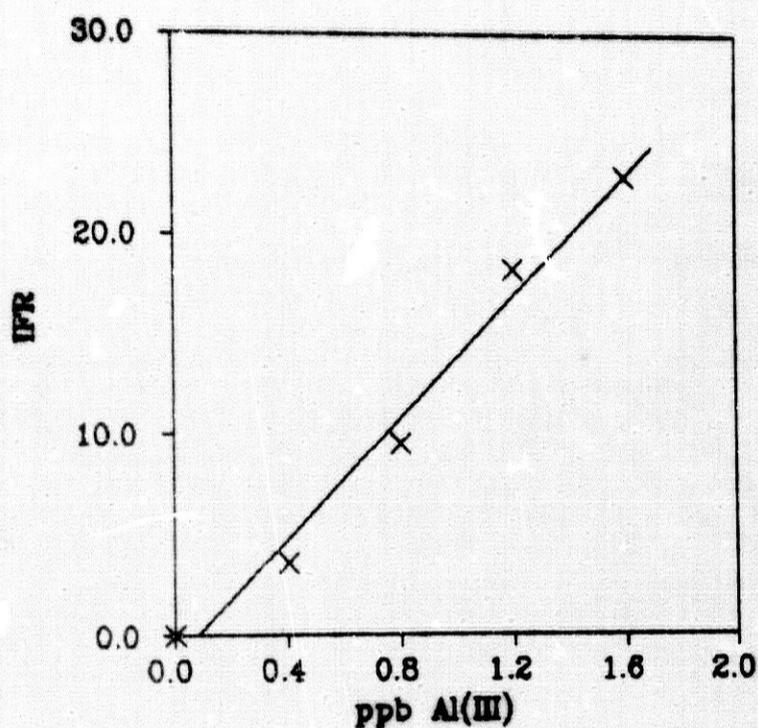


Figura V.27. Recta de calibrado. Volumen final 250 mL

V.8.2.2. Recta de calibrado para un volumen final de 500 mL

A continuación se estableció la recta de calibrado para un volumen final de 500 mL. Para ello se preparó una serie de matraces aforados en los que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} , comprendidos entre 2 y 8 mL, y se enrasó con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de de disolución

reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se agitaron durante 15 minutos, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: λ_{exc} = 426 nm, λ_{em} = 496 nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los datos obtenidos, una vez restados del blanco, se recogen en la tabla V.25 y se representan graficamente en la figura V.28, dónde puede también apreciarse una buena linealidad entre la intensidad de fluorescencia y el intervalo de concentración de Al(III) ensayado.

Tabla V.25. Recta de calibrado. Volumen 500 mL.

ppb Al(III)	%IFR
0	0
0.4	14.3
0.8	28.6
1.2	42.7
1.6	57.6

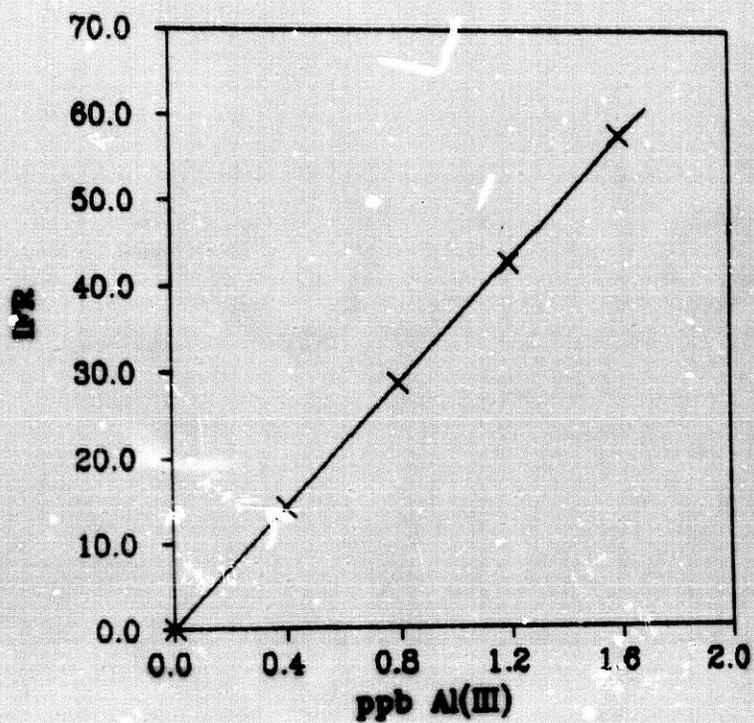


Figura V.28. Recta de calibrado. Volumen final de 500 mL

La ecuación correspondiente a ésta recta de calibrado, ajustada por mínimos cuadrados es:

$$\text{IFR} = 35.90 [\text{Al(III)}] - 0.08$$

donde la $[\text{Al(III)}]$ viene expresada en $\mu\text{g.L}^{-1}$.

El coeficiente de correlación encontrado es de 0.999.

V.8.2.3. Recta de calibrado para un volumen final de 1000 mL

Para un volumen final de 1000 mL, se añadieron volúmenes crecientes de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} , comprendidos entre 2 y 12 mL y se enrasó con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 4 mL de disolución etanólica de morina $5.2 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se agitaron durante 40 minutos, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos, una vez restados del blanco, se recogen en la tabla V.26 y se han representado graficamente en la figura V.29.

Tabla V.26. Recta de calibrado. Volumen 1000 mL.

ppb Al(III)	%IFR
0	0
0.2	11.6
0.4	24.2
0.8	40.6
1.2	59.0

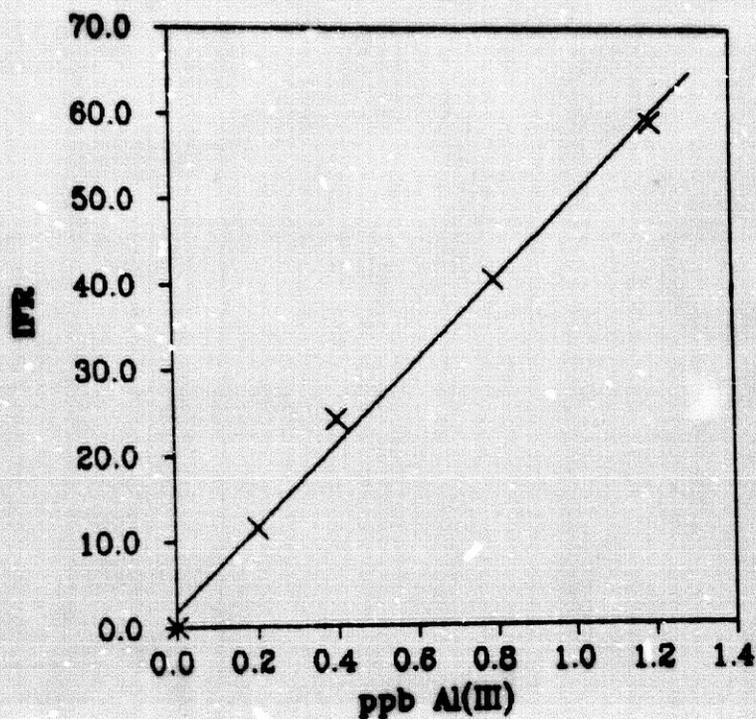


Figura V.29. Recta de calibrado. Volumen final de 1000 mL

Se observa también en éste caso una buena linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de Al(III) ensayada.

La ecuación correspondiente a ésta recta de calibrado, ajustada por mínimos cuadrados es:

$$IRF = 48.35 [Al(III)] + 1.94$$

donde la [Al(III)] viene expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

El coeficiente de correlación encontrado es 0.997.

V.8.2.4. Comparación de la sensibilidad de los diferentes volúmenes

Como ya se ha indicado, en fluorimetría de cambio iónico la sensibilidad se incrementa cuando se equilibran grandes volúmenes de muestra con una misma cantidad de resina (170). Este incremento puede estimarse, en la práctica, por la pendiente en las rectas de calibrado. En la tabla V.27, se indican las correspondientes ecuaciones de estas curvas de calibrado.

Tabla V.27. Ecuaciones de las curvas de calibrado

V. final (mL)	IFR = f[Al(III)] _{ppb}	coefic. correlac.
250	IFR = 15.10 [Al(III)] - 1.24	0.991
500	IFR = 35.90 [Al(III)] - 0.08	0.999
1000	IFR = 48.35 [Al(III)] + 1.94	0.997

En ellas puede observarse, como era de esperar, un aumento de la pendiente de la recta de calibrado y por tanto de la sensibilidad del método, con el volumen de disolución. Este incremento puede estimarse, en la práctica, por el cociente de las pendientes de las rectas de calibrado. Los valores calculados para la relación de sensibilidades en las muestras analizadas son $S_{1000/500} = 1.35$, $S_{500/250} = 2.38$ y $S_{1000/250} = 3.20$.

V.8.2.5. Comparación con el método en disolución que emplea morina

La sensibilidad del método que se propone es muy superior a la de otros métodos en disolución que emplean morina como reactivo. Con objeto de comparar la sensibilidad del método en fase sólida y en disolución, se ha obtenido una recta de calibrado en disolución para el rango de concentraciones comprendido entre 2 y 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$, basándose en el procedimiento operatorio descrito por Will (34).

Para ello, en matraces aforados de 50 mL se añadieron 1, 2, 3 y 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada hasta el volumen final.

A continuación, una vez transvasadas las disoluciones a matraces de mayor volumen, se añadió 2 mL de disolución etanólica de morina $1.2 \times 10^{-2}\%$ y 1 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30.

Se preparó también un blanco exento de Al(III) al que se le añadieron los mismos reactivos y se sometió al mismo tratamiento.

Se realizó la medida de la intensidad de fluorescencia en las condiciones operatorias fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 431 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 6.0 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos, una vez restado el valor del blanco, se indican en la tabla V.28, y se han representado gráficamente en la figura V.30.

Tabla V.28. Recta de calibrado en disolución

ppb Al (III)	% IFR
0	0
2	17.0
4	33.5
6	50.2
8	66.3

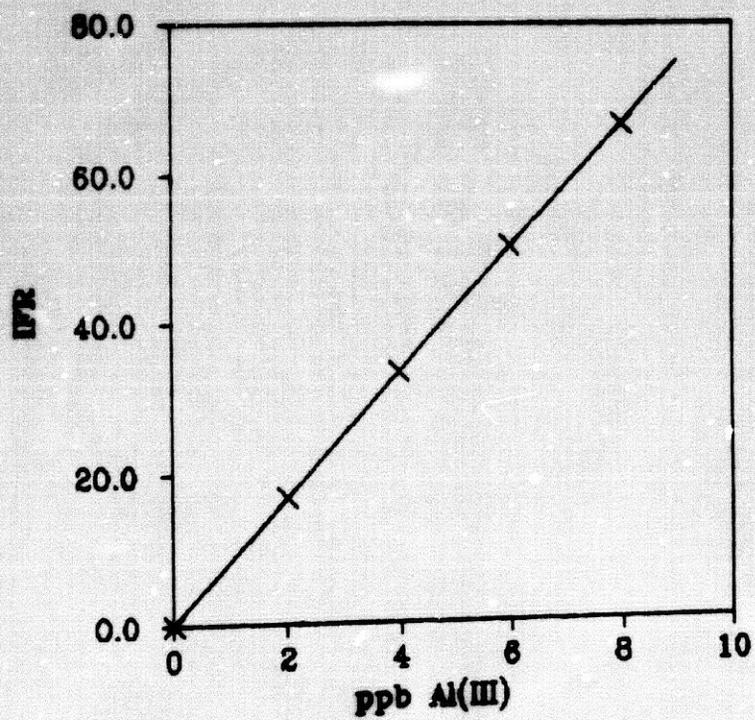


Figura V.30. Recta de calibrado en disolución

La ecuación de la recta, una vez convertido el factor a 0.1, se ajusta por mínimos cuadrados, y es la siguiente:

$$\text{IFR} = 0.14 [\text{Al(III)}] + 0.004$$

donde la $[\text{Al(III)}]$ viene expresada en $\mu\text{g.L}^{-1}$.

El coeficiente de correlación encontrado es 0.999.

La comparación de los resultados de sensibilidad obtenidos nos permiten resaltar el gran aumento de ésta que se obtiene al operar en fase resina (para 500 mL), respecto al que se obtiene en disolución. Como puede observarse la relación de las pendientes de las rectas de calibrado es 256.

$$\frac{\text{pendiente método FCI}}{\text{pendiente método disolución}} = 256$$

V.9.1. METODOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACION DE Al(III)

La optimización de las variables que influyen sobre la intensidad de fluorescencia del sistema SP C.25-morina-Al(III) realizada anteriormente, nos ha permitido proponer los siguientes métodos operatorios para la determinación de éste catión en diferentes volúmenes de muestra.

V.9.1.1. Método propuesto para un volumen final de 250 mL

- *Disolución problema.*

En un matraz de 250 mL se añade un volumen de muestra que contenga la cantidad de aluminio comprendida en el rango de aplicación del método propuesto, entre 0.4 y 1.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, y se enrasa con agua bidestilada. Se transfiere a un frasco de polietileno y se añaden 1 mL de disolución etanólica de morina de $6.2 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

La mezcla se agita mecánicamente durante 10 minutos, se filtra y se llenan las cubetas de 1 mm de espesor con la ayuda de una pipeta. A continuación se mide la intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones descritas para la recta de calibrado.

- Recta de calibrado.

La recta de calibrado se obtiene preparando 5 disoluciones con una concentración de Al(III) de 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para lo cual en matraces aforados de 250 mL se pipetea 1, 2, 3 y 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasa con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfieren a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad y se les añade 1 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Las disoluciones se agitan durante 10 minutos, se filtran y se recogen las bolitas de resina por filtración bajo succión y con la ayuda de una pipeta se empaquetan en una cubeta de 1 mm de espesor junto con un pequeño volumen del filtrado.

Se prepara también un blanco que contiene todos los reactivos menos el aluminio y se trata de la misma forma.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia son: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

V.9.1.2. Método propuesto para un volumen final de 500 mL

- Disolución problema.

En un matraz de 500 mL se añade un volumen de muestra que contenga la cantidad de aluminio comprendida en el rango de aplicación del método propuesto, entre 0.4 y 1.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, y se enrasa con agua bidestilada. Se transfiere a un frasco de polietileno y se añaden 2 mL de disolución etanólica de morina de $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido

acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

La mezcla se agita mecánicamente durante 15 minutos, se filtra y se llenan las cubetas de 1 mm de espesor con la ayuda de una pipeta. A continuación se mide la intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones descritas para la recta de calibrado.

- *Recta de calibrado.*

La recta de calibrado se obtiene preparando 5 disoluciones con una concentración de Al(III) de 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para lo cual en matraces aforados de 500 mL se pipetea 2, 4, 6 y 8 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasa con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfieren a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad y se les añade 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Las disoluciones se agitan durante 15 minutos, se filtran y se recogen las bolitas de resina por filtración bajo succión y con la ayuda de una pipeta se empaquetan en una cubeta de 1 mm de espesor junto con un pequeño volumen del filtrado.

Se prepara también un blanco que contiene todos los reactivos menos el aluminio y se trata de la misma forma.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia son: $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

V.9.1.3. Método propuesto para un volumen final de 1000 mL

- *Disolución problema.*

En un matraz de 1000 mL se añade un volumen de muestra que contenga la cantidad de aluminio comprendida en el rango de aplicación del método propuesto, entre 0.2 y 1.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, y se enrasa con agua bidestilada. Se transfiere a un frasco de polietileno y se añaden 4 mL de disolución etanólica de morina de $6.2 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

La mezcla se agita mecánicamente durante 4 minutos, se filtra y se llenan las cubetas de 1 mm de espesor con la ayuda de una pipeta. A continuación se mide la intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones descritas para la recta de calibrado.

- *Recta de calibrado.*

La recta de calibrado se obtiene preparando 5 disoluciones con una concentración de Al(III) de 0.2, 0.4, 0.8 y 1.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para lo cual en matraces aforados de 1000 mL se pipetea 1, 2, 4 y 6 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasa con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfieren a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añade 4 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Las disoluciones se agitan durante 40 minutos, se filtran y se recogen las bolitas de resina por filtración bajo succión y con la ayuda de una pipeta se empaquetan en una cubeta de 1 mm de espesor junto con un pequeño volumen del filtrado.

Se prepara también un blanco que contiene todos los reactivos menos el aluminio y se trata de la misma forma.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia son: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

V.9.2. ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD

Consideramos, como ya se indicó en el capítulo IV, que de las diferentes etapas a seguir en la aplicación de la espectrofluorimetría de cambio iónico, sea el empaquetamiento del cambiador iónico en la cubeta de medida la que mayor incertidumbre pudiera introducir. Por ésta razón, se realiza su estudio en primer lugar.

V.9.2.1. Reproducibilidad del empaquetamiento

Este estudio se ha llevado a cabo para tres volúmenes finales, esto es, 250, 500 y 1000 mL de disolución.

Para ello, en primer lugar, se introdujeron en un matraz aforado de 250 mL, 5 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el volumen final de 250 mL.

Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno y se añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 200 mg de resina Sephadex SP C-25.

Tras agitar durante 10 minutos, se filtraron, se transfirió el gel a la cubeta y se realizó la medida de su intensidad de fluorescencia.

El proceso se repitió 10 veces, vaciando la cubeta y volviéndola a llenar, evitando siempre el contacto de la resina

con la disolución, por lo que se procede a filtrar completamente después de cada medida.

A continuación, se determinó la reproducibilidad del empaquetamiento del cambiador iónico para un volumen de 500 mL de muestra, para lo que se siguió el siguiente método operatorio. En un matraz aforado de 500 mL se añadió 10 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transfirió a un frasco de polietileno y se añadió 6 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$ y 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de $\text{pH} = 5.30$, 200 mg de resina Sephadex SP C-25.

Se agitó durante 15 minutos y se sometió al mismo tratamiento tras lo cual se midió su intensidad de fluorescencia, repitiendo también el proceso 10 veces.

Por último, para un volumen de 1000 mL se adicionaron 20 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada.

Se trasvasó a un frasco de polietileno de 2 L de capacidad y se añadieron 12 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de $\text{pH} = 5.30$ y 200 mg de resina Sephadex SP C-25.

Se equilibró la muestra durante 40 minutos, se filtró y se procedió a la medida de su intensidad de fluorescencia de la misma forma en que se describe anteriormente.

Las condiciones operatorias para su medida fueron, en todos los casos: $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.29.

Tabla V.29. Reproducibilidad del empaquetamiento

	$\%IFR_{250 \text{ mL}}$	$\%IFR_{500 \text{ mL}}$	$\%IFR_{1000 \text{ mL}}$
	26.8	34.4	46.8
	27.0	35.1	47.1
	27.3	36.1	47.0
	26.9	35.9	45.9
	27.3	35.8	46.8
	25.9	36.0	45.4
	26.8	34.7	46.7
	26.7	35.1	47.2
	26.9	35.1	45.8
	27.4	36.0	46.7
.....			
$\overline{\%IFR}$	26.9	35.4	46.5
σ_{n-1}	0.43	0.61	0.62
$\%DSR$	1.6	1.7	1.3

Por otra parte, se preparó un blanco que contenía todos los reactivos salvo el Al(III), esto es, a 500 mL de agua bidestilada se adicionaron 6 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético y acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 200 mg de Sephadex SP C.25. Se preparó también otro blanco que sólo contenía el cambiador iónico con 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH = 5.30 y hasta 500 mL de agua bidestilada. Ambas disoluciones fueron sometidas al mismo tratamiento para el estudio de la reproducibilidad del empaquetamiento de la resina.

Las condiciones operatorias en las que se lleva a cal la medida de la intensidad de fluorescencia, son: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Se indican en la tabla V.30 los resultados obtenidos.

Tabla V.30. Reproducibilidad del empaquetamiento

	$\%IFR_{(B)}$	$\%IFR_{(R)}$
	15.7	8.9
	15.2	8.7
	15.6	8.7
	15.5	8.8
	15.4	8.7
	15.1	8.8
	15.4	8.8
	15.8	8.7
	15.5	8.6
	15.0	8.8
.....		
$\% \overline{IFR}$	15.4	8.8
σ_{n-1}	0.26	0.09
$\%DSR$	1.7	1.0

Por tanto, la desviación estandar relativa (DSR) será:

$$DSR = (\sigma_{n-1} / \overline{IFR}) \times 100$$

El estudio de la reproducibilidad del empaquetamiento nos proporciona unos valores de la desviación estandar relativa

de 1.6, 1.7 y 1.3 % para el complejo fijado en el cambiador iónico para un volumen de muestra de 250, 500 mL y 1000 mL, respectivamente, de 1.7 % para el blanco y 1.0 % para la resina sola, en un volumen de 500 mL.

V.9.2.2. Influencia de la centrifugación del sistema sobre la reproducibilidad del empaquetamiento.

Al objeto de disminuir los errores relativos encontrados en el estudio de la reproducibilidad del empaquetamiento del cambiador iónico, se trató de aumentar la compactación de la muestra por centrifugación de la resina en la cubeta. Para ello, en primer lugar, se procede a optimizar las condiciones para la centrifugación.

Para ello, a una serie de matraces aforados de 500 ml se adicionaron 2 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase. Se prepararon también los blancos correspondientes, que contienen todos los reactivos salvo el Al(III).

Se transvasaron a sus frascos de polietileno y se añadió a cada uno de ellos 1.2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Después de agitar durante 15 minutos, filtrar y llenar las cubetas de medida, se centrifugan las cubetas a diferentes tiempos y revoluciones, según se indica en la tabla V.31 y V.32.

La intensidad de fluorescencia se mide en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.2 y temperatura 20°C.

Tabla V.31. Influencia del tiempo de centrifugación.

$V_{\text{centrif}} = 750 \text{ r.p.m.}$

$t \text{ (s)}$	$\%IFR_{(P)}$	$\%IFR_{(B)}$	$\% \Delta IFR$
0	44.0	26.9	17.1
5	43.8	27.2	16.6
10	44.2	25.8	18.4
20	43.8	27.2	16.6
30	42.9	28.8	14.1
40	44.3	27.7	16.6
60	41.9	27.8	14.1
80	40.3	28.4	11.9
90	39.6	27.0	12.6
120	36.4	27.1	9.3

Tabla V.32. Influencia de la velocidad angular sobre la IFR.

$t = 10 \text{ s}$

r. p. m.	$\%IFR_{(P)}$	$\%IFR_{(B)}$	$\% \Delta IFR$
0	43.2	27.9	15.3
750	44.0	28.2	15.8
1500	43.8	27.9	15.9
3000	42.6	27.8	14.8
3750	42.9	26.7	16.2
5000	43.2	28.0	15.2

Los resultados obtenidos en ésta experiencia ponen de manifiesto, que la intensidad de fluorescencia relativa de las muestras apenas se afecta por la centrifugación.

V.9.2.4. Reproducibilidad del empaquetamiento de las muestras centrifugadas

No obstante, las muestras en estudio se centrifugaron en el soporte adecuado durante 10 s y a 750 r.p.m., las cubetas que contenían cada una de las muestras. En todos los casos se han encontrado unos valores de intensidad de fluorescencia similares a los anteriores (tabla V.33). Se comprueba que el proceso de centrifugación no afecta al valor de la desviación estandar relativa en el proceso de empaquetamiento.

Tabla V.33. Reproducibilidad del empaquetamiento de las muestras centrifugadas

	$\%IFR_{(F)}$	$\%IFR_{(B)}$	$\%IFR_{(R)}$
	26.8	15.7	8.9
	27.2	15.6	8.7
	27.0	15.8	8.7
	27.5	15.4	8.8
	26.6	15.4	8.8
	26.2	14.9	8.8
	26.4	15.0	8.8
	26.4	15.3	8.6
	27.3	15.3	8.7
	27.7	14.8	8.9
.....			
$\overline{\%IFR}$	26.9	15.3	8.8
σ_{n-1}	0.51	0.34	0.09
$\%DSR$	1.9	2.2	1.1

Los valores de la desviación estandar relativa es de 1.9 % para el complejo fijado en la resina, 2.2 % para el blanco y 1.1 % para la resina sola.

V.9.2.4. Reproducibilidad del método

Se ha realizado para volúmenes de 250, 500 y 1000 mL de muestra.

En primer lugar se prepararon 10 matraces aforados, en los que se introdujeron 1 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta un volumen final de 250 mL.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 1 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 5 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Para determinar la reproducibilidad del método propuesto para un volumen final de 500 mL, se tomaron 10 matraces aforados en los que se introdujeron 2 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasaron con agua bidestilada.

Una vez en sus frascos de polietileno, se les añadieron 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Por último, se prepararon 10 matraces aforados y se añadió 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasaron con agua bidestilada hasta un volumen final de 1000mL.

Se transvasaron a frascos de polietileno de 2 L de capacidad y se les adicionaron 4 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3} \%$, 20 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1 M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

El procedimiento operatorio seguido, en todos los casos, fué: las disoluciones se agitaron durante 10, 15 y 40 minutos, para cada volumen final respectivamente, y se filtraron, llenándose las cubetas y midiéndose, por último, su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.34.

Tabla V.34. Reproducibilidad del método

	$\%IFR_{250}$	$\%IFR_{500}$	$\%IFR_{1000}$
	17.9	20.8	22.5
	18.3	21.8	23.3
	18.6	21.7	23.1
	18.1	21.5	24.3
	17.0	22.3	22.8
	17.1	21.7	23.6
	18.5	21.8	24.3
	18.2	22.4	23.5
	17.9	21.9	23.9
	18.0	21.7	23.8
.....			
$\overline{\%IFR}$	18.0	21.8	23.4
σ_{n-1}	0.53	0.44	0.63
$\%DSR$	2.9	2.0	2.7

Por consiguiente, la precisión del método para una concentración de Al(III) de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ es de 2,9, 2,0 y 2,7 % para 250, 500 y 1000 mL respectivamente, expresada como error relativo sobre el valor medio (DSR). Según los resultados obtenidos (tabla V.29 y tabla V.34) parece que una de las principales contribuciones a la reproducibilidad es el empaquetamiento del cambiador iónico. La precisión en las medidas de fluorescencia (ruido) es del 0,5%.

Se comprobó asimismo, que el proceso de centrifugación no mejora los resultados para los tres volúmenes ensayados.

V.9.3. LIMITES DE DETECCION Y DETERMINACION DE LOS METODOS PROPUESTOS

Para su establecimiento se ha seguido el criterio de la I.U.P.A.C. (171), que ha sido expuesto con anterioridad en el capítulo IV de esta Memoria Doctoral.

Para determinar el límite de detección del método propuesto para volúmenes de 250, 500 y 1000 mL, se prepararon en primer lugar, 10 matraces aforados de 250 mL que contenían agua bidestilada. Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno, y se les añadieron 1 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

A continuación se transvasaron a frascos de polietileno, 10 matraces de agua bidestilada de 500 mL y se añadieron 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Por último, para un volumen de 1000 mL se adicionaron 4 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Las disoluciones se agitaron durante 10, 15 y 40 minutos, respectivamente para cada volumen final, a continuación se filtraron y se llenaron las cubetas de medida.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

En la tabla V.35 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla V.35. Límite de detección y de determinación

Muestra	%IFR ₂₅₀	%IFR ₅₀₀	%IFR ₁₀₀₀
1	17.4	18.5	20.5
2	17.9	18.6	20.2
3	17.8	18.9	19.8
4	17.5	18.4	19.6
5	17.6	17.5	20.0
6	17.8	17.7	19.8
7	17.5	17.9	19.5
8	18.1	17.9	19.7
9	17.4	18.1	19.8
10	17.2	18.4	20.6
$\overline{\%IFR}$	17.6	18.2	20.0
σ_{n-1}	0.27	0.44	0.37
$C_L (\mu\text{g. L}^{-1})$	0.05	0.04	0.03
$C_Q (\mu\text{g. L}^{-1})$	0.18	0.12	0.07

Por lo tanto, si la intensidad de fluorescencia en una muestra de 250 mL es $IFR > 17.6 + (3 \times 0.27) = 18.4$, en una muestra de 500 mL es $IFR > 18.2 + (3 \times 0.44) = 19.5$ y en una de 1000 mL es $IFR > 20.0 + (3 \times 0.37) = 21.1$, podemos afirmar con una certeza del 99,86% que el aluminio está presente en dicha muestra.

El límite de detección ($k = 3$) obtenido a partir de:

$$C_L = k \cdot \sigma_{n-1} / m$$

siendo m la pendiente de la recta de calibrado para cada volumen considerado, es de 0.05, 0.04 y 0.03 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) para 250, 500 y 1000 mL de muestra, respectivamente.

El límite de determinación ($k = 10$) obtenido de:

$$C_D = k \cdot \sigma_{n-1} / m$$

es de 0.18, 0.12 y 0.07 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) para 250, 500 y 1000 mL de muestra, respectivamente.

V.9.3.1. Comparación con otros métodos

El método se compara con los propuestos en la literatura que emplean morina para la determinación fluorimétrica de aluminio y que se indican en la tabla V.36.

Tabla V.36. Límite de detección de métodos que emplean morina

<i>procedimiento</i>	<i>límite de detección</i> ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	<i>referencia</i>
disolución	0.25	(74)
agente surfactante	0.2	(127)
extracción en MIBK	0.2	(73)
extracción en MIBK	0.1	(34)
FCI	0.04	ésta Memoria

También se compara con los métodos basados en la formación de quelatos para la determinación fluorimétrica de aluminio. Para la comparación hemos escogido aquellos métodos que son más sensibles y se indican en la tabla V.37. De la observación de las tablas V.36 y V.37 puede deducirse que el método por FCI es el que menor límite de detección presenta de todos ellos.

Tabla V.37. Métodos fluorimétricos para la determinación de Al(III) en disolución

Reactivo	Límite de detección ^a ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	Referencia
2,2'-Dihidroxi-azobenceno ^b	0.5	(204)
Sulfonaftolazoresorcinol	0.5	(205)
Ac. 8-Hidroxi-quinoline-5-sulfónico ^c	0.4	(206)
Ac. 4-Metoxibenzoico 2-hidroxi- -1-naftilmetilén hidrazida	0.4	(207)
2-(Resorcilidenamino)fenol	0.4	(208)
Ac. σ -(Salicilidenamino)- -2-hidroxi-bencenosulfónico	0.4	(184)
Saliciliden- σ -aminofenol ^b	0.27	(209)
σ -(Salicilidenamino)-3- -hidroxi-fluoreno	0.27	(210)
Ac. 4-Hidroxi-benzoico 2-hidroxi- -1-naftilmetilén hidracida	0.2	(211)
3-(4-Metilsalicilidenamino)- <i>m</i> -cresol	0.2	(182)
<i>N</i> -Saliciliden-2-hidroxi- 4-carboxianilina	0.2	(212)
<i>N</i> -Saliciliden-2-hidroxi- 4-cloroanilina	0.2	(212)
2,4-Dihidroxi-benzaldehído semicarbazona	0.08	(213)
<i>N</i> -Saliciliden-2-hidroxi- -5-sulfoanilina	0.08	(212)
Morina - IEF	0.04	ésta Memoria

^a o concentración mínima usada para el calibrado.

^b procedimiento de extracción.

^c reacción cinética.

V.9.4. SENSIBILIDAD DE LOS METODOS PROPUESTOS

Basandonos en el concepto de sensibilidad de un procedimiento analítico, ya definido en el capítulo IV, y utilizando los datos aportados por las experiencias anteriores (curvas de calibrado) hemos realizado el cálculo de la sensibilidad de este método para los distintos volúmenes de disolución empleados, encontrando los resultados que se recogen en la tabla V.38.

Tabla V.38. Sensibilidad analítica

<i>Volumen disolución (mL)</i>	<i>sensibilidad analítica ($\mu\text{g. L}^{-1}$)</i>
250	0.035
500	0.012
1000	0.013

V.9.5. RESUMEN DE LOS PARAMETROS ANALITICOS

En la tabla V.39 se resumen los parámetros analíticos encontrados en el estudio del complejo Al(III) morina fijado en Sephadex SP C-25.

Tabla V.39. Parámetros analíticos

Parámetros analíticos	Volumen de muestra		
	250 mL	500 mL	1000 mL
ordenada en el origen	-1.24	-0.08	1.94
pendiente	15.10	35.90	48.35
rango lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.4-1.6	0.4-1.6	0.2-1.2
coeficiente de correlación	0.991	0.999	0.997
límite de detección ($k = 3$) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.05	0.04	0.03
límite de determinación ($k = 10$) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.18	0.12	0.07
RSD (%)	2.9	2.0	2.7
sensibilidad analítica	0.035	0.012	0.013

INFLUENCIA DE IONES EXTRANOS

V.10.1. INFLUENCIA DE IONES EXTRAÑOS

Se ha estudiado la influencia que la presencia de los iones, más frecuentes en aguas, causa en la determinación de Al(III) por el método operatorio propuesto en fase gel. Se han elegido estos iones porque es precisamente en aguas, naturales o no, donde pretendemos aplicar el método.

Para llevar a cabo el estudio, se preparó una serie de matraces aforados de 500 mL para cada ión ensayado, que contenían en todos los casos $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) y concentraciones crecientes de aquel. Estas disoluciones fueron tratadas en la misma forma que se indica en el proceso operatorio.

De la medida de la intensidad de fluorescencia del sistema y con la ayuda de la recta de calibrado se determinó en cada caso el error relativo de aquella.

Hemos admitido como límite de tolerancia para el ión extraño, la concentración de éste que origina un error relativo del 5%. No interfiriendo, por tanto, aquellas concentraciones de ión extraño que producían un error igual o inferior a ése valor.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas V.39-V.48 y en las figuras V.31-V.40.

Tabla V.39. Interferencia de NO_3^- para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	$C(\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Al(III)}}(\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/\text{Al(III)})$	Er (%)
NO_3^-	0.4	0.4	0	-0.4
	4	0.4	1	0.8
	40	0.4	2	1.9
	400	0.4	3	2.5
	4000	0.4	4	4.8

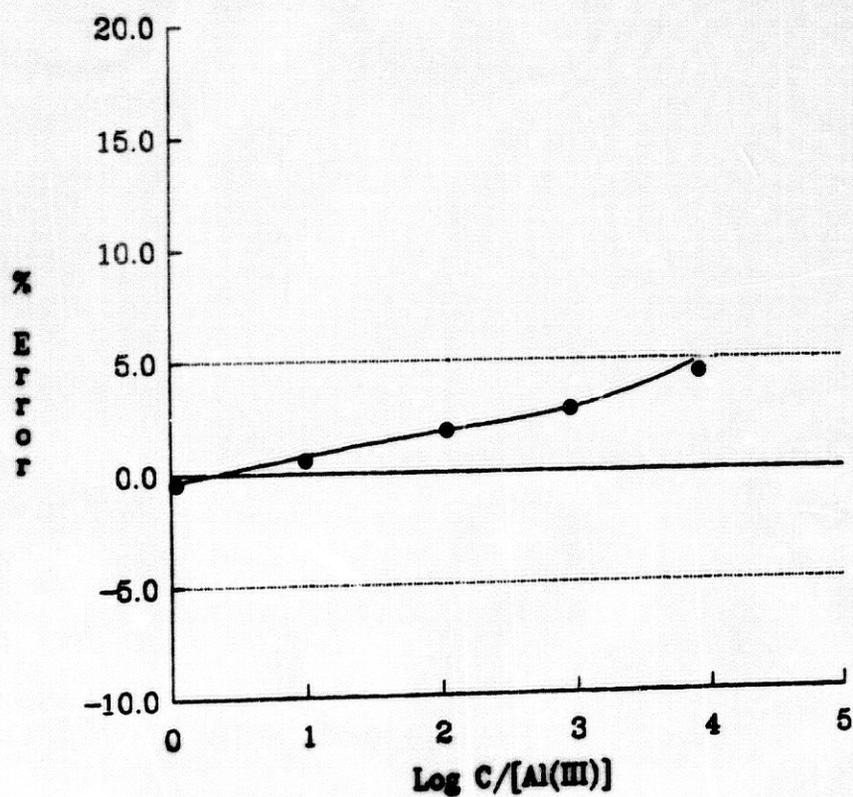


Figura V.31. Influencia de NO_3^-

Tabla V.40. Interferencia de Cl^- para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	$C(\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Al(III)}}(\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Al(III)}})$	Er(%)
Cl^-	0.4	0.4	0	3.8
	4	0.4	1	3.1
	40	0.4	2	3.8
	400	0.4	3	3.8
	4000	0.4	4	19.2

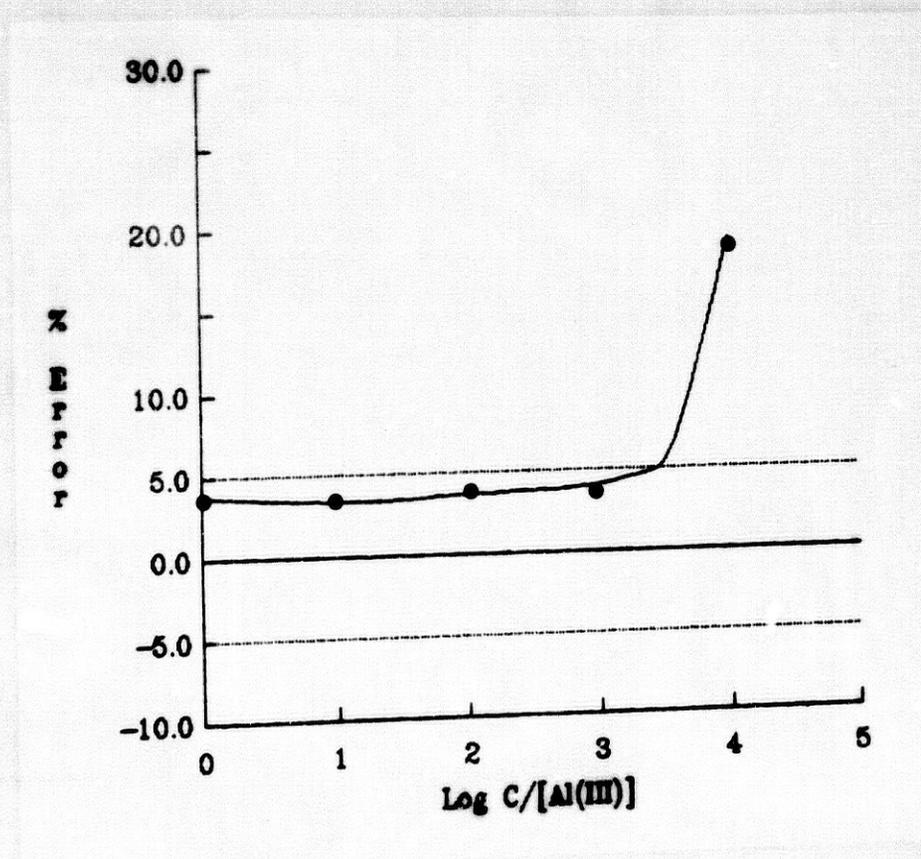


Figura V.32. Influencia de Cl^-

Tabla V.41. Interferencia de F^- para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	$C(\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Al(III)}}(\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/\text{Al(III)})$	Er (%)
F^-	0.4	0.4	0	0
	1	0.4	0.4	-5.1
	4	0.4	1	-17.2
	10	0.4	1.4	-49.0
	40	0.4	2	-169.6
	400	0.4	3	-167.5
	4000	0.4	4	-537.3

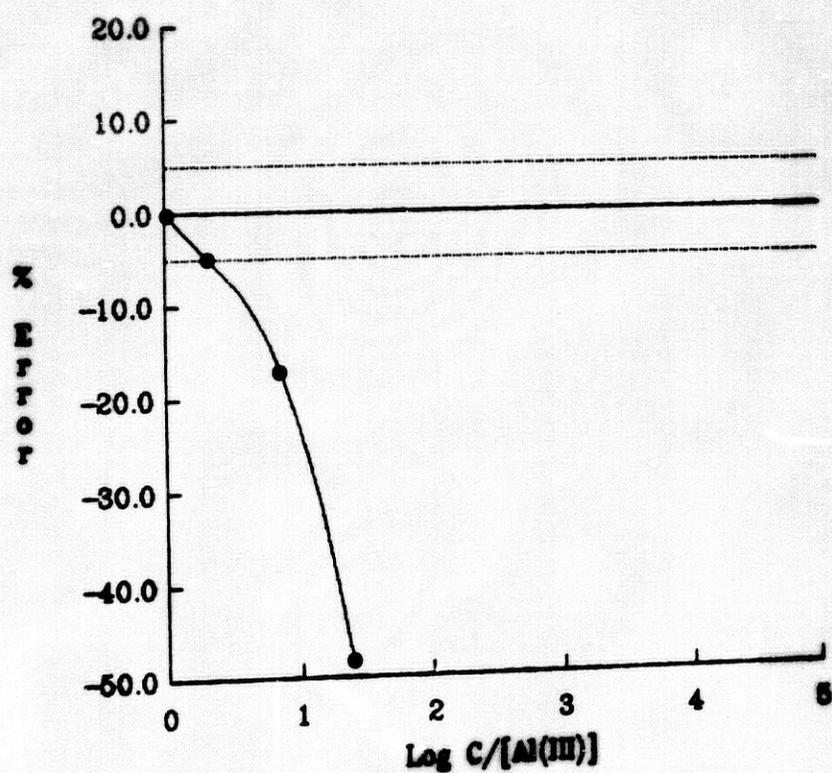


Figura V.33. Influencia de F^-

Tabla V.42. Interferencia de SO_4^{2-} para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Al(III)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Al(III)}})$	Er (%)
SO_4^{2-}	0.4	0.4	0	-1.9
	4	0.4	1	-2.1
	40	0.4	2	-3.9
	400	0.4	3	-7.3
	4000	0.4	4	-17.4

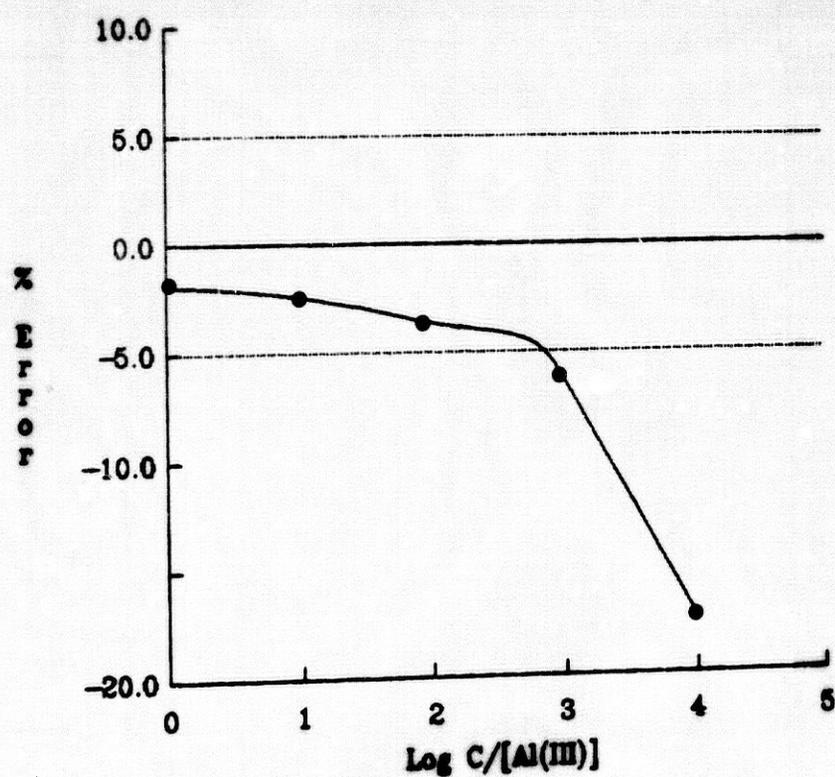


Figura V.34. Influencia de SO_4^{2-}

Tabla V.43. Interferencia de CO_3^{2-} para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	$C_{\text{Al(III)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/\text{Al(III)})$	Er (%)
CO_3^{2-}	0.4	0.4	0	1.3
	4	0.4	1	-0.3
	40	0.4	2	-2.4
	400	0.4	3	-2.3
	4000	0.4	4	-2.4

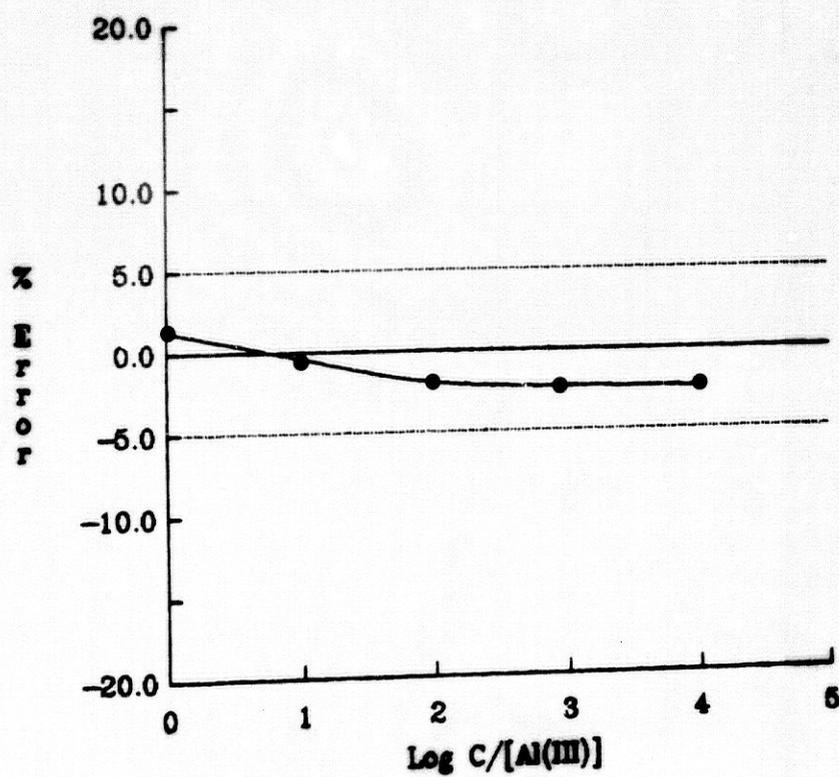


Figura V.35. Influencia de CO_3^{2-}

Tabla V.44. Interferencia de Ca(II) para una concentración de 0.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	C _{Al(III)} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	log (C/C _{Al(III)})	Er (%)
Ca(II)	0.4	0.4	0	2.8
	4	0.4	1	3.2
	40	0.4	2	4.9
	400	0.4	3	5.2
	2000	0.4	3.7	15.9

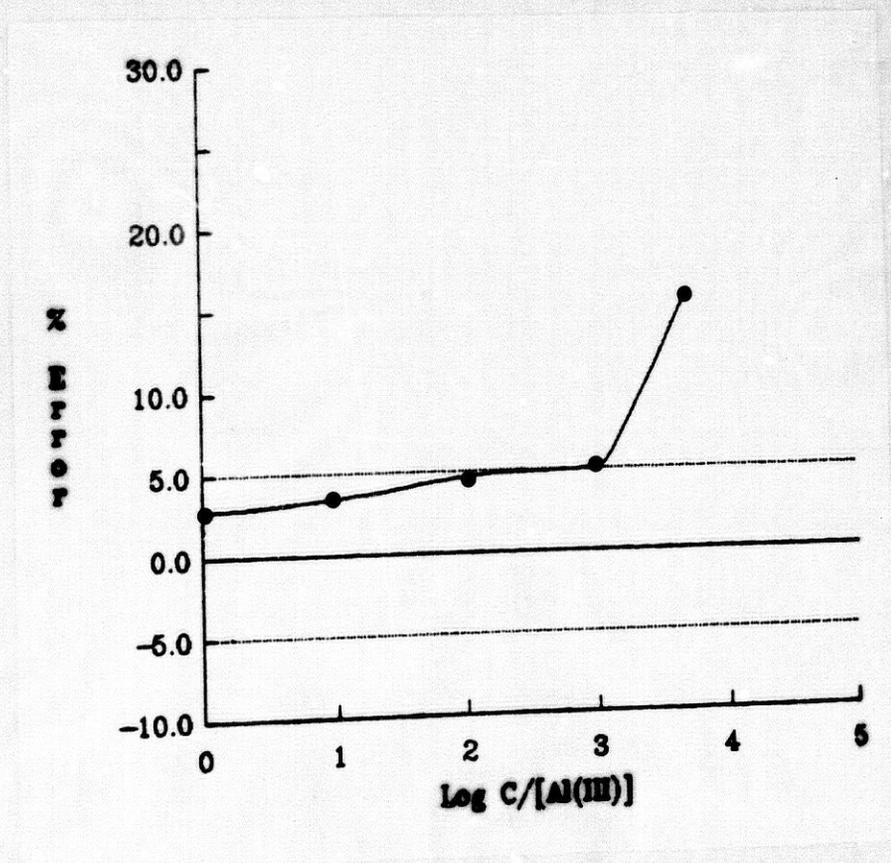


Figura V.36. Influencia de Ca(II)

Tabla V.45. Interferencia de Fe(III) para una concentración de 0.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	C _{Al(III)} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	log (C/C _{Al(III)})	Er (%)
Fe(III)	0.4	0.4	0	1.7
	4	0.4	1	-6.3
	40	0.4	2	-95.3
	400	0.4	3	-253.0
	4000	0.4	4	-1026.9

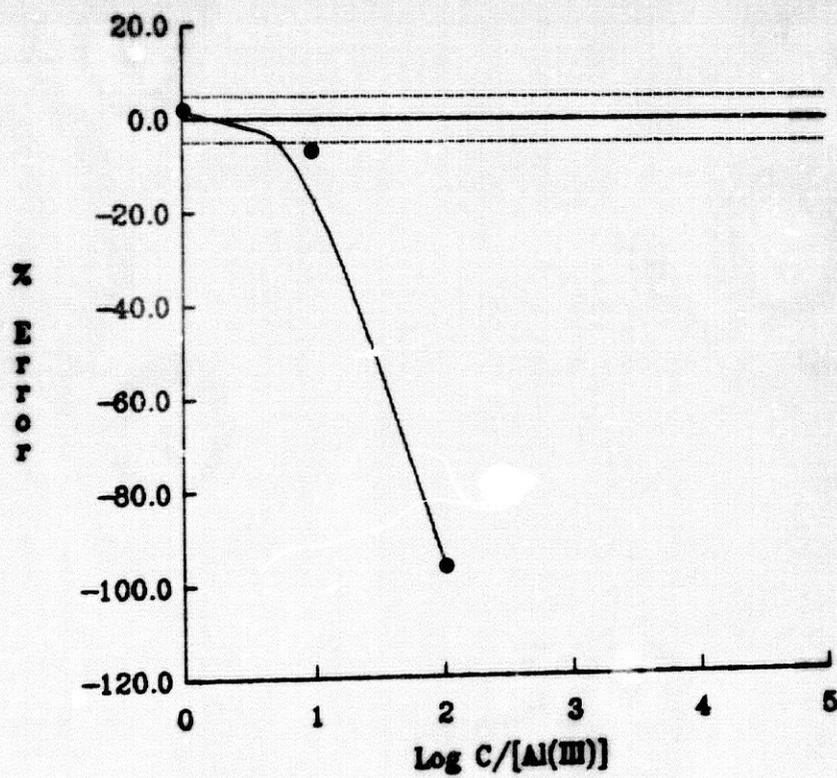


Figura V.37. Influencia de Fe(III)

Tabla V.46. Interferencia de Mg(II) para una concentración de 0.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	C _{Al(III)} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	log (C/Al(III))	Er (%)
Mg(II)	0.4	0.4	0	2.5
	4	0.4	1	2.9
	40	0.4	2	4.1
	400	0.4	3	4.7
	4000	0.4	4	19.3

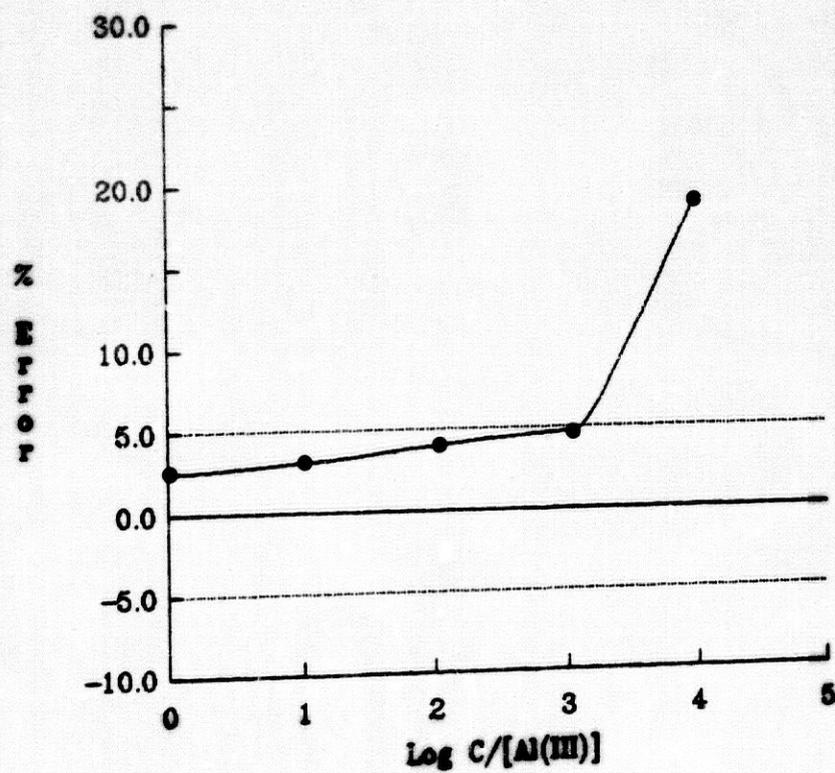


Figura V.38. Influencia de Mg(II)

Tabla V.47. Interferencia de Cu(II) para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	C _{Al(III)} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	log (C/CAI(III))	Er (%)
Cu(II)	0.4	0.4	0	-1.9
	4	0.4	1	-2.6
	20	0.4	1.7	-5.0
	40	0.4	2	-12.2
	400	0.4	3	-50.5
	4000	0.4	4	-392.2

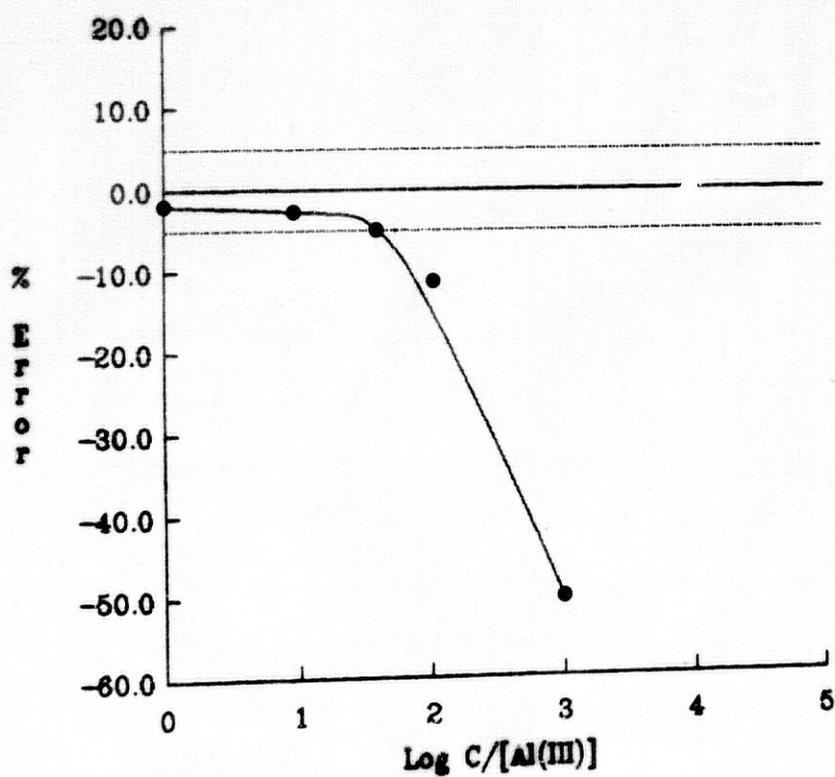


Figura V.39. Influencia de Cu(II)

Tabla V.48. Interferencia de PO_4^{3-} para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Aluminio

Ión	$C(\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Al(III)}}(\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/\text{Al(III)})$	Er(%)
PO_4^{3-}	0.4	0.4	0	-0.5
	4	0.4	1	-3.8
	40	0.4	2	-4.8
	400	0.4	3	-14.8
	4000	0.4	4	-55.2

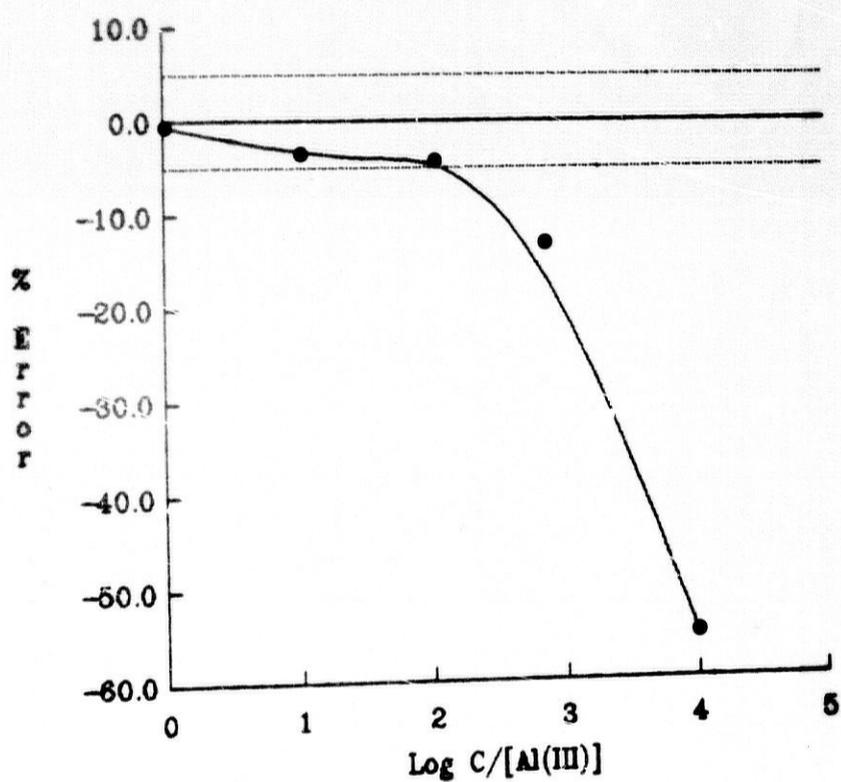


Figura V.40. Influencia de PO_4^{3-}

En la tabla V.49, se resumen los datos de tolerancia para los distintos iones extraños, obtenidos a partir de las figuras V.31-V.40, con el criterio adoptado.

Tabla V.49. Tolerancia de los iones extraños

Ión extraño	Tolerancia ($\mu\text{g. L}^{-1}$)
$\text{CO}_3^{2-}, \text{NO}_3^-$	>4000
Cl^-	800
Mg(II)	500
Ca(II)	400
SO_4^{2-}	300
PO_4^{3-}	50
Cu(II)	10
$\text{F}^-, \text{Fe(III)}$	1

De la observación de la anterior tabla V.49 y figuras V.31-V.40, puede deducirse:

- No interfiere en relación en peso (w/w) ión extraño/Al(III) superior a 10000: CO_3^- y NO_3^- .
- Presentan interferencia moderada: Cl^- , Mg(II) y Ca(II) cuya relación molar en peso está comprendida entre 2000 y 1000.
- SO_4^{2-} y PO_4^{3-} presentan una interferencia para una relación molar en peso de 500 y 125, respectivamente.
- Causan una gran interferencia la presencia de los iones Cu(II) , F^- y Fe(III) .
- La interferencia es positiva para Ca(II) y Mg(II) y negativa para otras especies.

La concentración de aluminio en las aguas a analizar es superior al rango de aplicabilidad del método, esto es, entre 0.4 y 1.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por esto, es posible la aplicación directa del método a la determinación de aluminio en aguas naturales, ya que la dilución de la muestra rebaja también la concentración de los posibles iones interferentes. Dado el rango de aplicabilidad del método propuesto y el nivel medio de aluminio en las muestras de agua, habitualmente analizadas en nuestro laboratorio, es necesario realizar una dilución previa.

APLICACIONES ANALITICAS

V.11.1. APLICACIONES ANALITICAS

Hemos aplicado el método propuesto que emplea la técnica FCI para la determinación de Al(III) en aguas de diversas procedencias. Como ejemplos se han seleccionado tres tipos: *agua de manantial*, de la que se eligieron dos, una de media mineralización (Lanjarón) y otra de baja (Ortigosa del Monte), *agua de pantano* y *agua urbana tratada*.

En todos los casos se ha empleado un pequeño volumen de agua que se ha diluido hasta 500 mL con agua bidestilada para el análisis de las muestras y el método de adición de patrón y/o la medida directa referida a la recta de calibrado, para determinar el contenido de Al(III) en las mismas.

V.11.1.1. Procedimiento propuesto para el análisis de aguas

En un matraz de 500 mL se añade un volumen de muestra que contenga la cantidad de aluminio comprendida en el rango de aplicación del método propuesto ($0.4-1.6 \mu\text{g.L}^{-1}$) y se enrasa con agua bidestilada. Se transfiere a un frasco de polietileno y se añaden 2 mL de disolución etanólica de morina de $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

La mezcla se agita mecánicamente durante 15 minutos, y los siguientes pasos son los que se indican en el procedimiento

operatorio. Se emplea el método de adición de patrón o la medida directa referida a la recta de calibrado, para determinar el contenido de Al(III) en las aguas.

V.11.1.2. Método de referencia

Se ha empleado como método de referencia la determinación de Aluminio por Absorción atómica con llama de óxido nitroso-acetileno. Se basa en la formación de un complejo quelato por la adición de 8-hidroxiquinoleína al agua que contiene aluminio y su posterior extracción en metilisobutilcetona (191).

Para su análisis se toman 200 mL de la muestra a analizar y se trasvasan a un embudo de decantación de 500 mL. Se añaden 2 mL de oxina, 10 mL de tampón $\text{AcNH}_4/\text{NH}_4\text{OH}$ y 10 mL de metilisobutilcetona. A continuación se agita durante 30 segundos, se decanta y se recoge la fase orgánica, determinándose en ella el contenido de aluminio. La medida se realiza a $\lambda = 309.3 \text{ nm}$ y rendija = 0.7 nm. Previamente se realiza una recta de calibrado, siguiendo el mismo procedimiento.

V.11.1.3. Determinación de Al(III) en aguas de manantial

Se han empleado dos tipos de aguas de manantial, agua de Ortigosa del Monte (Segovia) y de Lanjarón (Granada), comercializada bajo los nombres de Bezoya y Lanjarón, respectivamente. Se han seleccionado como ejemplos de aguas de baja y media mineralización.

1.- AGUA DE ORTIGOSA DEL MONTE

En primer lugar se ha aplicado el método propuesto al agua de manantial de Ortigosa del Monte, cuya composición media

en componentes mayoritarios y técnica aplicada para su determinación se ha indicado en el capítulo anterior.

Mediante el método de referencia se determina la concentración de Al(III) que se indica en la tabla V.50.

Tabla V.50. Contenido de Al(III) en el agua mineral de Ortigosa del Monte. Método de referencia.

=====
Al(III) $\mu\text{g. L}^{-1}$
=====
14.6
13.7
15.2
.....
14.5 \pm 0.8
.....
% DSR = 5.5
=====

Este valor permite diluir la muestra de agua hasta una concentración de Al(III) comprendida en la recta de calibrado. De ésta forma las concentraciones de los otros componentes también se rebajan, por lo que su contenido no constituye interferencia en la aplicación directa del método, de acuerdo con la tabla de tolerancias (tabla V.49).

V.11.1.3.1. Método analítico empleado y resultados

Para llevar a cabo el contraste del procedimiento analítico propuesto se han ensayado dos métodos, el de la medida directa referida a la recta de calibrado y el de la recta de calibrado por adición de patrón.

- MEDIDA DIRECTA

Para la determinación del contenido de Al(III) en el agua a analizar por el método propuesto, se tomaron 20 mL de la misma y agua bidestilada hasta 500 mL. A continuación se añadieron 2 ml de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se agitó durante 15 minutos, continuando el procedimiento tal y como se describe en el método operatorio.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Se hicieron tres determinaciones consecutivas de la muestra y los valores de intensidad de fluorescencia se trasladaron a la recta de calibrado obtenida previamente, cuyos resultados se indican en la tabla V.51.

Tabla V.51. Recta de calibrado

ppb Al(III)	%IFR
0	20.8
0.4	33.1
0.8	45.2
1.2	57.6
1.6	70.1

Esta recta corresponde a la siguiente ecuación, una vez ajustada por mínimos cuadrados:

$$\text{IFR} = 30.10 [\text{Al(III)}] + 20.74 \quad r = 0.999$$

donde la [Al(III)] viene dada en $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de Al(V) se indican en la tabla V.52.

Tabla V.52. Determinación de Al(III)

<i>Vol. problema (mL)</i>	<i>Vol. agua bidest. (mL)</i>	<i>%IFR</i>	<i>ppb Al(III)</i>
20	hasta 500	38.3	0.57
20	hasta 500	38.6	0.58
20	hasta 500	37.8	0.55

Una vez corregidas las diluciones, la concentración de Al(III) encontrado se indica en la tabla V.53 junto con el estudio estadístico.

Tabla V.53. Contenido de Al(III) en el agua mineral de Ortigosa del Monte. Medida directa referida a la recta de calibrado.

=====
Al(III) $\mu\text{g.L}^{-1}$
=====
14.25
14.50
13.75
.....
14.17 \pm 0.38
.....
% DSR = 2.8
=====

- ADICION DE PATRON

Se ha determinado asimismo el contenido de Al(III) por calibración por adición de patrón. Las experiencias se llevaron a cabo tomando, en cuatro matraces aforados, 20 mL de agua a analizar diluida hasta 500 mL con agua bidestilada y se añaden a cada uno de ellos 0, 1, 2 y 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} . A continuación se adicionan 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25. Se preparó también un blanco de agua bidestilada que no contenía aluminio.

Se agitan durante 15 minutos y se sigue el procedimiento descrito en el método operatorio.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos, se realizaron tres determinaciones simultáneas.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$,

rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla V.54, y se han representado graficamente en la figura V.41.

Tabla V.54. Recta de calibrado por adición de patrón

Vol. Problema (mL)	Vol. Agua Bidest. (mL)	Al(III) añadido ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%IFR
--	500	---	21.8
20	hasta 500	---	37.1
20	"	0.2	41.4
20	"	0.4	46.3
20	"	0.8	54.6
.....			
--	500	---	21.2
20	hasta 500	---	38.0
20	"	0.2	42.5
20	"	0.4	47.3
20	"	0.8	54.2
.....			
--	500	---	21.6
20	hasta 500	---	37.2
20	"	0.2	43.0
20	"	0.4	48.1
20	"	0.8	56.5

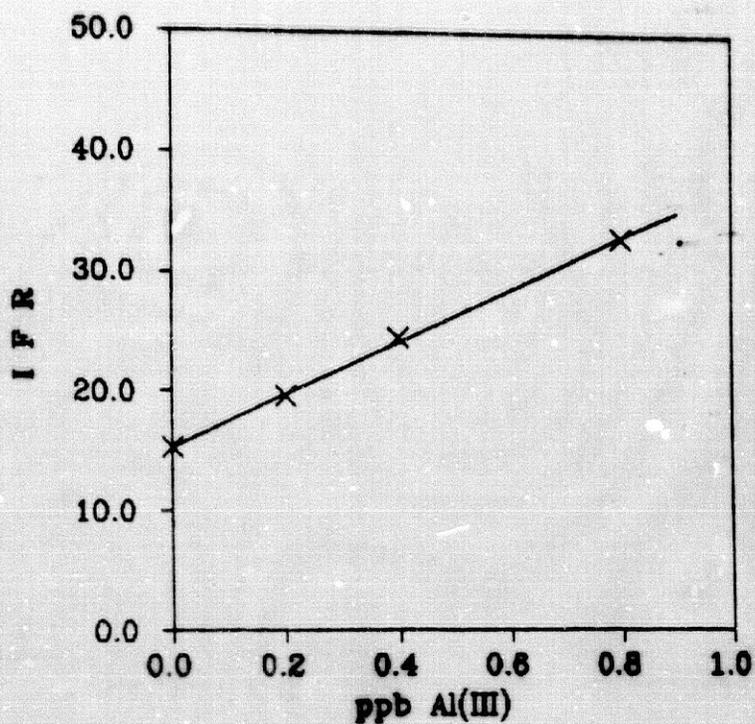


Figura V.41. Recta de calibrado por adición de patrón

Ajustando las rectas obtenidas por mínimos cuadrados se obtienen las siguientes funciones que corresponden a una concentración de aluminio que se indica en la tabla V.55.

Tabla V.55.

$IFR = f[Al(III)]$	coef. correlac.	$[Al(III)]$ ($\mu g. L^{-1}$)
$IFR = 15.36 + 21.97 [Al(III)]$	0.999	0.69
$IFR = 16.29 + 26.70 [Al(III)]$	0.995	0.65
$IFR = 16.24 + 23.88 [Al(III)]$	0.997	0.63

Una vez corregidas las diluciones, la concentración de Al(III) encontrado se indica en la tabla V.56 junto con el estudio estadístico.

Tabla V.56. Contenido de Al(III) en el agua mineral de Ortigosa del Monte. Recta de calibrado por adición de patrón.

Al(III) $\mu\text{g. L}^{-1}$
17.25
16.25
15.75
.....
16.42 \pm 0.76
.....
% DSR = 4.9

En la determinación de aluminio por el método propuesto se observa que las pendientes de la recta de calibrado y de la recta de calibrado por adición de patrón son del mismo orden. La relación de pendientes es de 1.1.

2.- AGUA DE LANJARON

Se ha aplicado el método propuesto al agua de Lanjarón, cuya composición media en componentes mayoritarios y técnica aplicada para su determinación, se dió en el capítulo IV.

Por el método de referencia se determina una concentración de Al(III) que se indica en la tabla V.57.

Tabla V.57. Contenido de Al(III) en el agua mineral de Lanjarón.
Método de referencia.

=====
Al(III) $\mu\text{g. L}^{-1}$
=====
5.0
4.8
5.3
.....
5.0 \pm 0.3
.....
% DSR = 6.0
=====

Es necesario diluir la muestra para que la concentración esté comprendida en la recta de calibrado. El resto de los componentes se diluyen en la misma proporción por lo que su concentración se hace inferior al límite de tolerancia permitido por el método propuesto (tabla V.49).

V.11.1.3.2. Método analítico y resultados

Se ha empleado el de la recta de calibrado por adición de patrón.

- ADICION DE PATRON

Se ha determinado el contenido de Al(III) por el método de la recta de calibrado por adición de patrón. Las experiencias se llevaron a cabo tomando, en cuatro matraces aforados, 50 mL de agua a analizar diluida hasta 500 mL con agua bidestilada y se añaden a cada uno de ellos 0, 1, 2 y 4 mL de

disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} . A continuación se adicionan 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25. Se preparó también un blanco de agua bidestilada que no contenía aluminio.

Se agitan durante 15 minutos y se sigue el procedimiento descrito en el método operatorio.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos, se realizaron tres determinaciones simultáneas.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 496 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla V.58, y se han representado graficamente en la figura V.42.

Tabla V.58. Recta de calibrado por adición de patrón.

<i>Vol. Problema</i> (mL)	<i>Vol. Agua Bidest.</i> (mL)	<i>Al(III) añadido</i> ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>%IFR</i>
--	500	---	17.7
50	hasta 500	---	26.5
50	"	0.2	29.4
50	"	0.4	32.8
50	"	0.8	39.7
.....			
--	500	---	17.7
50	hasta 500	---	26.4
50	"	0.2	29.1
50	"	0.4	31.8
50	"	0.8	39.1
.....			
--	500	---	16.5
50	hasta 500	---	25.6
50	"	0.2	28.8
50	"	0.4	33.3
50	"	0.8	40.4

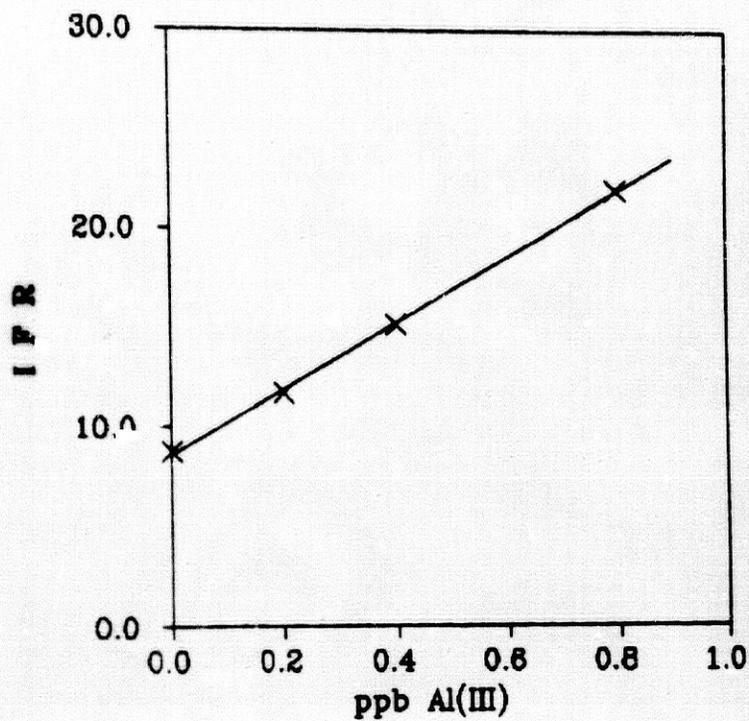


Figura V.42. Recta de calibrado por adición de patrón

Ajustando las rectas obtenidas por mínimos cuadrados se obtienen las siguientes funciones que corresponden a una concentración de aluminio que se indica en la tabla V.59.

Tabla V.59

$IFR = f[Al(III)]$	coef. correlac.	$[Al(III)]$ ($\mu g. L^{-1}$)
$IFR = 8.58 + 16.63 [Al(III)]$	0.999	0.54
$IFR = 8.32 + 15.94 [Al(III)]$	0.996	0.57
$IFR = 8.96 + 17.04 [Al(III)]$	0.999	0.54

Una vez corregidas las diluciones, la concentración de Al(III) encontrado se indica en la tabla V.60 junto con el estudio estadístico.

Tabla V.60. Contenido de Al(III) en el agua mineral de Lanjarón.
Recta de calibrado por adición de patrón.

Al(III) $\mu\text{g. L}^{-1}$
5.40
5.70
5.40
.....
5.50 \pm 0.17
.....
% DSR = 3.1

Al realizar la determinación de Al(III) mediante el método de adición de patrón, puede observarse una disminución en la pendiente con respecto a la de la recta de calibrado. Esta pérdida de sensibilidad debida al efecto matriz puede evaluarse por el cociente entre las pendientes de la recta de calibrado y las rectas de calibrado por adición de patrón. El valor encontrado es de 2.2.

V.11.1.4. Determinación de Al(III) en agua de pantano

El agua procede del pantano de Quentar (Granada), dónde se recogió con fecha de 28 de Junio de 1988. En el momento de la toma de muestra se añadió HNO₃ conc. como conservante (0.25 mL/1000 mL). Ya en el laboratorio se filtró a través de una membrana de Millipore de 0.45 µm, y se almacenó en un frasco de polietileno perfectamente limpio y a 4°C.

La muestra de agua recogida para el estudio se analizó previamente, mediante las técnicas adecuadas en cada caso, que ya se describen en el capítulo IV, y presenta el contenido que se indica en la siguiente tabla V.61.

Tabla V.61. Contenido del agua de pantano

<i>Especie</i>	<i>Concentración (mg. L⁻¹)</i>	<i>Técnica aplicada</i>
Calcio (Ca ²⁺)	23.0	Absorción Atómica (191)
Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	21.5	Turbidimetría (190)
Magnesio (Mg ²⁺)	14.3	Absorción Atómica (191)
Silice (SiO ₃ ²⁻)	5.8	Espectrofotomet. (190)
Nitratos (NO ₃ ⁻)	2.6	Polarografía (192)
Hierro (Fe ³⁺)	0.027	Absorción Atómica (191)
Fosfatos (PO ₄ ³⁻)	<0.07	Espectrofotomet. (190)

El contenido en Al(III) en el agua de pantano por el método de referencia se indica en la tabla V.62.

Tabla V.62. Contenido de Al(III) en el agua de pantano. Método de referencia.

=====
Al(III) $\mu\text{g.L}^{-1}$
=====
18.3
19.6
17.4
.....
18.4 \pm 1.1
.....
% DSR = 6.0
=====

Como en los casos anteriores es necesario diluir la muestra hasta que la concentración de aluminio esté comprendida en el rango de la recta de calibrado establecida.

V.11.1.4.1. Método analítico y resultados

Como método analítico se ha empleado el de la recta de calibrado por adición de patrón.

- ADICION DE PATRON

La experiencia se llevó a cabo tomando, en cuatro matraces aforados, 10 mL de agua a analizar y agua bidestilada hasta 500 mL. Se añaden a cada uno de ellos 0, 1, 2 y 3 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} y a continuación se adicionan 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de

pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25. Se preparó también un blanco de agua bidestilada que no contenía aluminio.

Se agitan durante 15 minutos y se sigue el procedimiento que se describe en el método operatorio.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos, se realizaron tres determinaciones simultáneas.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: λ_{exc} = 426 nm, λ_{em} = 496 nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla V.63, y se han representado graficamente en la figura V.43.

Tabla V.63. Recta de calibrado por adición de patrón.

Vol. Problema (mL)	Vol. Agua Bidest. (mL)	Al(III) añadido ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%IFR
--	500	---	30.1
10	hasta 500	---	48.1
10	"	0.2	56.9
10	"	0.4	66.7
10	"	0.6	75.9
.....			
--	500	---	22.3
10	hasta 500	---	39.0
10	"	0.2	47.2
10	"	0.4	57.8
10	"	0.6	66.0
.....			
--	500	---	25.6
10	hasta 500	---	45.3
10	"	0.2	54.9
10	"	0.4	64.3
10	"	0.6	72.9

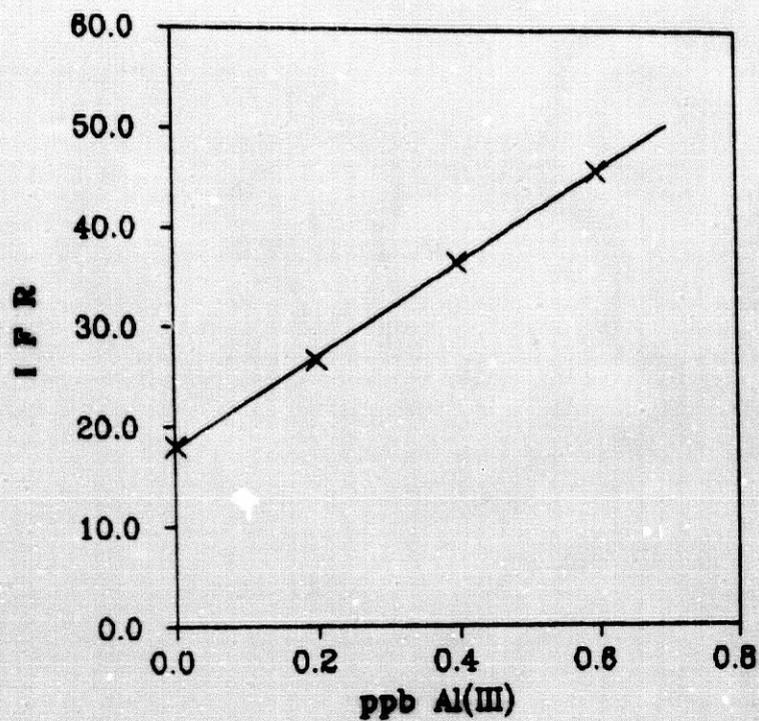


Figura V.43. Recta de calibrado por adición de patrón

Ajustando las rectas obtenidas por mínimos cuadrados se obtienen las siguientes funciones que corresponden a una concentración de aluminio que se indica en la tabla V.64.

Tabla V.64.

$IFR = f[Al(III)]$	coef. correlac.	$[Al(III)]$ ($\mu g. L^{-1}$)
$IFR = 17.82 + 46.60 [Al(III)]$	0.999	0.39
$IFR = 16.46 + 45.80 [Al(III)]$	0.999	0.37
$IFR = 19.92 + 46.10 [Al(III)]$	0.999	0.42

Una vez corregidas las diluciones, la concentración de Al(III) encontrado se indica en la tabla V.65 junto con el estudio estadístico.

Tabla V.65. Contenido de Al(III) en el agua de pantano. Recta de calibrado por adición de patrón.

Al(III) $\mu\text{g.L}^{-1}$
19.50
18.50
21.00
.....
19.67 \pm 1.26
.....
% DSR = 6.6

Al realizar la determinación de Al(III) en el agua bruta mediante el método de adición de patrón, se observó un incremento en la pendiente con respecto a la de la recta de calibrado. El cociente es del orden de 0.8.

V.11.1.5. Determinación de Al(III) en agua urbana

Para la toma de muestra de agua urbana de Granada, con fecha de 31 de Mayo de 1988, se dejó fluir el agua durante un periodo de tiempo de 15 minutos que se estimó conveniente para conseguir que la muestra fuera representativa. A continuación se

añadió HNO_3 conc. como conservante (0.25 mL/1000mL) y se almacenó en un frasco de polietileno perfectamente limpio a 4°C .

La muestra de agua reservada para el estudio se analizó previamente, mostrando el contenido en los componentes mayoritarios que se indica en la tabla V.66, así como la técnica empleada en cada caso para su análisis.

Tabla V.66. Contenido del agua urbana

Espece	Concentración (mg. L ⁻¹)	Técnica aplicada
Calcio (Ca^{2+})	25.6	Absorción Atómica (191)
Sulfatos (SO_4^{2-})	14.5	Turbidimetría (190)
Magnesio (Mg^{2+})	6.0	Absorción Atómica (191)
Silice (SiO_3^{2-})	5.3	Espectrofotomet. (190)
Nitratos (NO_3^-)	4.9	Polarografía (192)
Hierro (Fe^{3+})	0.020	Absorción Atómica (191)
Fosfatos (PO_4^{3-})	<0.07	Espectrofotomet. (190)

Por absorción atómica el contenido de aluminio determinado se indica en la tabla V.67.

Tabla V.67. Contenido de Al(III) en el agua urbana. Método de referencia.

=====
Al(III) $\mu\text{g. L}^{-1}$
=====
148.5
156.9
165.9
.....
157.1 \pm 8.7
.....
% DSR = 5.5
=====

Es necesario, por tanto, diluir suficientemente la muestra de agua para que su concentración en aluminio esté comprendida en el rango de la recta de calibrado. Las concentraciones del resto de los componentes se rebajan en la misma proporción, por lo que su contenido no constituye interferencia al aplicar el método, de acuerdo con la tabla de tolerancias (tabla V.49).

V.11.1.5.1. Método analítico y resultados

El método analítico empleado es el de la medida directa referida a la recta de calibrado y el de la recta de calibrado por adición de patrón.

- MEDIDA DIRECTA

Para el análisis del contenido de Al(III) por el método propuesto, se toman 3 mL de muestra de agua de grifo y agua bidestilada hasta 500 mL, se añaden 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25.

Se agitan durante 15 minutos y se someten al tratamiento que se indica en el procedimiento operatorio.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Se hacen tres medidas consecutivas de la muestra y se refieren a la recta de calibrado obtenida, cuyos datos se indican en la tabla V.68.

Tabla V.68. Recta de calibrado

ppb Al(III)	% IFR
0	34.9
0.4	47.8
0.8	60.4
1.2	74.2
1.6	85.8

Ajustada por mínimos cuadrados es:

$$IFR = 32.05 [Al(III)] + 34.98 \quad r = 0.999$$

donde la [Al(III)] viene expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los resultados obtenidos en la determinación de Al(III) por medida directa se indican en la tabla V.69.

Tabla V.69. Determinación de Al(III)

Vol. problema (mL)	Vol. agua bidest. (mL)	%IFR	ppb Al(III)
3	hasta 500	64.4	0.92
3	hasta 500	66.1	0.97
3	hasta 500	65.6	0.95

Una vez corregidas las diluciones, la concentración de Al(III) encontrado se indica en la tabla V.70 junto con el estudio estadístico.

Tabla V.70. Contenido de Al(III) en el agua urbana. Medida directa referida a la recta de calibrado.

Al(III) $\mu\text{g. L}^{-1}$
153.34
161.67
158.34
.....
157.78 \pm 4.19
.....
% DSR = 2.7

- ADICION DE PATRON

Para la determinación del contenido de aluminio por el método de adición de patrón se llevó a cabo la siguiente experiencia. En cuatro matraces aforados, se diluyeron 3 mL de muestra a analizar hasta 500 mL con agua bidestilada y se añaden a cada uno de ellos 0, 1, 2 y 4 mL de disolución de Al(III) de 0.1 mg.L⁻¹. A continuación se adicionan 2 mL de disolución etanólica de morina 6.2x10⁻³%, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico (0.1M) de pH = 5.30 y 60 mg de resina SP Sephadex C-25. Se preparó también un blanco de agua bidestilada que no contenía aluminio.

Se agitan durante 15 minutos y se sigue el procedimiento tal y como se describe en el método operatorio.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos, se realizaron tres determinaciones simultáneas.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 426$ nm, $\lambda_{em} = 496$ nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla V.71, y se han representado gráficamente en la figura V.44.

Tabla V.71. Recta de calibrado por adición de patrón.

Vol. Problema (mL)	Vol. Agua Bidest. (mL)	Al (III) añadido ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%FR
--	500	---	34.9
3	hasta 500	---	65.6
3	"	0.2	72.6
3	"	0.4	79.9
3	"	0.8	94.3
.....			
--	500	---	36.1
3	hasta 500	---	70.3
3	"	0.2	76.7
3	"	0.4	86.3
3	"	0.8	99.1
.....			
--	500	---	35.2
3	hasta 500	---	68.0
3	"	0.2	74.8
3	"	0.4	83.0
3	"	0.8	96.2

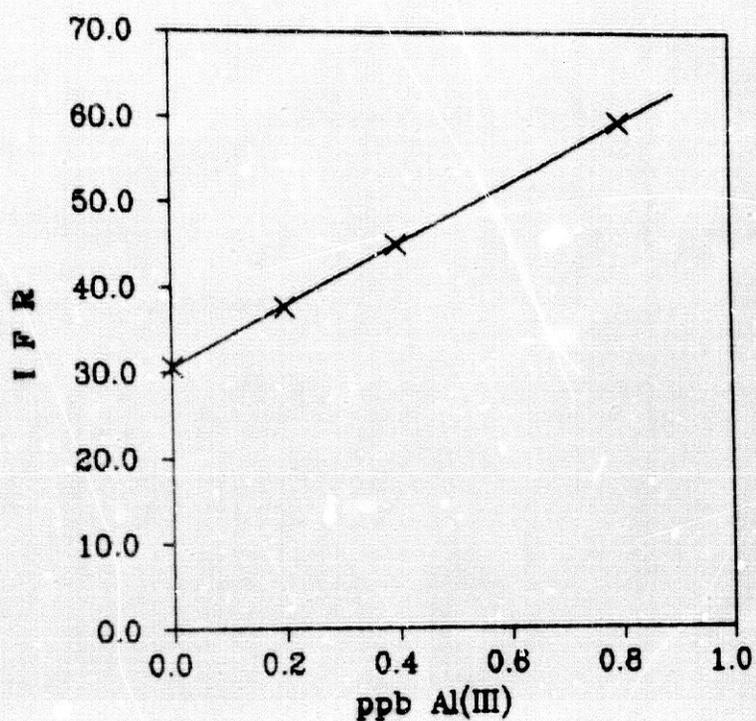


Figura V.44. Recta de calibrado por adición de patrón

Ajustando las rectas obtenidas por mínimos cuadrados se obtienen las siguientes funciones que corresponden a una concentración de aluminio que se indica en la tabla V.72.

Tabla V.72.

$IFR = f[Al(III)]$	coef. correlac.	$[Al(III)]$ ($\mu g \cdot L^{-1}$)
$IFR = 30.62 + 35.94 [Al(III)]$	0.999	0.86
$IFR = 34.20 + 35.57 [Al(III)]$	0.997	0.94
$IFR = 32.88 + 35.48 [Al(III)]$	0.999	0.93

Una vez corregidas las diluciones, la concentración de Al(III) encontrado se indica en la tabla V.73 junto con el estudio estadístico.

Tabla V.73. Contenido de Al(III) en el agua urbana. Recta de calibrado por adición de patrón.

Al(III) $\mu\text{g. L}^{-1}$
143.34
156.67
155.00
.....
151.67 \pm 7.26
.....
% DSR = 4.8
=====

Al realizar la determinación de Al(III) mediante el método de adición de patrón, se observa que la pendiente es semejante a la de la recta de calibrado. La relación de pendientes 0.9.

En la tabla V.74, se resumen los resultados obtenidos en el análisis de las aguas. Se observa que los errores relativos con respecto al método de Absorción atómica (entre paréntesis en la tabla) es menor del 7% excepto para el agua mineral de Ortigosa del Monte y Lanjarón. La precisión (expresada como desviación estandar relativa) para el método de FCI varía entre 2.7% y 6.6%. La precisión media de las cuatro aguas analizadas es

del 4.2%. El método de Absorción Atómica presenta una desviación estandar relativa media del 5.8%.

Tabla V.74. Resultados de los análisis.

<i>agua</i>	<i>contenido en Al(III) ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i>					
	<i>AA*</i>	<i>DSR (%)</i>	<i>medida directa*</i>	<i>DSR (%)</i>	<i>adición de patrón*</i>	<i>DSR (%)</i>
Ortigosa del Monte	14,5	5,5	14,2 (2,1%)	2,8	16,4 (13,1%)	4,9
Lanjarón	5,0	6,0	-----	--	5,5 (10,0%)	3,1
Pantano	18,4	6,0	-----	--	19,7 (7,1%)	6,6
Urbana	157,1	5,5	157,8 (0,4%)	2,7	151,7 (3,4%)	4,8

* media de tres determinaciones

V.11.1.6. ESTUDIO DE RECUPERACION

Para comprobar la exactitud del método en la aplicación a muestras reales se ha realizado el siguiente estudio de recuperación de aluminio sobre muestras de agua de Bezoya y urbana de Granada, empleadas en el estudio anterior.

V.11.1.6.1. Agua de Ortigosa del Monte

A 20 mL de agua de Ortigosa del Monte diluída hasta 500 mL con agua bidestilada, se adicionan distintas cantidades de Al(III) de concentración conocida (0.20, 0.40 y 0.60 $\mu\text{g.L}^{-1}$) y operando según el método propuesto para el volumen indicado, se mide la intensidad de fluorescencia a una $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$ excitando a 426 nm, con una anchura de rendijas de 2.5 nm, factor de sensibilidad de 0.1 y manteniendo constante la temperatura a 20°C.

La recta de calibrado cuyos datos se indican en la tabla V.75, nos permite referir los resultados obtenidos.

Tabla V.75. Recta de calibrado

ppb Al(III)	% IFR
0	26.5
0.4	35.7
0.8	45.5
1.2	56.7
1.6	66.2

Corresponde a la siguiente ecuación, una vez ajustada por mínimos cuadrados, que nos permite obtener las concentraciones de Al(III) añadidas.

$$\text{IFR} = 25.10 [\text{Al(III)}] + 26.04 \quad r = 0.999$$

donde la [Al(III)] viene dada en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los resultados obtenidos, así como el tratamiento estadístico, se recogen en la tabla V.76 y V.77.

Tabla V.76. Estudio de recuperación.

cantidad añadida ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%IFR	cantidad encontrada ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%recuperado
---	40.3	0.57	---
0.20	45.4	0.77	100.0
	46.7	0.82	125.0
	46.2	0.80	115.0
0.40	50.7	0.98	102.5
	49.9	0.95	95.0
	51.2	1.00	107.5
0.60	57.6	1.26	115.0
	54.7	1.14	95.0
	56.2	1.20	105.0

Tabla V.77. Estudio estadístico

[Al (III)] ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	σ_{n-1}	%recuperado
0.80	0.02	113.4
0.98	0.02	101.7
1.20	0.06	105.0

A la vista de los datos reflejados en las tablas V.76 y V.77, correspondientes a los resultados obtenidos, podemos deducir que el porcentaje de recuperación es aceptable para las condiciones de trabajo establecidas.

V.11.1.6.2. Agua urbana (Granada)

Para comprobar la validez del método se ha realizado un estudio de recuperación, que consiste en adicionar a 3 mL de agua de grifo diluida hasta 500 mL con agua bidestilada, distintas cantidades de Al(III) de concentración conocida (0.10, 0.30 y 0.50 $\mu\text{g.L}^{-1}$) y operando según el método propuesto para el volumen indicado, se mide la intensidad de fluorescencia a una $\lambda_{\text{em}} = 496 \text{ nm}$ excitando a 426 nm, con una anchura de rendijas de 2.5 nm, factor de sensibilidad de 0.1 y manteniendo constante la temperatura a 20°C.

La recta de calibrado obtenida, cuyos datos se indican en la tabla V.78, nos permite referir los resultados obtenidos.

Tabla V.78. Recta de calibrado

ppb Al(III)	% IFR
0	27.5
0.4	37.3
0.8	46.7
1.2	57.9
1.6	68.3

Los valores de intensidad de fluorescencia referidos a la recta de calibrado obtenida, que corresponde a la siguiente ecuación, una vez ajustada por mínimos cuadrados, nos permite obtener las concentraciones de Al(III) añadidas.

$$\text{IFR} = 25.55 [\text{Al(III)}] + 27.10 \quad r = 0.999$$

donde la [Al(III)] viene dada en $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Los resultados obtenidos, así como el tratamiento estadístico, se recogen en la tabla V.79 y V.80.

Tabla V.79. Estudio de recuperación.

<i>cantidad añadida</i> <i>($\mu\text{g.L}^{-1}$)</i>	<i>%IFR</i>	<i>cantidad encontrada</i> <i>($\mu\text{g.L}^{-1}$)</i>	<i>%recuperado</i>
---	51.4	0.95	----
0.20	56.6	1.15	100.0
	55.9	1.13	90.0
	56.3	1.14	95.0
.....			
0.40	61.0	1.33	95.0
	62.9	1.40	112.5
	61.6	1.35	100.0
.....			
0.60	66.1	1.53	96.7
	66.4	1.54	98.0
	68.0	1.60	108.3

Tabla V.80. Estudio estadístico

[Al(III)] ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	σ_{n-1}	%recuperado
1.14	0.01	95.0
1.36	0.04	102.5
1.56	0.04	101.0

A la vista de los datos reflejados en las tablas V.79 y V.80, correspondientes a los resultados obtenidos, podemos deducir que el porcentaje de recuperación es aceptable para las condiciones de trabajo establecidas.

En la tabla V.81, se resumen los resultados obtenidos del estudio de recuperación de las aguas.

Tabla V.81. Estudio de recuperación.

agua	cantidad añadida ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	cantidad encontrada* ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	%recuperado
Agua mineral	----	0.57	----
(Ortigosa	0.20	0.80	113.4
del Monte)	0.40	0.98	101.7
	0.60	1.20	105.0
.....			
agua de	----	0.95	----
grifo	0.20	1.14	95.0
	0.40	1.36	102.5
	0.60	1.56	101.0

* Los datos son la media de tres determinaciones

Como puede observarse en la anterior tabla V.81 donde se resumen los resultados obtenidos en el estudio de recuperación realizado, existe una buena concordancia en el tanto por ciento de aluminio encontrado en todos los casos.

C A P I T U L O VI

ESTUDIO DE LA FIJACION CONJUNTA DE LOS
COMPLEJOS DE Al(III) Y Be(II) CON MORINA

SOBRE SEPHADEX G-15 POR

ESPECTROFLUORIMETRIA EN FASE SOLIDA

Y ESPECTROFLUORIMETRIA SINCRONICA

DERIVADA EN FASE SOLIDA

VI.1. INTRODUCCION

En las condiciones óptimas de trabajo estudiadas en los capítulos IV y V, la diferencia entre la longitud de onda de emisión de ambos complejos hace que sea inviable pensar en una determinación conjunta por espectrofluorimetría convencional, independientemente de la diferencia de pH de trabajo de ambos complejos.

El uso de la espectrofluorimetría sincrónica y sincrónica derivada puede permitir la determinación conjunta usando esta pequeña diferencia en las características espectrales de los complejos. Ello exigiría el utilizar un soporte que permita fijar ambos complejos y el encontrar unas condiciones experimentales válidas para ambos. A esta técnica en adelante la denominaremos Espectrofluorimetría Sincrónica Derivada en Fase Sólida.

Espectrofluorimetría Sincrónica

La espectrofluorimetría sincrónica, técnica iniciada por Lloyd en 1971 (214), consiste en registrar un espectro de fluorescencia mientras se hace un barrido simultáneo de las longitudes de onda de excitación y emisión. Dicho barrido se realiza a la misma velocidad (sincrónicamente) manteniendo una diferencia constante, $\Delta\lambda$, entre ambas longitudes de onda.

De una forma general, el espectro sincrónico presenta una mayor simplicidad que el espectro de fluorescencia convencional (figura VI.1), obteniéndose bandas estrechas y bien

definidas. Esto reduce los solapamientos entre compuestos con características espectrales parecidas, y aumenta la selectividad analítica respecto a la espectrofluorimetría convencional, lo que a su vez determina un mayor aprovechamiento del intervalo espectral útil, pudiendo de esta forma resolverse con cierta facilidad sistemas que posean máximos cercanos o bien mezclas con mayor número de componentes. Esta técnica es especialmente útil cuando se va a resolver un sistema con dos componentes con características espectrales muy similares, como es el caso de los sistemas morina-Al(III) y morina-Be(II).

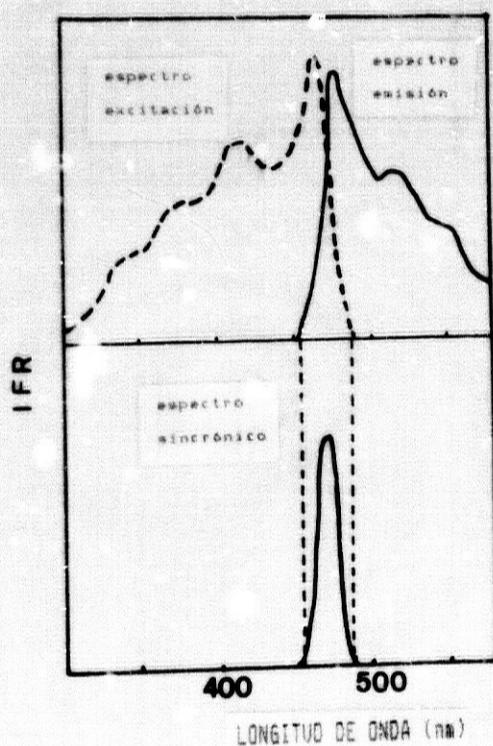


Figura VI.1. Espectros de excitación y emisión y sincrónico de un mismo compuesto

El valor de $\Delta\lambda$ tiene una influencia importante en la anchura de las bandas sincrónicas.

En el caso de que los espectros presenten solapamiento en una extensión $\Delta\lambda_m$ (figura VI.2), la banda sincrónica estará comprendida entre λ_0 y $\lambda_0 + \Delta\lambda + \Delta\lambda_m$, siendo λ_0 la longitud de onda más corta del espectro de emisión.

Si no hay solapamiento, sino que ambas bandas están separadas una distancia $\Delta\lambda_m$, la banda sincrónica se extenderá entre λ_0 y $\lambda_0 + \Delta\lambda - \Delta\lambda_m$.

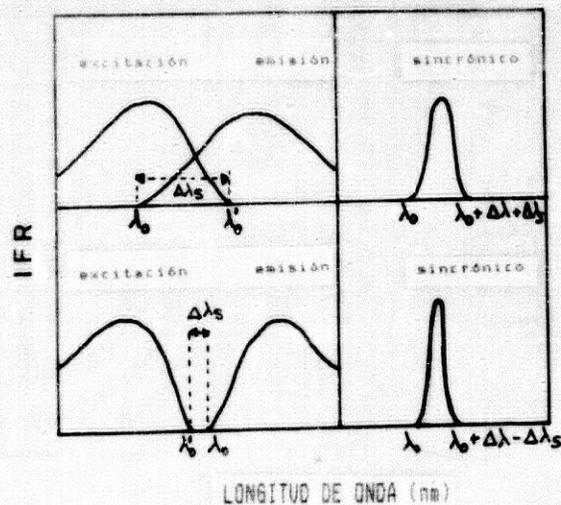


Figura VI.2. Influencia del intervalo de solapamiento o separación de las bandas de excitación y emisión sobre la señal sincrónica

La principal dificultad que tiene la fluorescencia sincrónica es que el mejor valor de $\Delta\lambda$ debe conocerse de antemano, para obtener buenos resultados. Además, en algunos sistemas multicomponentes pueden necesitarse varios valores diferentes de $\Delta\lambda$ para su resolución.

El mejor valor de $\Delta\lambda$, puede ser estimado fácilmente a través de una representación tridimensional $\lambda_{excitación}-\lambda_{emisión}$ -fluorescencia, que permite obtener un mapa topográfico (215) (figura VI.3) en el que la zona en la que un compuesto dado flourece viene dada por una superficie, la diagonal de la representación corresponde a la reflexión Rayleigh ($\lambda_{exc} = \lambda_{em}$). La representación sincrónica correspondería a una línea parecida a la diagonal ($\lambda_{em} = \lambda_{exc} + \Delta\lambda$) es decir, con un ángulo de 45° , separada de ésta por una distancia $\Delta\lambda$. Mediante esta representación es muy fácil seleccionar un $\Delta\lambda$ que haga que la línea que representa el espectro sincrónico no pase (o pase lo menos posible) por las zonas de solapamiento, que son aquellas en las que las superficies se superponen parcialmente.

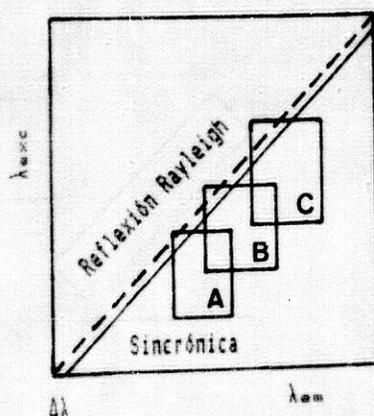


Figura VI.3. Representación de los contornos de tres componentes (A, B y C)

Los espectros sincrónicos se obtienen fácilmente; se requiere solo que el espectrofluorímetro esté dotado de un sistema que permite efectuar un barrido simultáneo con los dos monocromadores (de excitación y de emisión).

Por ello, para que pueda ser útil la técnica de fluorescencia sincrónica, es preciso generar previamente una gráfica tridimensional, con objeto de caracterizar completamente la muestra. Esta gráfica servirá para determinar el mejor o los mejores valores de $\Delta\lambda$ y una vez establecidos, el análisis rutinario puede hacerse con facilidad y rapidez, haciendo el barrido sincrónico en un espectrofluorímetro convencional.

Recientemente se ha desarrollado un procedimiento más complejo para el caso de que los compuestos presenten un mayor grado de solapamiento; en este procedimiento denominado Espectrofluorimetría Sincrónica de ángulo variable, el intervalo $\Delta\lambda$ se varía a lo largo del barrido, por lo general variando las velocidades de los monocromadores; en consecuencia, el ángulo que forma la línea de barrido en el diagrama tridimensional ya no es de 45° , sino que el ángulo variará al modificarse $\Delta\lambda$; con este procedimiento se pueden resolver mejor las mezclas de multicomponentes cuyas bandas presentan un fuerte solapamiento.

Espectrofluorimetría Sincrónica Derivada

El hecho de que la fluorimetría sincrónica produzca espectros más estrechos y por tanto con mayores pendientes que la fluorimetría convencional, la hace idónea para la derivación de la señal analítica. Esencialmente consiste en la representación de $dIFR/d\lambda$ en función de λ . Por ello, la utilización de la derivada (primera ó segunda) del espectro sincrónico, técnica propuesta por Green y O'Haver (216), permite mejorar los resultados.

La concentración de analito depende de la rapidez con que cambia la intensidad de fluorescencia con la longitud de

onda, $d\text{IFR}/d\lambda$, a una longitud de onda particular, mientras que en fluorimetría convencional la concentración de analito es directamente proporcional a IFR.

La derivación diferencia asimismo las bandas anchas de las estrechas en una extensión que aumenta con orden de la derivada.

Esto es debido a que en bandas Gaussianas o Lorentzianas, la amplitud, D_n , de la derivada de orden n , es inversamente proporcional a la anchura de la banda original, W , elevada a grado n :

$$D_n \propto (1/W)^n$$

Así, para dos bandas coincidentes de igual intensidad, la amplitud de la derivada de la banda más estrecha es mayor que la de la banda ancha, por un factor que se incrementa conforme aumenta el orden de derivada.

Además, si tenemos en cuenta que el factor que controla el límite de detección suele ser la señal del blanco y la desviación normal asociada con su medida, resulta que los límites de detección pueden reducirse significativamente dado que se observan menores contribuciones de las señales de los blancos al derivar, en especial cuando se tienen blancos con bandas espectrales anchas.

En la figura IV.4 se comparan de forma esquemática los espectros convencionales sincrónicos y sincrónicos derivados de dos compuestos hipotéticos.

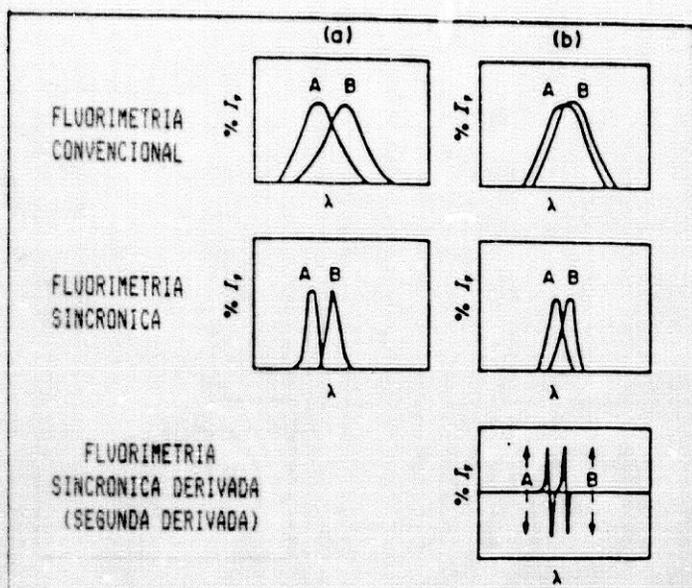


Figura VI.4. Comparación esquemática entre los espectros convencionales, sincrónicos y sincrónicos derivados de dos compuestos hipotéticos.

Para dos compuestos hipotéticos A y B, cuando el solapamiento de los espectros convencionales no es muy grande, la técnica sincrónica lo evita (caso a). Sin embargo, cuando los espectros de fluorescencia convencionales solapan fuertemente, la técnica sincrónica reduce la extensión del solapamiento, pero aún no permite la resolución de la mezcla. Sin embargo es posible resolverla si se mide el espectro derivado (caso b).

En este capítulo abordamos, en primer lugar, el estudio de aquellas variables que influyen sobre la fijación e intensidad de fluorescencia de los dos sistemas referidos, Al-morina y Bemorina, con objeto de encontrar las condiciones óptimas para su determinación conjunta. A continuación se seleccionan las condiciones instrumentales óptimas (incremento de longitud de onda, longitudes de onda analíticas,...) y una vez propuesto el método para la determinación conjunta de aluminio y berilio se pone de manifiesto su validez tanto en mezclas sintéticas como reales.