T
14
105
2

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

NUEVAS APLICACIONES FLUORIMÉTRICAS DEL ROJO DE ALIZARINA S. UTILIZACIÓN DE MEDIOS MICELARES

TESIS DOCTORAL

TOMO II

Ana Mª García Campaña

Granada, 1995

PROV. T-15/131

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 9-3-95
ENTRADA NUM. 721

CAPÍTULO V

DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE V(V) CON ROJO DE ALIZARINA S

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2 MAR. 1995
COMISION DE DOCTORADO

1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE VANADIO: INTERÉS ANALÍTICO Y MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

El Vanadio es un elemento descubierto en el Siglo XIX, que se encuentra en la corteza terrestre formando parte de la composición de minerales, carbones y petroleos. En estado natural se encuentra fundamentalmente en los minerales: carnotita ($K_2[UO_2/V_2O_8]$), vanadita ($Pb_5[Cl/VO_4)_3]$), patronita (VS_4), y en minerales de hierro, aluminio y cromo (**1**).

Es un metal dúctil y maleable, resistente a la corrosión a temperatura ambiente y sus compuestos tienen una extensa aplicación industrial, utilizándose en la producción de catalizadores y de vidrios opacos a los rayos ultravioleta, así como en la industria fotográfica, debido a que inhibe la transmisión de la radiación. Es constituyente minoritario de algunos aceros a los que les confiere un considerable aumento de resistencia mecánica y dureza. Puesto que el vanadio ofrece una alta resistencia al deterioro producido por las radiaciones, es utilizado cada vez más en tecnología atómica. Compuestos como vanadato amónico o cloruro de vanadilo son utilizados como mordientes en la fabricación de colorantes y en procesos de coloración de cerámica, vidrio, pieles, etc.

También el vanadio se encuentra en diversas especies animales y vegetales, así como en algunos microrganismos como hongos, algas y levaduras. En los vegetales se observa una mayor concentración en los nódulos de la raíz, en los que se encuentra la bacteria fijadora del nitrógeno, que en las partes frondosas. Parece intervenir en la fijación del nitrógeno de Azotobacter, estando relacionado con la síntesis de clorofilas y la fotosíntesis. Estudios recientes relacionan un aporte de vanadio en plantas con un incremento del crecimiento y de la actividad del enzima nitrato-reductasa (**2**).

Generalmente, los niveles de concentración encontrados en especies terrestres son menores que los encontrados en especies marinas, ya que algunas de éstas actúan como acumuladores de vanadio, llegando incluso a concentrar hasta 10000 veces el nivel de vanadio del agua donde residen (**3**). En algunas

variedades de ascidian, el vanadio está contenido en células sanguíneas llamadas vanadocitos, aunque no parece estar empleado en el transporte de oxígeno y su función es desconocida.

No está claro que el vanadio sea un elemento esencial en el hombre, aunque se ha comprobado en algunos animales que, una dieta deficiente en este elemento provoca alteraciones en el metabolismo lipídico y en la reproducción, alterando también los niveles de eritrocitos y de hierro en sangre (**4**). Parece ser que este micronutriente interviene en el control de la concentración de colesterol en plasma y tejidos, en la oxidación de los fosfolípidos y en la actividad del enzima acetilCoA-deacilasa, que participa en el metabolismo de la cisteina (**5**).

En áreas industrializadas, donde se han realizado estudios sobre la salud de la población, se ha podido comprobar que el vanadio, a determinados niveles presenta una cierta toxicidad, incrementándose ésta al ir aumentando la valencia y siendo el más tóxico el pentóxido. Provoca afecciones en el aparato respiratorio, principal vía de entrada en zonas expuestas al elemento y sus sales. También se han observado anomalias en el aparato digestivo, así como conjuntivitis, rinitis, bronquitis crónica, etc. La exposición industrial al polvo de V_2O_5 origina una decoloración de la lengua conocida como "Lengua verde", junto con sintomatología específica del sistema nervioso central y daño renal. Debido a esto, existen una setie de normas establecidas por la C.E.E. para el control de los trabajadores expuestos a este elemento (**6**), estableciéndose los límites máximos del contenido de Vanadio excretado en orina y recomendando un control anual con objeto de realizar un adecuado tratamineto en caso de superar el nivel permitido.

Estudios realizados sobre la acción de vanadio en el hombre, indicaron que una ingesta de 11 mg V/Kg de alimento, asumiendo un consumo diario de 400 g (materiea seca), no presenta ningún efecto tóxico, ya que la mayoria del vanadio ingerido (> 85%) no es absorbido, siendo excretado mayoritariamente en las heces y en menor cantidad en la orina (**7**).

Los efectos de este elemento a nivel medioambiental están relacionados con la elevada combustion de crudos y derivados del petroleo, utilizado en centrales térmicas, combustión industrial y residencial e incineración de basuras. De este modo el vanadio se puede encontrar en la atmósfera, mares, océanos y llegar a las aguas de riego. Este elemento se incluye como contaminante seleccionado en diferentes Test realizados por la Agencia de Protección del Medio Ambiente en EEUU (**8**) y actualmente se realizan estudios sobre la posibilidad de utilizar vanadio y niquel como indicadores de la contaminación de las centrales energéticas.

Debido a estas razones y considerando el estrecho margen que separa el límite como nutriente y como elemento tóxico, es imprescindible disponer de métodos analíticos para su determinación, que presenten una adecuada sensibilidad.

De todas las valencias del vanadio, la más estable es el V(V). En medio alcalino existe como VO_3^- y en medio fuertemente ácido como VO_2^+, de color amarillo. En rango intermedio de pH, pueden formarse especies aniónicas (poliácidos) de color amarillo-naranja. El V(V) forma heteropoliácidos con PO_4^{3-}, MoO_4^{2-}, WO_4^{2-} y peroxicomplejos.

El V(V) tiene gran afinidad por átomos de oxígeno donores y en los complejos que forma presenta número de coordinación 6 y probablemente forma especies octaédricas.

El V(IV) es estable en solución ácida en forma de VO^{2+}, de color azul. Forma complejos con F^-, $C_2O_4^{2-}$, EDTA, etc.

El V(III) verde y el V(II) violeta tienen poco interés desde el punto de vista analítico.

El enmascaramiento del vanadio se basa a menudo en su complejación con tartrato, oxalato, tirón, manitol, EDTA y TEA (trietanolamina).

Una revisión sobre diversos métodos de determinación de vanadio fue realizada por Bachman y Banks (**9**). En la actualidad, debido a razones

medioambientales, biológicas (la toxicidad del V crece con la valencia) (**10**) e industriales, es necesario la especiación química y ello obliga a poseer y encontrar nuevos métodos de determinación no sólo de V(V) sino también de V(IV) (**11**).

Para la determinación de Vanadio se han utilizado métodos electrométricos, fluorescencia de rayos X, activación neutrónica, métodos cromatográficos, etc, pero fundamentalmente espectroscopía de absorción o de emisión, espectrofotometría y espectrofluorimetría.

Se han descrito numerosos métodos de determinación de V(V), por Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS) con llama. Fundamentalmente se ha empleado llama de N_2O + acetileno, aplicándose a la determinación de V en silicatos (**12**), minerales (**13,14**), rocas y arcillas (**15**), materiales geológicos (**16,17**), partículas sólidas en la atmósfera (**18**), productos metalúrgicos (**19,20**), aceros y gasoil (**21**), aceites minerales (**22**), catalizadores para síntesis de amoniaco (**23**), aguas naturales (**24,25**), fueloil y productos del petroleo (**26,27,28,29,30**), alimentos (**31**) y componentes de la dieta alimenticia (**32**), muestras marinas (**33**), etc.

La determinación directa en medio acuoso no es muy sensible, por lo que es necesario preconcentrar el V(V). Con este propósito han sido usadas resinas de cambio iónico (**34**) y más frecuentemente, sistemas de extracción líquido-líquido, de manera que la fase orgánica es aspirada directamente en la llama. Entre los sistemas más usados se incluyen: Cupferrón + acetato de butilo (**35**); Cupferrón + MIBC (metilisobutilcetona) (**36,37,38**); sal amónica del ácido pirrolidinditiocarbamato (APDC) + MIBC (**39,40**); 8-hidroxiquinoleina + alcohol isoamílico (**41**); 5,8-dicloro-8-hidroxiquinoleina + acetatode butilo (**42**); cloruro de tetrafenilarsónio + diclorometano (**43**); *α*-benzoinoxina + benceno + cloroformo (**44**); ß-isopropiltropolona + di-n-butileter + n-butano (**45**) y ácido 5,5'-metilenodisalicilhidroxámico (MEDSHA) + MIBC + TBP (tributilfosfato) (**46**).

Para muestras biológicas no es adecuada la sensibilidad que se alcanza con AAS con llama, mejorándose al utilizar Espectroscopia de Absorción Atómica mediante horno de grafito (GFAAS). Se ha aplicado con éxito a la determinación de Vanadio en vidrios y carbonatos (**47**), asfalto (**48**), silicatos (**49**), muestras

biológicas (**50,51**) y orina (**52,53**), suero (**54**), suero y orina (**55**). La determinación de V(V) en muestras medioambientales presentan problemas de interferencias y de sensibilidad del método. Muchas técnicas han sido recomendadas como la AAS con atomización electrotérmica, pero la naturaleza refractaria de los elementos dificultan su atomización y con ello se afecta la sensibilidad (**56,57,58,59**).

Dentro de las teorías de espectroscopia de emisión, en la determinación de V(V) se han utilizado tanto ICPAES (Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma de corriente inducida) (**60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70**) como DCPAES (Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma de corriente directa) (**71,54**).

Los procedimientos fotométricos de determinación de V suelen ser más sensibles, aunque algo menos selectivos, que los procedimientos que utilizan AAS y se utilizan en muestras que contienen cantidades muy pequeñas de V (por ejemplo muestras geológicas).

Se han utilizado diversos reactivos orgánicos como: 8-hidroxiquinoleina (**72,73,74**), tolueno-3,4-ditiol (**75**), PAR (Piridilazoresorcinol) (**76,77,78**), N-benzoil-N-fenilhidroxilamina (BPHA) (**79,80,81**), Naranja de xilenol (**82**), 2-Tenoiltrifluoroacetona (**83**), 2,3-dihidroxinaftaleno + TBA (triisobutilamina) (**84**), 1,2-dihidroxibenceno + anilina + TBA (**85,86,87**), etc. La formación de complejos ternarios y compuestos de asociación iónica exaltan la sensibilidad espectrofotométrica, así como la utilización de agentes surfactantes.

Se ha determinado V en vegetales y alimentos marinos (**88**), setas (**89**), sílice, suelos y aguas (**90**), minerales, rocas y carbón (**91**), agua corriente, potable, de rio y de lluvia (**92**), aleaciones (**93**), crudos de petroleo (**94**), etc.

Los métodos espectrofotométricos más sensibles se basan en el efecto catalítico del V(V) en la oxidación de un compuesto orgánico con un oxidante inorgánico (**95,96,97,98,99,100**).Diversos métodos cinéticos, muy sensibles, para

la determinación analítica de V(V) se basan en la oxidación del ácido gálico con BrO_3^- (**101,102,103,104**)o un $S_2O_8^{2-}$ (**105,106**). Algunos métodos fotométricos han sido adaptados a Análisis por Inyección de Flujo (FIA) (**107,108**). Se recomienda consultar la monografía de Marczenko (**109**).

Determinación espectrofotométrica de vanadio usando derivados antraquinónicos.

El Rojo de Alizarina S se utilizó, en 1963, en la determinación de V(V), después de eliminar los numerosos interferentes, operando a pH entre 3'5 y 5'8 y midiendo la absorbancia a 455 nm. La ley de Beer se cumple entre 0'1-3'67 μg/ml de V(V) y el complejo es estable 48 horas (**110**).

Rani y Barneji, en 1973(**111**), afirman que la quinalizarina (1,2,5,8-tetrahidroxiantraquinona) forma con V(V) un complejo de estequiometría 1:1, en un medio que contiene 50 % de etanol y a pH=5'5. La ley de Beer se cumple en el intervalo de 3'5-21 ppm de V. La absorbancia se mide a 630 nm.

Alvarez-Manzaneda y Gámiz-Garófano proponen en 1988 (**112**) un método cinético de determinación de V(V), basado en la acción como oxidante de los iones VO_3^- sobre el ácido 1,8-diamino-4,8-dihidroxiantraquinona-2,7-disulfónico. La absorbancia se mide a 602 nm y hay linealidad en los intervalos: 2'5-45 μg/ml y 7'5-50 μg/ml de V(V). Estudian las interferencias de diversos iones y aplican el método a la determinación de V(V) en muestras de aceite de petroleo (light Iran y Leona), comparando los resultados con los métodos ASTM (American Society for Testing Material).

Babenko y col. han estudiado espectrofotométricamente los complejos coloreados de V(V) con derivados antraquinónicos en presencia de un agente surfactante. Estas reacciones se usan para la determinación espectrofotométrica de V(V) en muestras metalúrgicas. Así, en 1985, tras el proceso de disolución de la muestra utilizan ácido carmínico, cloruro de cetiltrimetilamonio (CCTA), ácido ascórbico y tampón acetato de pH=4'8. La absorbancia se mide a 570 nm y hay linealidad entre 0'4-2 μg/ml de V(V) (**113**). En 1987, en un trabajo muy similar, sustituyen el ácido carmínico por Alizarina S, el CCTA por el BHP (bromuro de

hexadecilpiridinio) y el tampón acetato por el tampón glicina de pH = 3'3. La absorbancia se mide a 520 nm y la linealidad es de 0'4-2 μg/ml (**114**).

Simultaneamente a Babenko y col., Simek y col., en 1985,(**115**) estudian espectrofotométricamente las reacciones de 6 colorantes, de la serie del "Verde Alizarina" (Color Index 61570) con vanadatos en presencia del catión hexadecilpiridinio. Proponen diversos métodos de determinación espectrofotométricade V(V), midiendo la absorbancia a 610, 625 y 630 nm, utilizando algunos de los colorantes. El pH idóneo es 3'8 y el intervalo de aplicación es de 0'09-1'20 μg/ml de V(V).

Babenko y col., en 1990, (**116**) indican que los derivados 9,10-antraquinónicos conteniendo grupos 1-hidroxi forman complejos estables con V(V) en presencia de surfactantes catiónicos y en medio ácido. Esta reacción puede ser usada para la determinación de V en soluciones de productos metalúrgicos. En el mismo año, (**117**) publican un trabajo sobre la estabilidad de los complejos de V(IV) con hidroxiantraquinonas modificadas por surfactantes catiónicos. Como cromóforos, se emplean soluciones acuosas de Alizarina S, Alizarincomplexona, ácido carmínico y quinalizarina y como surfactantes bromuro de hexadecilpiridinio y cloruro de hexadecilpiridinio. Las soluciones en estudio contenían $VOSO_4$ y H_2SO_4. Se forman complejos de estequiometría 1:2:2 (V(IV): cromóforo: surfactante) y los máximos de absorción se dan entre 520 a 570 nm. Indican una posible utilidad analítica.

No son muy numerosos los métodos fluorimétricos de determinación de vanadio. En 1958, V.P. Rao y J.F. Rao proponen la disolución acuosa al 1 % de resorcinol en medio $H_2SO_4 + H_3PO_4$, para la identificación por fluorescencia en el uv de V(V). Tiene poco valor práctico para el análisis de materiales biológicos dado que el límite de sensibilidad era sólo de 2'5 ppm de V(V) (**118**).

En 1968, Bognar y Jellinek identifican catalíticamente V(V), basándose en que el mismo cataliza la reacción BrO_3^- + Br^- + ácido ascórbico = Br_2, que actúa

como amortiguador de la fluorescencia de un producto que actúa como indicador en el procedimiento volumétrico (Rodamina B, violeta cristal, tripoflavina, rojo de acridina o mezcla de Rodamina B + rojo Tripán). Su sensibilidad es de 0'02 μg/ml (**119**).

Koh y Ryan, como consecuencia de estudios realizados sobre la relación entre la fluorescencia y los estados de valencia de los iones metálicos proponen el ácido benzóico para la determinación fluorimétrica de vanadio. Trabajan a pH entre 4 y 5 con tampón acetato en presencia de Zn amalgamado. Se puede determinar de 0'5-5'0 ppb de V y con fuertes interferencias debido a la presencia de Tl y Ti. No interfieren Na, K, Mg, Ca, Cr, Co, Ni, Cd, Al y Mo. Parece ser que el producto fluorescente originado es ácido peroxibenzóico (**120**).

Pilipenko y col., en 1976, proponen un método fluorimétrico de determinación de V(V), basándose en el quenching de fluorescencia del mismo sobre el complejo fluorescente Ga-lumogalión. El V(V) disminuye la fluorescencia de este debido a la formación del complejo 2:3 (V(V)-lumogalión). Se opera a pH = 3, no interfiriendo 0'05 μg/ml de Fe^{3+} o Cu^{2+} ; cantidades superiores a 50 μg de V(IV) o $C_2O_4^{2-}$ sí lo hacen (**121**).

Pilipenko y col., en 1978, indican que el complejo que forma V(V) con 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) y Safranina T (C.I. Basic Red 2), en la zona de pH de 5'5 a 6'2, es fluorescente (**122**) y puede ser usado con fines cuantitativos. El complejo se extrae en dicloroetano alcanzándo la máxima fluorescencia en extractos que contienen un 40 % de metanol o acetona. Se excita a 515 nm y se emite la fluorescencia a 581 nm. El LD es de 0'01 μg/7 ml y las interferencias de Mo(VI) y W(VI) se eliminan con $C_2O_4^{2-}$ (**123**).

Grases y col., en 1983,(**124**) estudian una serie de pirazolinas e isoxazolinas como nuevos reactivos fluorimétricos para la determinación de V(V). Proponen un método cinético-fluorimétrico de determinación de V(V) basándose en la oxidación del 1,3,5-trifenil-Δ^2-pirazolina (TPP). Decrece la fluorescencia del (TPP) por acción del VO_3^-. Se excita a 360 nm y se mide la fluorescencia a 465 nm. Hay linealidad entre 0'03-0'15 μg/ml de V(V) y se estudian las posibles interferencias.

Genestar y col., en 1984,(**125**) tras un estudio espectrofluorimétrico sobre

la interacción de algunas catecolaminas con especies inorgánicas, llegan a establecer métodos fluorimétricos de determinación de V(V) y de Tl(III), a nivel de trazas, basándose en la formación de trihidroxindoles con dopamina y adrenalina, respectivamente. Para el V(V), se emplea dopamina, a pH = 6'5, se espera 30 minutos, se añade solución de Na_2SO_3 y se mide la fluorescencia a 490 nm, excitando a 340 nm. El método permite la determinación de 0-01-0'30 ppm de vanadio.

Jie y Liu, en 1991, estudian espectrofluorimétricamente la reacción de la tiamina con V(V) en un medio acuoso que contiene H_2SO_4, Na_2F y CH_3COOH. Tras calentar a ebullición 20 minutos, enfrían y miden la fluorescencia a 464 nm, excitando a 400 nm. Hay linealidad de 0'25-17 μM de V(V). Interfieren Cr(III), Sn(IV), Cr(VI), Bi(III), Tl(III). El método lo aplican a la determinación de V en arroz, maíz y habichuela (**126**).

Determinación espectrofluorimétrica de vanadio utilizando derivados antraquinónicos

La primera aplicación de un derivado antraquinónico como reactivo fluorimétrico de V(V) tuvo lugar en 1974 por M. Román y col., (**127**) que utilizaron la 1,4-diamino-5-nitroantraquinona. Cuando a disoluciones hidroalcohólicas de V(V) en medio ácido clorhídrico y en caliente se les hace reaccionar con 1,4-diamino-5-nitroantraquinona (que no presenta fluorescencia en esas condiciones), se origina un producto de oxidación de color naranja que es fluorescente (λ_{ex} = 475 nm, λ_{em} = 550 nm). Operando al 50 % de etanol, 0'36 M en HCl y calentando previamente entre 80-85 °C, la fluorescencia emitida por el producto formado es lineal en el intervalo de concentraciones de 100-800 ppb de V(V). La relación estequiométrica de reacción es 1:1 (V(V):Reactivo). Para la determinación de 400 ppb, el error relativo sobre el valor medio (n = 10) es del 1'53 %.

Posteriormente la utilización de derivados antraquinónicos como reactivos fluorimétricos de V dan lugar, por lo general, a métodos cinético-fluorimétricos de

determinación.

La reacción de oxidación de la 1-amino-4-hidroxiantraquinona por el O_2 disuelto es catalizada por V(V) y la velocidad de reacción es proporcional a su concentración. La 1-amino-4-hidroxiantraquinona fue utilizada por Salinas y col. (**128**) en 1980 para la determinación cinético-fluorimétrica de V(V). En la reacción se forma un producto de oxidación del reactivo, que presenta fluorescencia amarilla en medio HCl 0'5 M. El método permite la determinación de V(V) en el intervalo de 100-530 ppb de V(V) (λ_{ex}=480 nm, λ_{em}=575 nm). El límite de determinación es 50 ppb. Ce(IV) interfiere seriamente. Para la determinación de 318 ppb de V(V), el error es del 3 %. El método se aplica a la determinación de V(V) en crudos de petroleo. El método es más erróneo y de intervalo de aplicación más pequeño que el mencionado anteriormente con 1,4-diamino-5-nitroantraquinona.

En 1982, los mismos autores publicaron un trabajo sobre la determinación fluorimétrica de V(V), empleando también la 1-amino-4-hidroxiantraquinona, basándose en la oxidación del reactivo por V(V). Se origina un compuesto de color amarillo que es fluorescente. El pH a que se opera , 1'2, se fija con HCl en un medio, que contiene 40 % de etanol v/v. El método permite la determinación de 0'06-0'36 ppm de V(V) con un error de ± 1'5 %. Son serias interferencias la presencia de Au(III) o Ce(IV) (**129**).

García-Sánchez y col., en 1981,(**130**) proponen un método cinético-fluorimétrico de determinación de V(V), basándose en la acción catalítica del ión VO_3^- en la autoxidación del 4,8-diamino-1,5-dihidroxiantraquinona-2,6-disulfonato sódico. En medio ácido HCl 0'4 M se produce una intensa fluorescencia roja (λ_{ex} = 524 nm, λ_{em} = 582 nm) que permite la determinación de V(V) en el intervalo 40-500 ppb. Son interferencias serias la presencia de Fe(II), Fe(III) y I^-.

Utilizando el mismo reactivo, proponen (**131**) una determinación catalítica-fluorimétrica de V(V) basada en su activación por Fel(III). Operando en las mismas condiciones del método anterior, salvo que se introduce Fe(III) como activador, el método gana sensibilidad y permite determinar 1-10 mg/ml de V(V). Son serias interferencias Hg(II), Au(III), Ce(IV), Fe(II) y I^-. El método se aplica a la determinación de V no volátil en crudos de petroleo.

Basándose en los trabajos anteriores de García-Sánchez y col., Forteza y col., en 1990, (**132**) utilizan la actividad catalítica del vanadio sobre la autoxidación de la 4,8-diamino-1,5-dihidroxiantraquinona-2,6-disulfonatosódico, para la determinación de V(V) en petroleo y sus productos derivados, por análisis por inyección de flujo fluorimétrico (FIA-fluorimétrico).

En 1988, Salinas y col., (**133**) utilizaron el 1,3-dihidroxi-4-aminoantraquino-na-2-sulfonato sódico (Nuclear Fast Red) como reactivo para la determinación espectrofluorimétrica de V(V) en crudos de petroleo y escorias básicas. Se opera en un medio que es 3'71 M en $HClO_4$. Se mide la fluorescencia a 565 nm, excitando a 464 nm, a los 20 minutos de la mezcla de reactivo. El método permite la determinación de V(V) en el intervalo de 0'02-3 μg/ml de V(V).

2. ESTUDIO DEL COMPLEJO BINARIO V(V)-ROJO DE ALIZARINA S

2.1. CARACTERISTICAS ESPECTRALES

En el estudio de sustancias interferentes realizado para el sistema Mo(VI)-RAS en medio micelar, observamos la elevada interferencia positiva que causaba el Vanadio(V) en este medio micelar catiónico. Realizamos por tanto estudios preliminares con objeto de comprobar la posible fluorescencia del complejo binario V(V)-RAS en medio acuoso y del que no existen antecedentes.

Todos los ensayos cualitativos se llevaron a cabo frente a un blanco de reactivos, comprobándose que solo en medio debilmente ácido y neutro el complejo binario mostraba una fluorescencia ligeramente superior a la del blanco.

Para establecer las longitudes de onda de los máximos de excitación y de emisión, se registraron los espectros del sistema V(V)-RAS y del reactivo a pH 5'5, de modo que en matraces de 10 ml se introdujeron: 0'2 ml de disolución de V(V) 10^{-3} M, 1'0 ml de disolución reguladora acético/acetato 1 M de pH 5'5, 0'2 ml de disolución de RAS 10^{-3} M y agua destilada hasta el enrase.

En la Figura V.1 se representan los espectros de excitación y de emisión correspondientes al complejo binario (1 y 2) y al reactivo (1' y 2') a pH 5'5. Se utilizaron rendijas de excitación y de emisión de 15 nm. El registro se realizó en modo no corregido, siendo la velocidad de barrido 240 nm/min. y la respuesta 0'5 s.

Las longitudes de onda encontradas para los máximos de excitación y de emisión, fueron de 480 y 607 nm, respectivamente.

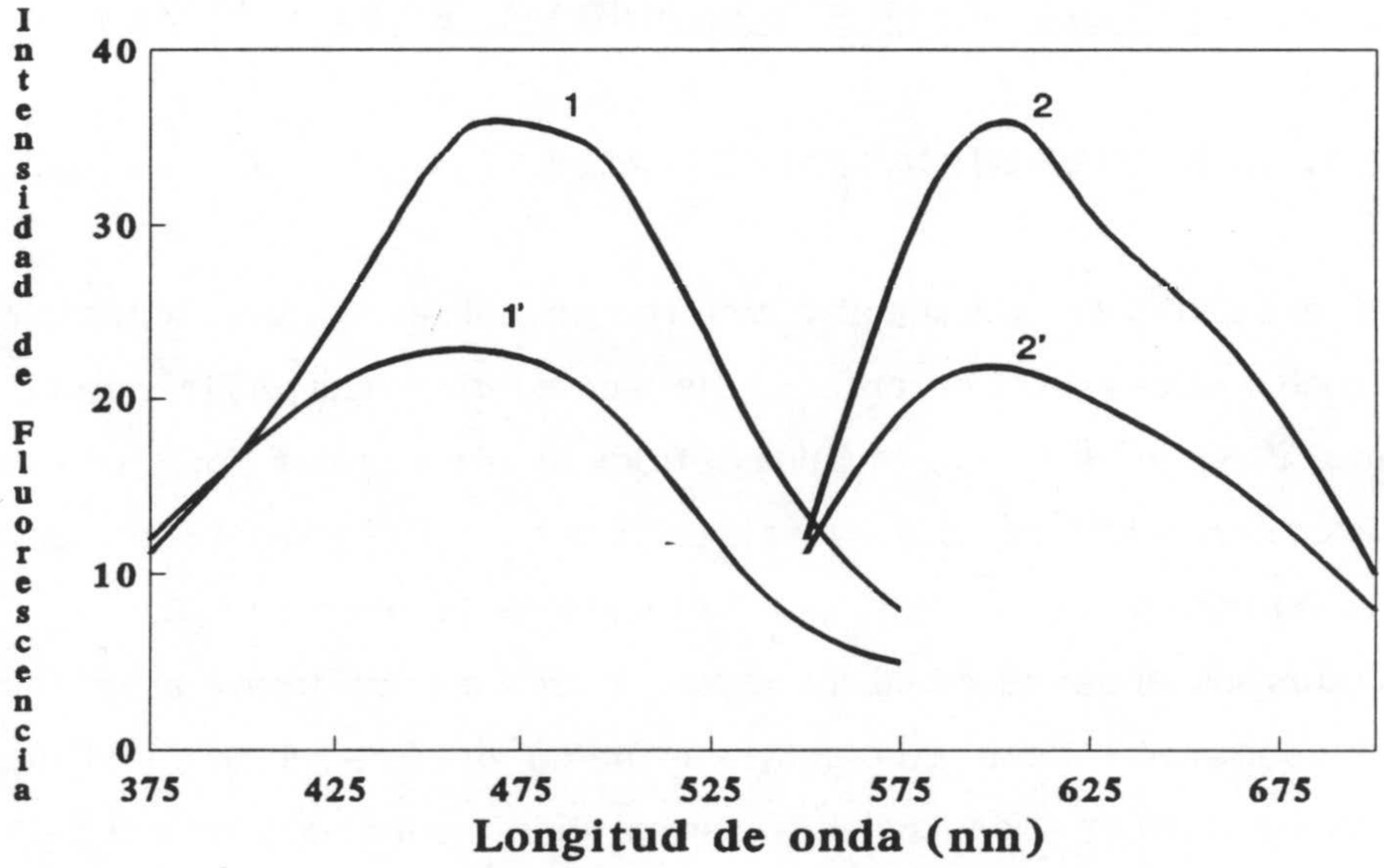


Figura V.1. Sistema Vanadio(V)-RAS. Espectros de excitación y de emisión del complejo (1 y 2) y del blanco (1' y 2') a pH= 5'5. [V(V)]= [RAS]= 2.10^{-5} M

2.2. INFLUENCIA DEL PH

Con objeto de comprobar en que zona de pH se mantenía la fluorescencia del complejo binario, se obtuvieron las curvas pH vs. Intensidad de fluorescencia para el complejo y su respectivo blanco. La experiencia se llevó a cabo en un vaso de 500 ml. que contenía concentraciones de V(V) y RAS iguales a 2.10^{-5} M y en el que se adicionaban cantidades variables de HCl y NaOH, de modo que la dilución no afectara significativamente a las concentraciones de reactivo y analito.

El resultado se pone de manifiesto en la Figura V.2, donde se observa que para valores de pH inferiores a 4'2 y superiores a 6'0, la fluorescencia del reactivo es ligeramente superior a la del complejo, mientras que solo en ese intervalo, el complejo presentaba una señal fluorescente algo superior a la del blanco, permaneciendo los máximos de excitación y de emisión en 480 y 607 nm, respectivamente.

Teniendo en cuenta la concentración de V(V) utilizada en esta experiencia (1 ppm) y las condiciones de sensibilidad instrumental (rendijas ex/em 15/15 nm) se pone de manifiesto la baja sensibilidad que presentaba esta reacción fluorescente, lo cual nos hizo descartar la idea de establecer el método fluorimétrico para la determinación de V(V) con RAS.

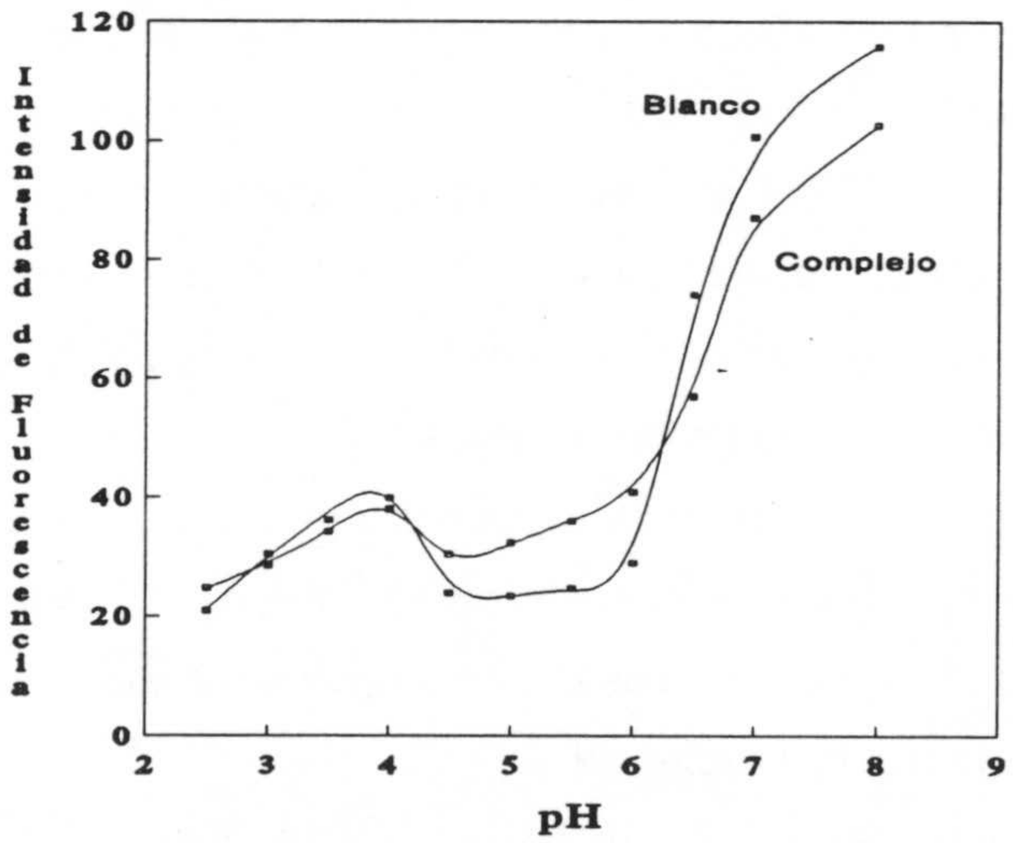


Figura V.2. Influencia del pH. [V(V)] = [RAS] = 2.10^{-5} M

3. ESTUDIO DEL COMPLEJO BINARIO VANADIO(V)-ROJO DE ALIZARINA S EN MEDIO MICELAR

3.1. EXPERIENCIAS CON AGENTES TENSIOACTIVOS

Debido a la débil fluorescencia que presenta el complejo binario en la zona de pH seleccionada, realizamos una serie de experiencias con diferentes medios micelares, para comprobar si se producía aumento en la sensibilidad de la reacción con objeto de poder establecer una determinación fluorimétrica en un medio micelar adecuado.

Se ensayaron tensioactivos de distinta naturaleza: Bromuro de cetiltrimetilamonio y Cloruro de cetilpiridinio (BCTA y CCP, catiónicos), Dodecilsulfato sódico (DSS, aniónico) y Triton X-100 (TX-100, no iónicos) a concentraciones muy superiores a su concentración crítica micelar (c.m.c.).

Todas las disoluciones de los agentes tensioactivos fueron preparadas al 5 % (p/v) excepto para el TX-100 que se llevó a cabo al 10 %.

El procedimiento operatorio seguido en esta experiencia fue el mismo para todos los medios micelares ensayados. En matraces de 10 ml se añaden: 0'2 ml de disolución de V(V) 10^{-3} M, 1 ml de disolución reguladora acético/acetatode pH 5'5, 1 ml de disolución de tensioactivo, 0'2 ml de disolución de RAS 10^{-3} M y agua destilada hasta completar el volumen final. También se preparó paralelamente un blanco para cada uno de los tensioactivos.

En todos los casos se usaron rendijas de excitación y de emisión de 15 nm, las medidas de fluorescencia se obtuvieron en modo no corregido y con una velocidad de registro de los espectros de 480 nm/min y respuesta de 0'5 s. La temperatura de trabajo fue la ambiental.

En la Tabla V.1 se recogen los resultados obtenidos para el complejo y su respectivo blanco en presencia de los distintos tensioactivos ensayados. En la

última columna se muestra la señal diferencia con objeto de observar el efecto neto que produce cada uno de ellos sobre la fluorescencia del complejo V(V)-RAS. No se observaron cambios en las longitudes de onda de excitación y de emisión, permaneciendo los máximos a 480 y 607 nm, respectivamente.

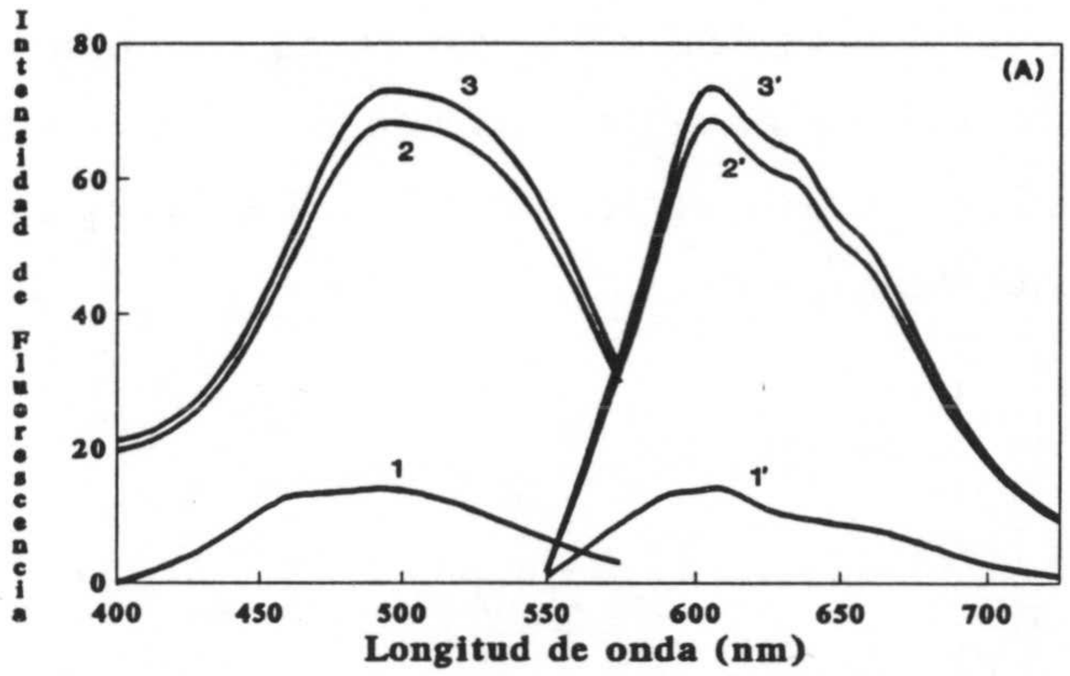
En la Figura V.3 se muestran los espectros de excitación y emisión diferencia del complejo y su respectivo blanco, en ausencia y en presencia de los distintos tensioactivos ensayados.

Tabla V.1

Efecto del medio micelar sobre la fluorescencia del sistema V(V)-RAS a pH = 5'5

Tensioactivo	IFc	IFb	IFd
----------	36'0	22'8	13'2
BCTA	79'2	6'0	73'2
CCP	71'3	3'1	68'2
DSS	31'8	18'8	12'0
TX-100	22'2	11'3	10'9

Se observa que unicamente los tensioactivos catiónicos (BCTA y CP) producen un aumento en la fluorescencia del sistema. La adición de estos tensioactivos incrementan del orden de cinco veces la fluorescencia del complejo, dismimuyendo notablemente la de los blancos. La presencia de micelas de tipo aniónico (DSS) y no iónico (TX-100) parecen producir un efecto similar, disminuyendo ligeramente la fluorescencia de complejo y reactivo, de modo que la fluorescencia neta del sistema no se ve afectada.



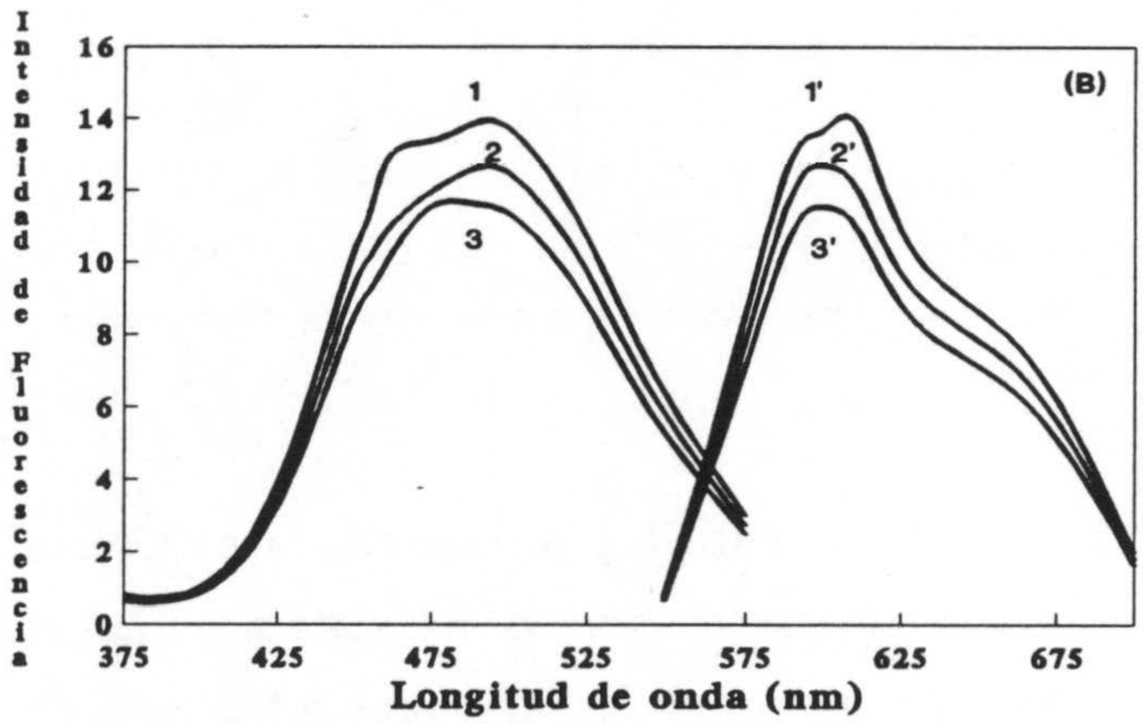


Figura V.3. Sistema V(V)-RAS. pH= 5'5, [V(V)]= [RAS]= 2.10^{-5} M. Espectros de excitación y emisión diferencia del complejo y su respectivo blanco: (A) (1,1') sin tensioactivo, (2,2') CCP, (3,3') BCTA. (B) (1,1') sin tensioactivo, (2,2') DSS, (3,3') TX-100

En realidad solo las micelas cargadas positivamente parecen ejercer un efecto notorio y por consiguiente se ha seleccionado el BCTA debido a que es el que presenta un mayor aumento en la señal fluorescente del complejo V(V)-RAS.

Posteriormente se procederá a la optimización del método analítico en su presencia.

3.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

* **Influencia del pH**

Con objeto de determinar el pH óptimo al cual se consigue una intensidad de fluorescencia del complejo máxima y constante, se prepararon 500 ml de una disolución de concentración 2.10^{-5} M en V(V) y RAS y al 0'5 % en BCTA, en la que se modificó la acidez del medio mediante adición de cantidades variables de NaOH y HCl. Igualmente se preparó un blanco de reactivos, en el que se modificó el pH de la misma forma.

Se registraron los espectros de excitación y de emisión a la temperatura del laboratorio a varios pH, utilizando rendijas de excitación y emisión de 7 nm, observándose que hasta pH 3'5, la fluorescencia del blanco es considerablemente más elevada que la del complejo binario. A partir de este valor, la fluorescencia del blanco permanece inalterada mientras que la del complejo aumenta notablemente, permaneciendo máxima y constante en el intervalo comprendido entre 6'0-8'0. Sobrepasado este valor, vuelve a producirse una disminución en la señal.

Para todos los valores de pH registrados se comprueba que la longitud de onda de emisión permanece inalterada e igual a 607 nm, mientras que la longitud de onda de excitación sufre un desplazamiento batocrómico, a medida que aumenta el pH, alcanzando un valor de 505 nm, el cual se manteniene constante en la zona de máxima fluorescencia.

Las medidas de intensidad de fluorescencia correspondientes a todos los valores de pH ensayados para el complejo binario y su respectivo blanco se recogen en la Tabla V.2 y se representan en la Figura V.4.

Tabla V.2

Influencia del pH

pH	IFc	IFb
2'5	13'5	31'2
3'0	10'3	29'7
3'5	11'6	22'5
4'0	15'7	12'5
4'5	27'0	8'0
4'7	31'4	7'5
5'0	54'4	7'8
5'2	61'1	6'7
5'5	76'4	6'9
5'7	85'3	7'0
6'0	98'7	6'5
6'5	109'4	7'5
6'8	111'7	8'8
7'0	112'2	8'9
7'5	111'9	9'2
8'0	111'8	9'6
8'5	98'2	9'7
9'0	76'3	10'1
9'5	60'7	11'2

Se seleccionó como pH óptimo de trabajo el valor de 7'7, comprendido en la zona de meseta donde la fluorescencia es máxima y permanece constante.

En la Figura V.5 se representan los espectros de excitación y emisión del complejo binario y su respectivo blanco al valor de pH seleccionado, comprendido en la zona de máxima fluorescencia.

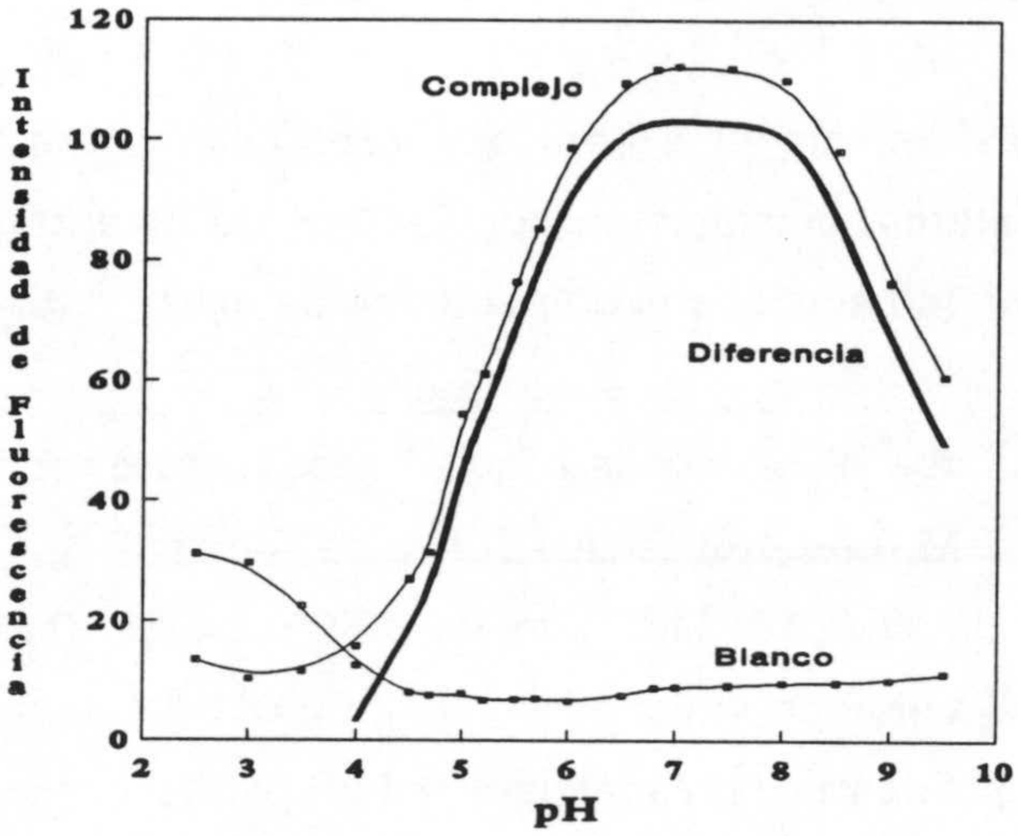


Figura V.4. Influencia del pH. [V(V)] = [RAS] = 2.10^{-5} M, [BCTA] = 0'5 %.

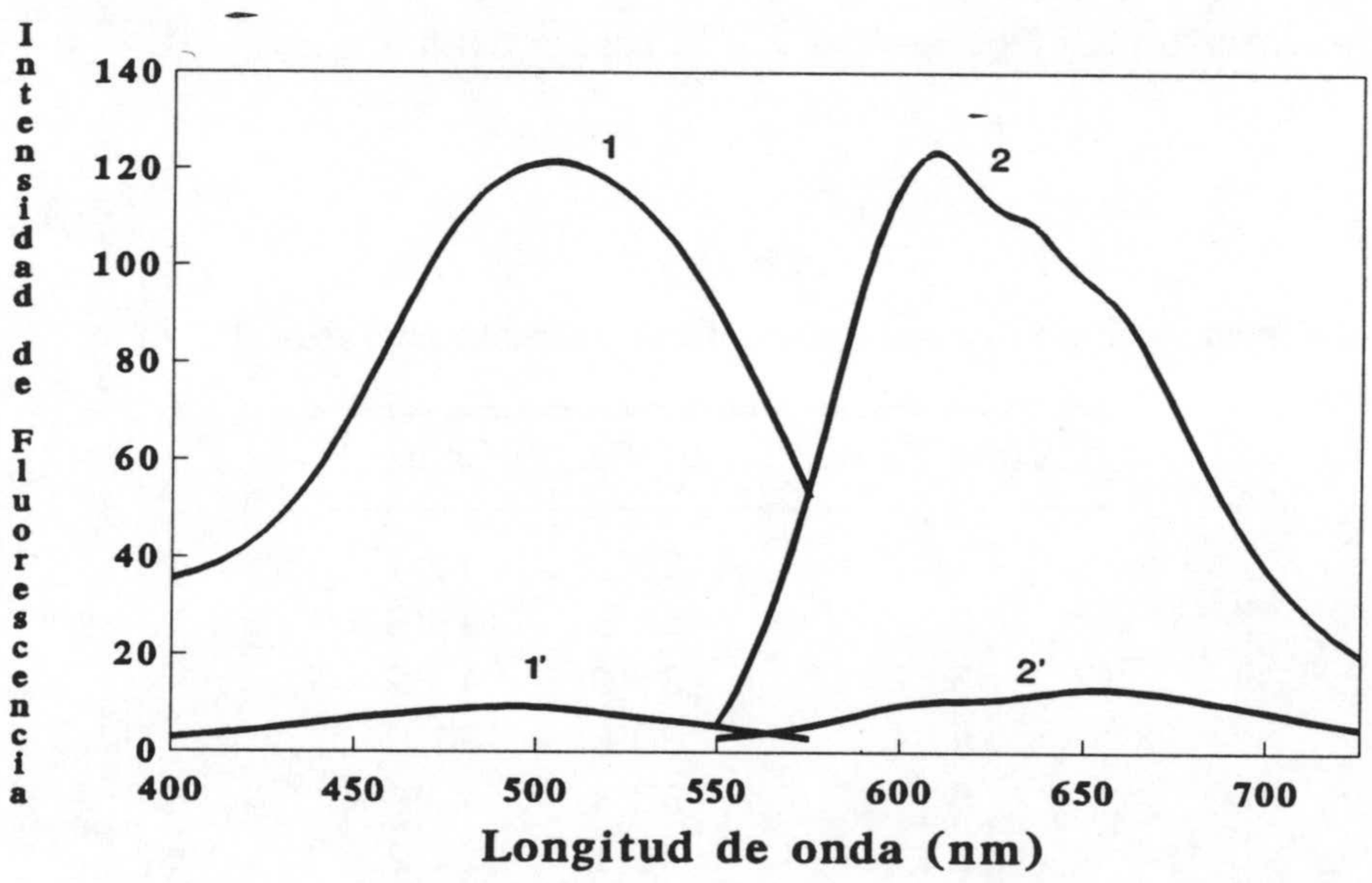


Figura V.5. Espectros de excitación y de emisión del complejo (1 y 2) y del blanco (1' y 2') en presencia de [BCTA] = 0'5 %. [V(V)] = [RAS] = 2.10^{-5} M. pH = 7'7.

* **Influencia de la concentración de tampón**

Se ensayó así mismo el efecto que producían sobre la intensidad de fluorescencia del sistema, disoluciones reguladoras de distinta naturaleza de pH 7'7, variando la cantidad adicionada de cada una de ellas.

Se estudiaron dos disoluciones reguladoras: fosfato monosódico/disódico 0'1 M y Tris/HCl 0'1 M, preparando dos series de matraces de 10 ml en los que se adicionó: 0'2 ml de V(V) 10^{-3} M, 1 ml de BCTA al 5 %, 0'2 ml de disolución de RAS 10^{-3} M y el volumen indicado de tampón 0'1 M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. Igualmente se prepararon dos series de blancos. Se midió la fluorescencia a temperatura ambiente con λ_{ex} = 505 nm y λ_{em} = 607 nm y rendijas de excitación y emisión de 7 nm.

Los resultados para ambas disoluciones se recogen en las Tablas V.3 y V.4 y se representan en las Figuras V.6 y V.7, respectivamente.

Tabla V.3

Influencia de la concentración de tampón fosfatos 0'1 M

V(ml) Tampón	IFc	IFb
1	98'3	10'1
2	88'5	15'5
3	85'9	17'9
4	80'6	21'0
5	80'4	23'6
6	76'1	22'2
7	74'3	22'5

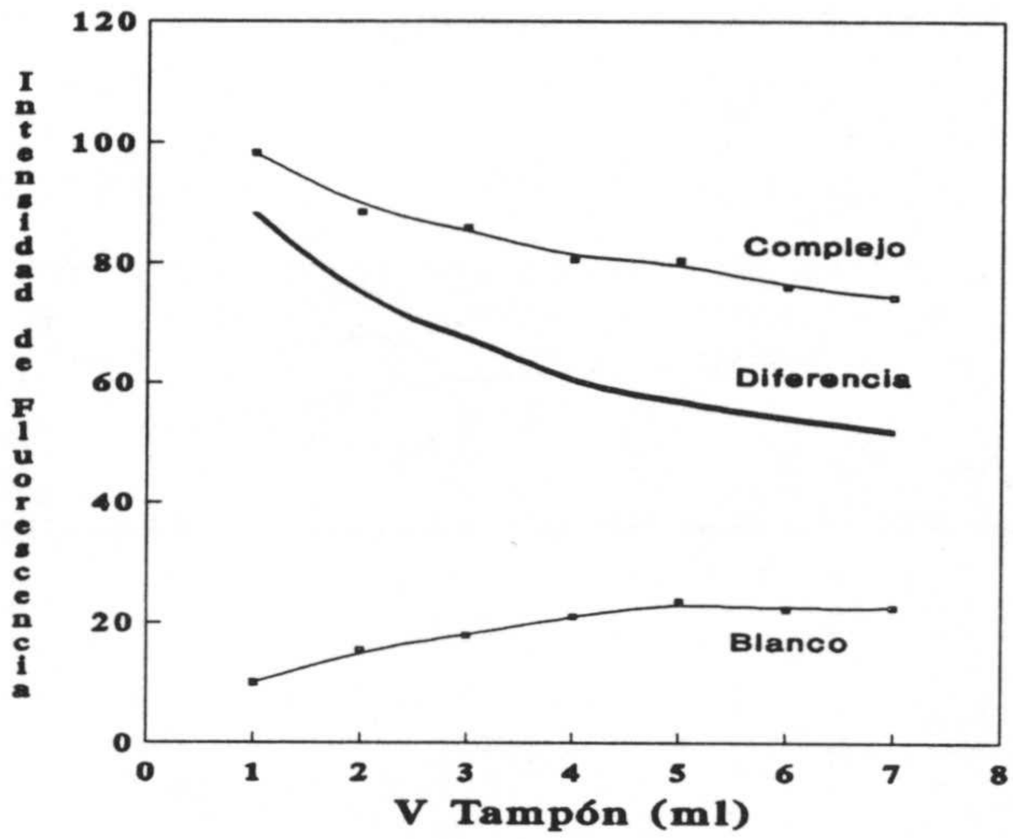


Figura V.6. Influencia de la concentración de tampón fosfatos 0'1 M. pH = 7'7, [V(V)] = [RAS] = 2.10^{-5} M, [BCTA] = 0'5 %.

Tabla V.4

Influencia de la concentración de tampón Tris/HCl 0'1 M

V(ml) Tampón	IFc	IFb
1	112'3	7'1
2	113'0	8'0
3	112'5	8'2
4	112'2	8'1
5	109'6	8'6
6	107'8	8'5
7	104'3	9'5

Aunque con ambas disoluciones reguladoras se consigue una adecuada capacidad amortiguadora, es obvio que el tampón fosfato produce peores resultados ya que provoca un aumento en la señal del blanco y una disminución en la del complejo a medida que incrementa su concentración. Sin embargo, la

fluorescencia del sistema no se ve alterada al utilizar tampón Tris/HCl, observándose unicamente una leve disminución en la señal al aumentar la cantidad adicionada.

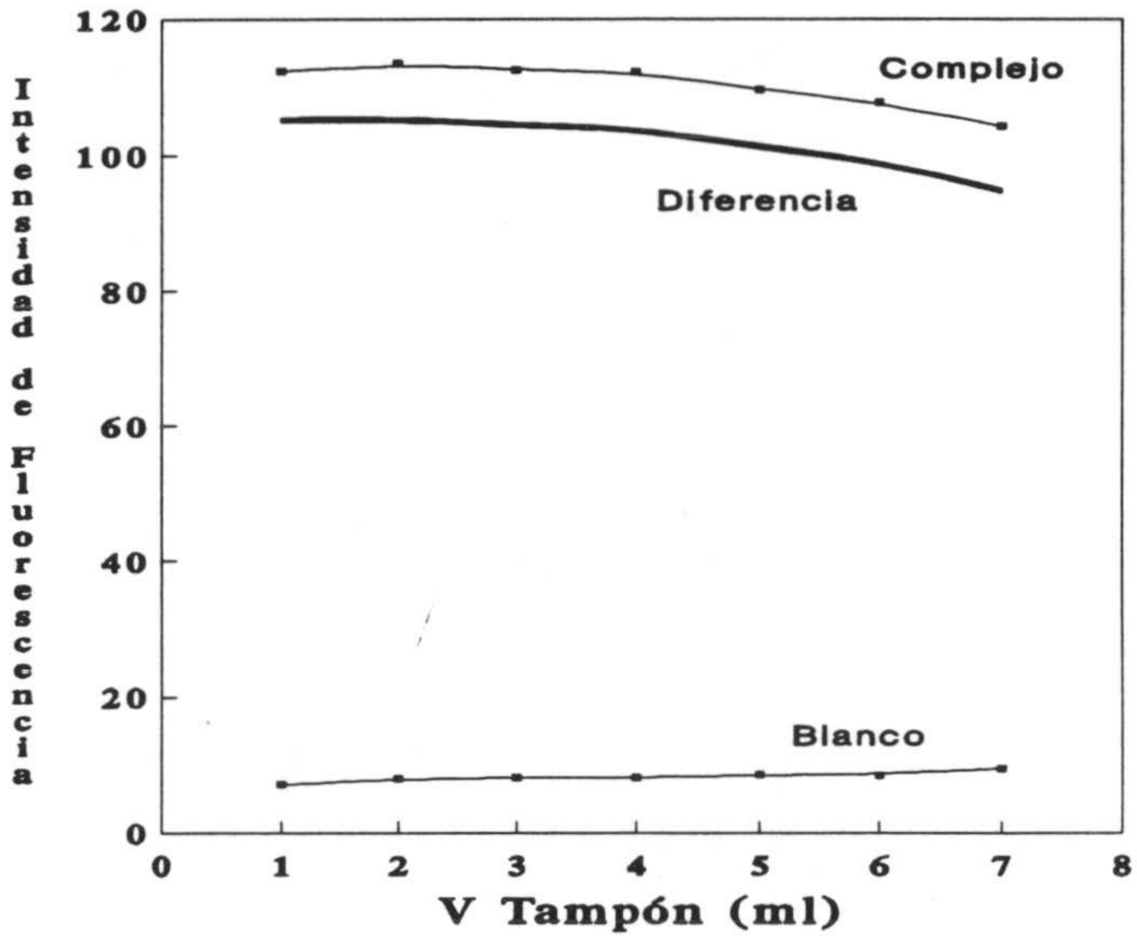


Figura V.7. Influencia de la concentración de tampón Tris/HCl 0'1 M. pH= 7'7, [V(V)]= [RAS]= 2.10^{-5} M, [BCTA]= 0'5 %.

Para posteriores experiencias se decidió trabajar con un volumen de 2 ml de tampón Tris/HCl de pH 7'7, en un volumen final de 10 ml.

* <u>Influencia de la fuerza iónica</u>

Para determinar si la fuerza iónica ejerce alguna modificación sobre la intensidad de fluorescencia del sistema en estudio, se realizó la siguiente experiencia:

Se preparó una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron 0'2 ml de disolución de V(V) 10^{-3} M, 1 ml de BCTA al 5%, 2 ml de disolución tampón pH 7'7, 0'2 ml de RAS 10^{-3} M y el volumen indicado de disolución de KCl para conseguir la fuerza iónica adecuada, enrasándose hasta el volumen final con agua

destilada. Se midió la señal a temperatura ambiente con λ_{ex} = 505 nm y λ_{em} = 607 nm con rendijas de excitación y emisión de 7 nm.

Los resultados se recogen en la Tabla V.5 y se representan en la Figura V.7, en la que se observa que a medida que incrementa la concentración iónica, la fluorescencia permanece practicamente inalterada, comenzando a disminuir levemente cuando se alcanzan valores elevados por encima de 0'8 M. Según esto, la determinación fluorimétrica se establece sin necesidad de fijar la fuerza iónica del medio.

Tabla V.6

Influencia de la Fuerza Iónica

[KCl]	IFc	IFb
0	112'1	8'2
0'01	112'3	8'1
0'050	111'8	8'8
0'100	109'9	9'2
0'200	110'9	9'4
0'400	110'3	11'2
0'600	108'4	11'5
0'800	90'1	11'0

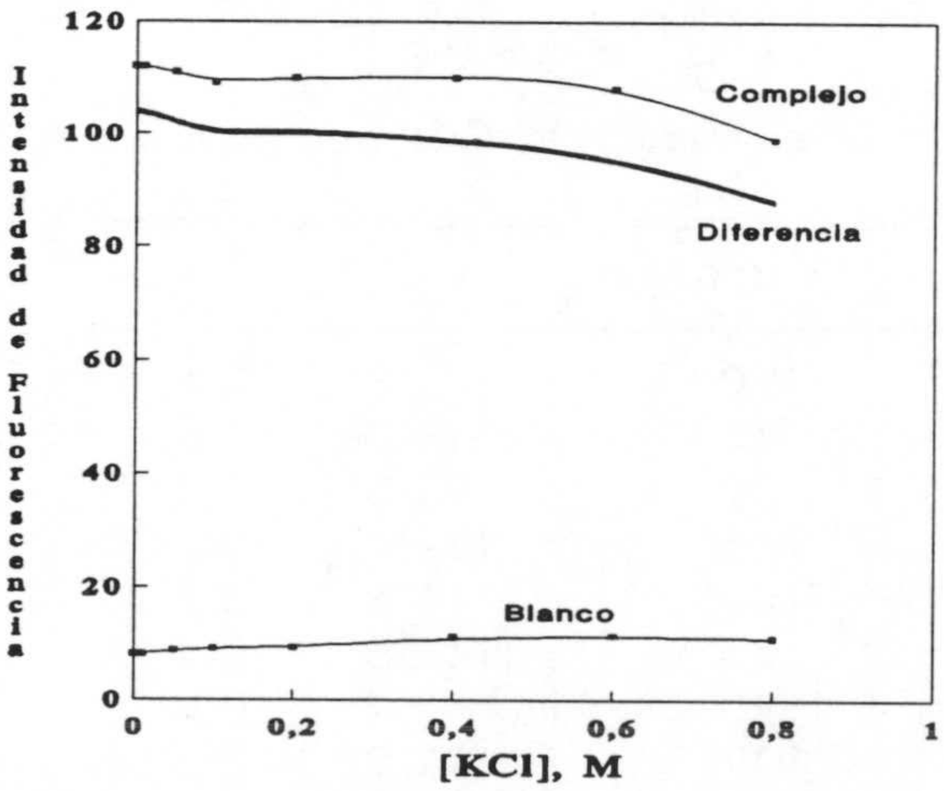


Figura V.8. Influencia de la fuerza iónica. [V(V)] = [RAS] = 2.10^{-5} M, [BCTA] = 0'5 %, pH = 7'7.

* **Estabilidad del sistema V(V)-RAS en medio micelar**

Para estudiar la influencia del tiempo sobre la intensidad de fluorescencia del complejo en presencia de BCTA se preparó una disolución que contenía en un volumen de 50 ml: 1'0 ml de disolución de V(V) 10^{-3} M, 5 ml de BCTA al 5 %, 10 ml de tampón Tris/HCl de pH 7'7 y 1'0 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando con agua destilada hasta el volumen final. La misma experiencia se llevó a cabo con un blanco de reactivos.

Las medidas se realizaron a λ_{ex} = 505 nm y λ_{em} = 607 nm cada 15 min. durante las dos primeras horas, y después a intervalos de 1 hora, desde la preparación de la muestra, cambiando para cada medida el contenido de la cubeta para evitar posibles efectos de fotodescomposición de la muestra debido a la radiación incidente.

Los resultados se reflejan en la Tabla V.6, pudiéndose comprobar que la formación del complejo es instantánea y que su emisión fluorescente es practicamente constante durante las 5 horas que dura la experiencia.

Tabla V.6

Estabilidad del sistema V(V)-RAS en presencia de BCTA

Tiempo (min)	IFc	IFb
0	111'3	8'4
15	111'8	7'9
30	111'5	8'2
45	112'4	8'3
60	111'8	8'5
75	112'8	8'4
90	112'2	8'4
105	111'7	8'1
120	113'1	8'3
240	112'8	8'5
300	112'2	8'2

* **Influencia del orden de adición de los reactivos**

La influencia que la adición de los diferentes reactivos ejerce sobre la intensidad de fluorescencia se estudió preparando una serie de matraces de 10 ml que contenían: 0'2 ml de V(V) 10^{-3} M, 1 ml de BCTA al 5 %, 2 ml de disolución reguladora y 0'2 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando con agua destilada. Así mismo se preparó la correspondiente serie de blancos.

En cada uno de los matraces se cambió el orden de adición de la forma especificada en la Tabla V.7, donde se muestra la intensidad de fluorescencia a temepratura ambiente a λ_{ex} = 505 nm y λ_{em} = 607 nm con rendijas de excitación y emisión de 7 nm, del complejo y su respectivo blanco.

Tabla V.7

Influencia del orden de adición de los reactivos

Orden de Adición	IFc	IFb
V(VI) + BCTA + Tampón + RAS	110'5	8'1
V(VI) + RAS + BCTA + Tampón	112'2	8'3
V(VI) + Tampón + BCTA + RAS	110'5	8'2
V(VI) + BCTA + RAS + Tampón	111'2	8'3
V(VI) + RAS + Tampón + BCTA	110'9	8'0
V(VI) + Tampón + RAS + BCTA	112'5	7'9

Como muestra la Tabla, el orden de adición no es un factor influyente en el desarrollo de la fluorescencia del sistema, y por tanto su elección es indiferente.

No obstante, para posteriores experiencias hemos seguido el orden de adición:

V(VI) + Tampón + BCTA + RAS

* **Influencia de la temperatura**

Para establecer el efecto que la temperatura ejerce sobre la fluorescencia del sistema se preparó una disolución que, en un volumen final de 50 ml contenía una concentración de V(V) de 2.10^{-5} M, 10 ml de tampón Tris/HCl de pH 7'7, 5 ml de BCTA al 5 % y una concentración de RAS de 2.10^{-5} M. Del mismo modo se preparó un blanco de reactivos. Ambos matraces se introdujeron en baño termostático y una vez alcanzada la temperatura deseada, se midió la fluorescencia del sistema, cambiando el contenido de la cubeta para cada medida. No se midió a temperaturas inferiores a 10°C debido a la solidificación del BCTA.

Los resultados se reflejan en la Tabla V.8 y se representan en la Figura V.9.

Tabla V.8

Influencia de la Temperatura

Tª (°C)	IFc	IFb
15	115'1	8'0
20	113'3	8'2
25	111'5	8'5
30	112'0	8'4
35	98'7	7'2
40	78'3	7'0
45	70'4	6'8
50	65'1	6'5

Existe un primer tramo comprendido entre 15 y 30°C, donde no se produce alteración de la señal fluorescente del complejo binario, sin embargo a partir de esta temperatura se produce un notable decrecimiento de la fluorescencia que corresponde a un 2'8 % por cada °C en el tramo comprendido entre 35-50°C.

El blanco muestra una leve disminución en su señal cuando la temperatura es superior a los 35°C.

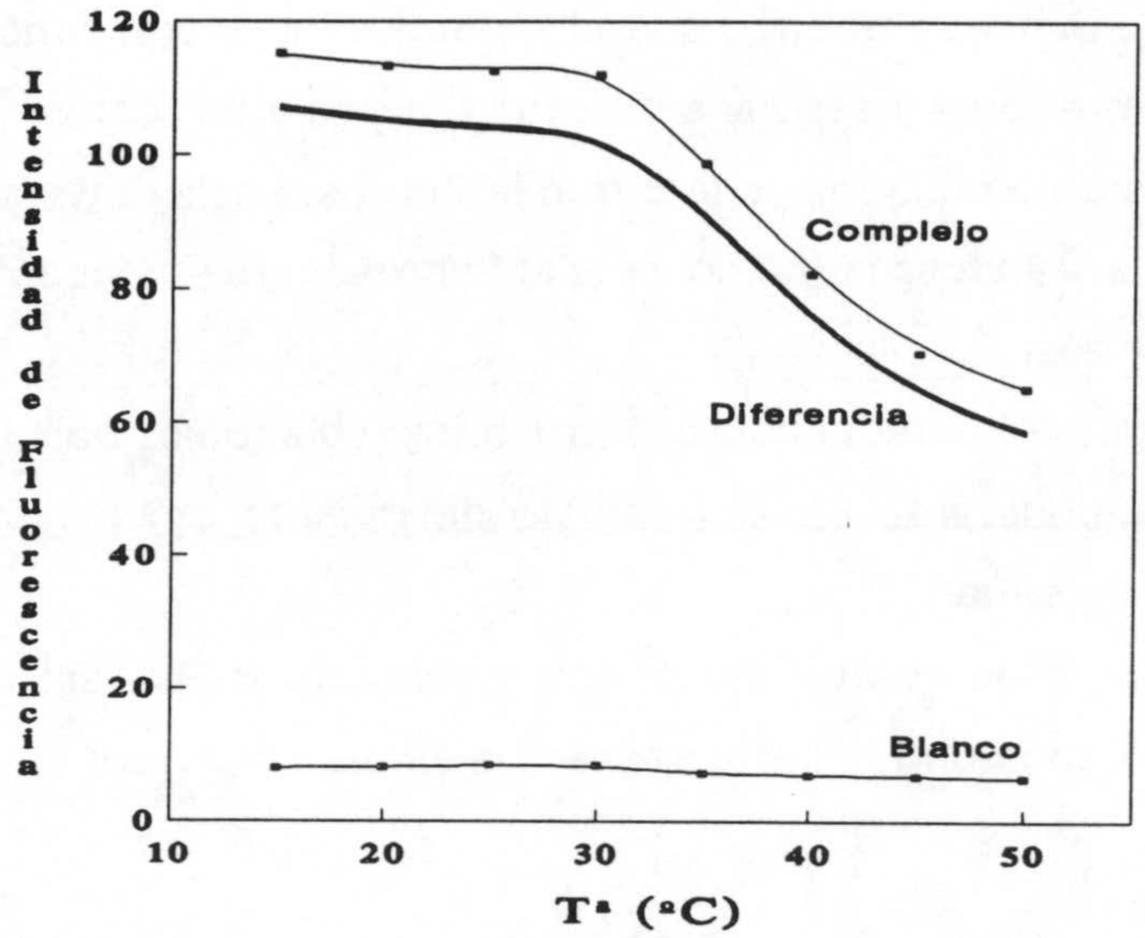


Figura V.9. Influencia de la temperatura. [V(V)] = [RAS] = 2.10^{-5}M. BCTA = 0'5 %, pH = 7'7.

Tras esta experiencia se decidió termostatar el compartimento de cubetas, así como las disoluciones de medida a 25'0 ± 0'5 °C.

* <u>Influencia de la concentración de BCTA</u>

Con objeto de conocer la concentración del tensioactivo catiónico que produjese un aumento máximo de la fluorescencia del complejo V(VI)-RAS, se llevó a cabo la siguiente experiencia: en matraces de 10 ml se adicionaron, en este orden, 0'2 ml de disolución de V(V) de concentración 10^{-3} M, 2 ml de disolución reguladora de pH 7'7, V ml de BCTA al 5 % y 0'2 ml de RAS 10^{-3} M.

Tras enrasar se midió la fluorescencia del complejo y su correspondiente blanco a 607 nm con excitación a 505 nm y rendijas de excitación y emisión de 7 nm, manteniendo la temperatura a 25°C. Los resultados se muestran en la

Tabla V.9 y se representan en la Figura V.10.

De los resultados se deduce que el aumento de fluorescencia se debe, al igual que en los anteriores métodos estudiados, a una interacción de tipo micelar ya que sólo en las proximidades de la c.m.c la fluorescencia del sistema aumenta notablemente, alcanzándose la máxima señal fluorescente a concentraciones muy superiores a este valor.

Sin embargo, la fluorescencia que presenta el blanco es baja, permaneciendo practicamente constante en el intervalo de meseta en el que el complejo presenta su máxima señal.

Se seleccionó, por tanto una concentración de BCTA del 0'5 % , valor comprendido en la zona donde la fluorescencia es máxima y constante.

Tabla V.9

Influencia de la concentración de BCTA

[BCTA], %	IFc	IFb
0'01	23'5	1'7
0'02	65'2	2'0
0'04	92'2	3'6
0'06	95'6	7'2
0'08	105'2	7'3
0'10	112'0	7'5
0'20	113'3	8'0
0'30	113'7	8'4
0'40	113'6	7'6
0'60	112'2	7'9
0'80	109'7	8'0
0'90	106'9	8'3

* **Influencia de la concentración del reactivo RAS**

Para establecer la concentración de Rojo de Alizarina S necesaria para máxima la formación del complejo binario en presencia de micelas de BCTA, se llevó a cabo la siguiente experiencia:

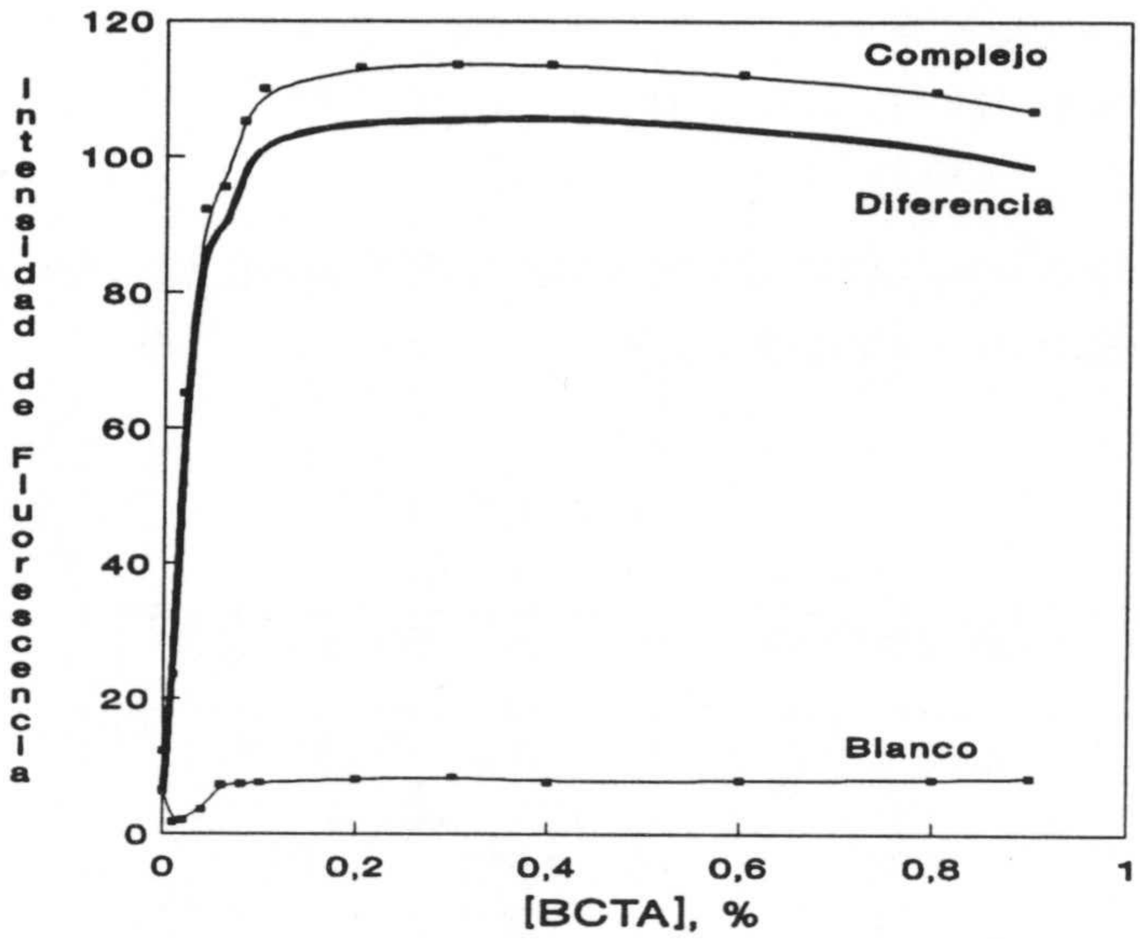


Figura V.10. Influencia de la concentración de BCTA. [V(V)] = [RAS] = 2.10^{-5}M. pH = 7'7.

En matraces de 10 ml se adicionaron, 0'2 ml de V(V) de concentración 10^{-3} M, 2 ml de disolución reguladora Tris/HCl, 1'0 ml de disolución de BCTA al 5 %, y cantidades crecientes de una disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando con agua destilada. Igualmente se prepararon los correspondientes blancos, temostatándose a 25°C.

Los resultados de las medidas de intensidad de fluorescencia, a las longitudes de onda de medida y rendijas de excitación y emisión de 7 nm, del complejo y su respectivo blanco se reflejan en la Tabla V.10 y se representan en la Figura V.11.

En la gráfica obtenida se observa:

- Un primer tramo en el que la intensidad de fluorescencia sufre un considerable aumento con la concentración de RAS hasta un valor próximo a $2'8.10^{-5}$ M.

- En el intervalo comprendido entre $2'8.10^{-5}$ y $3'6.10^{-5}$ M de RAS, la fluorescencia alcanza un valor máximo y permaneciendo constante.

- Por último, se observa el fenómeno de inversión de la fluorescencia con la concentración para valores superiores a $3'8.10^{-5}$ M.

En vista de los resultados obtenidos, se decide seleccionar una concentración de Rojo de Alizarina S de $3'2.10^{-5}$ M.

Tabla V.10

Influencia de la concentración de RAS

[RAS].10^5 M	IFc	IFb
0'2	16'5	2'2
0'4	27'8	3'6
0'8	55'7	5'1
1'2	78'3	6'6
1'6	98'3	7'2
2'0	111'3	8'2
2'4	120'5	8'9
2'8	130'3	9'5
3'0	132'2	10'0
3'2	133'0	10'3
3'4	132'8	10'2
3'6	133'1	10'6
3'8	128'7	10'4
4'0	125'2	11'3
4'4	118'3	11'9

* **Resumen de la optimización de variables experimentales**

Los valores óptimos establecidos para las distintas variables que afectan al desarrollo de la fluorescencia del complejo V(V)-RAS en medio micelar se recogen en la Tabla IV.11.

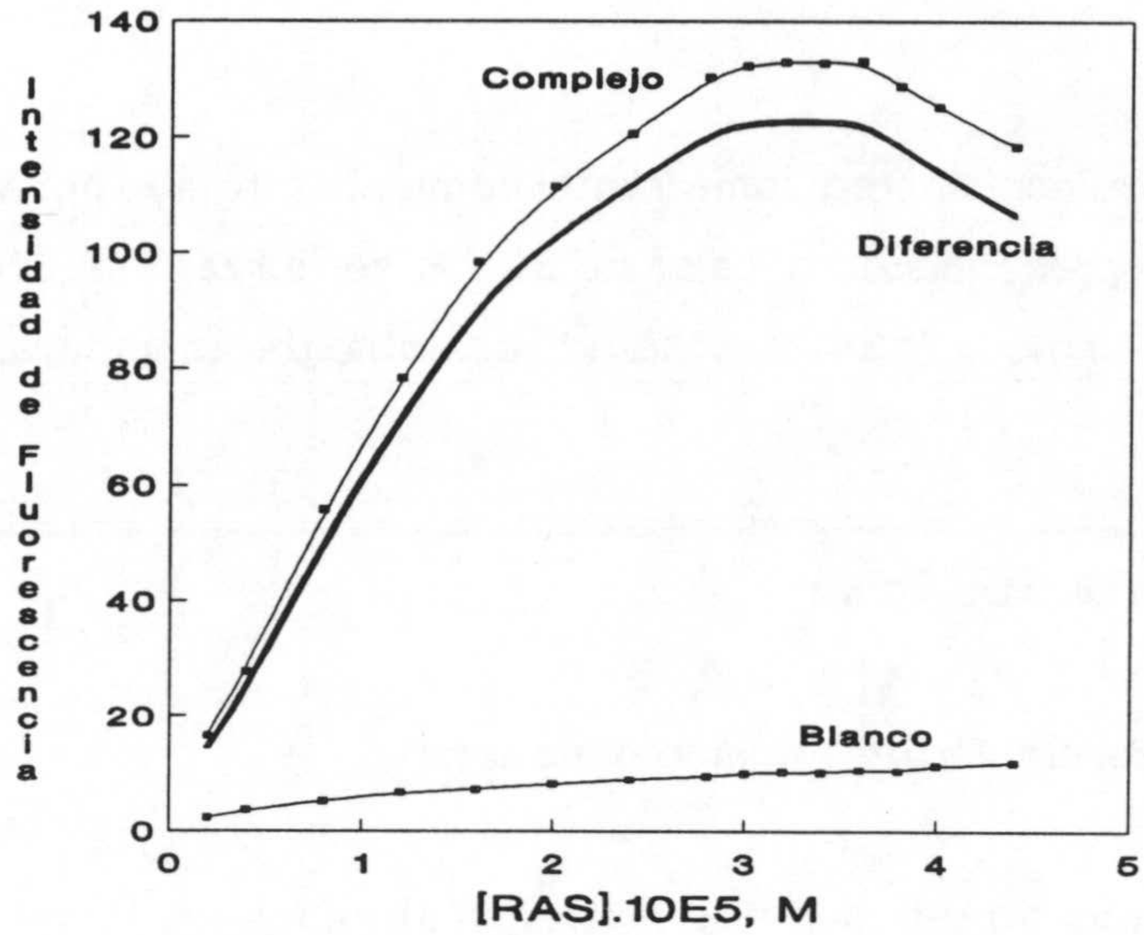


Figura V.11. Influencia de la concentración del reactivo RAS. [V(V)] = 2.10^{-5} M. [BCTA] = 0'5 %, pH = 7'7.

Tabla IV.11

Optimización de variables para el sistema V(V)-RAS en medio micelar

Variable	Valor óptimo
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	505/607 nm
pH	7'7
[Dis. reguladora]	Tris/HCl 0'02 M, pH 7'7
T^{a}	No afecta entre 15-30°C
Estabilidad	>5 h.
Orden de adición	No afecta
[BCTA]	0'5 %
[RAS]	3'2.10^{-5} M

3.3. ESTEQUIOMETRIA DEL COMPLEJO V(V)-RAS EN PRESENCIA DE BCTA

Para determinar la estequiometría del complejo formado por Vanadio y Rojo de Alizarina S en presencia de micelas de BCTA, se utilizaron el Método de Yoe-Jones o de la razón molar (**134**) y el Método de Job o de las variaciones continuas (**135**).

* ***Método de Yoe-Jones***

A) A concentración de Vanadio constante

Se preparan una serie de matraces aforados de 10 ml en los que se introduce una cantidad constante de Vanadio de modo que su concentración final sea 2.10^{-5} M, 2 ml de tampón Tris/ClH 0'1 M de pH 7'7, 1'0 ml de disolución de BCTA al 5 % y distintas concentraciones de reactivo, de forma que se establecen una serie creciente de razones molares (reactivo/analito).

Se miden las intensidades de fluorescencia para cada una de estas razones y para el correspondiente blanco a 607 nm, excitando a 505 nm. Las rendijas empleadas fueron de 7 nm.

Las señales obtenidas por diferencia de las correspondientes al complejo y su blanco se expresan en la Tabla V.12 y se representan en la Figura V.11.

B) A concentración de RAS constante

En una serie de matraces aforados de 10 ml se adicionan volúmenes crecientes de disolución de V(V) 10^{-3} M, 2 ml de tampón de pH 7'7, 1'0 ml de disolución de BCTA al 5 % y una cantidad constante de RAS, de modo que la concentración final sea $3'2.10^{-5}$ M, enrasándose hasta el volumen total con agua destilada. De este manera, se obtienen diferentes razones molares (reactivo/analito).

Tabla V.12

Estequiometría del complejo V(V)-RAS ([V(V)] = cte)

[RAS]/[V(V)]	IF
0'2	25'2
0'4	51'3
0'6	73'0
0'8	92'2
1'0	106'1
1'2	116'5
1'4	121'7
1'5	122'6
1'6	123'5
1'7	122'6
1'8	122'4
1'9	122'7

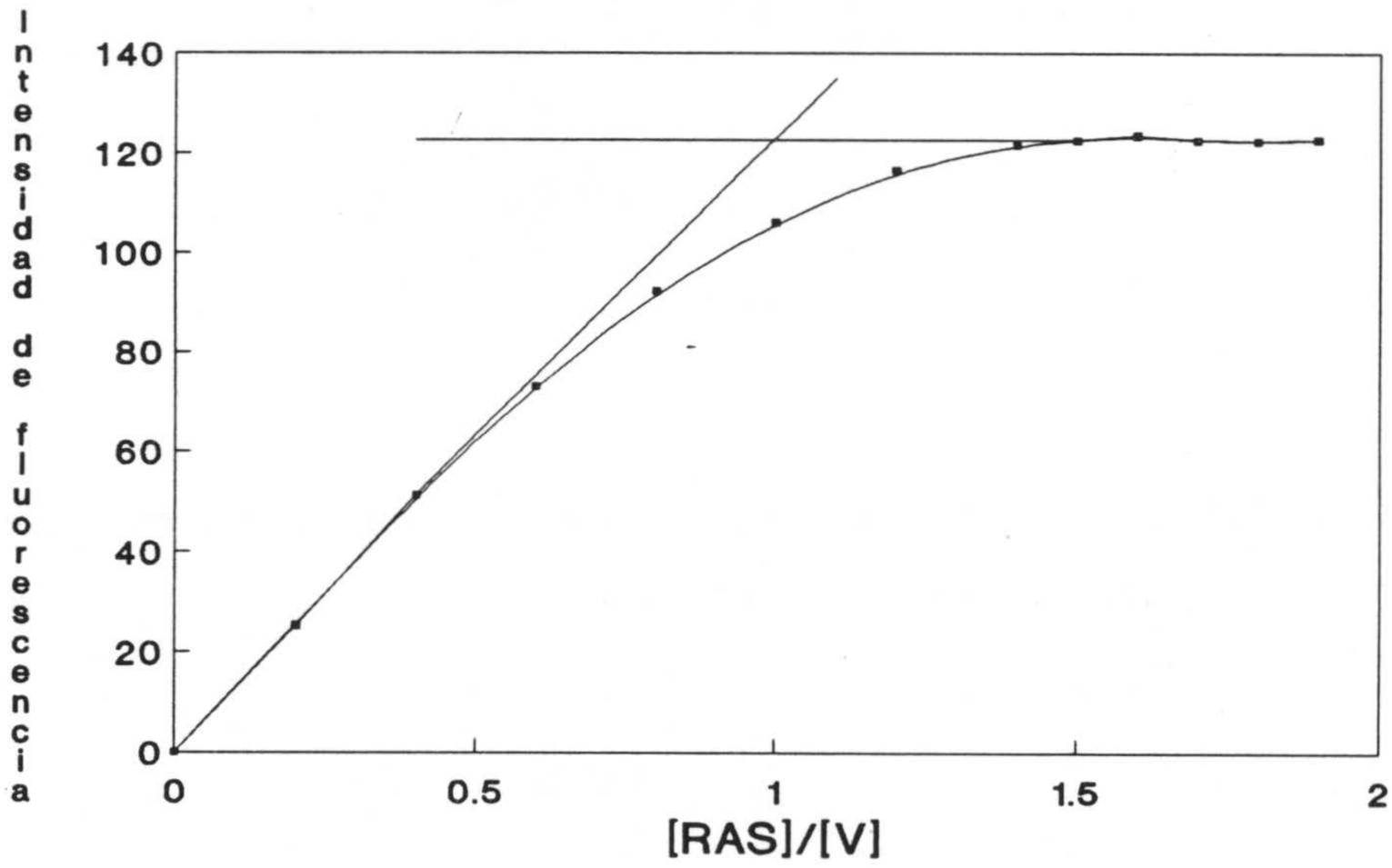


Figura V.12. Método de Yoe y Jones. [V(V)] = 2.10^{-5}M. [BCTA] = 0'5 %; pH = 7'7.

Se miden las intensidades de fluorescencia para cada una de estas razones a 607 nm, excitando a 505 nm. Las rendijas empleadas fueron de 7 nm.

Los resultados, obtenidos como diferencia del complejo y su respectivo blanco se expresan en la Tabla V.13 y se representan en la Figura V.13.

Tabla V.13

Estequiometría del complejo V(V)-RAS ([RAS] = cte)

[V(V)]/[RAS]	IF
0'1	21'7
0'2	40'9
0'3	62'6
0'4	82'6
0'5	100'9
0'6	120'0
0'7	135'7
0'8	151'3
1'0	166'1
1'2	175'5
1'4	179'1
1'6	178'3
1'8	178'1
2'0	176'3

En las dos experiencias realizadas se pone de manifiesto la existencia de un único complejo de estequiometría 1:1 (V(V):RAS).

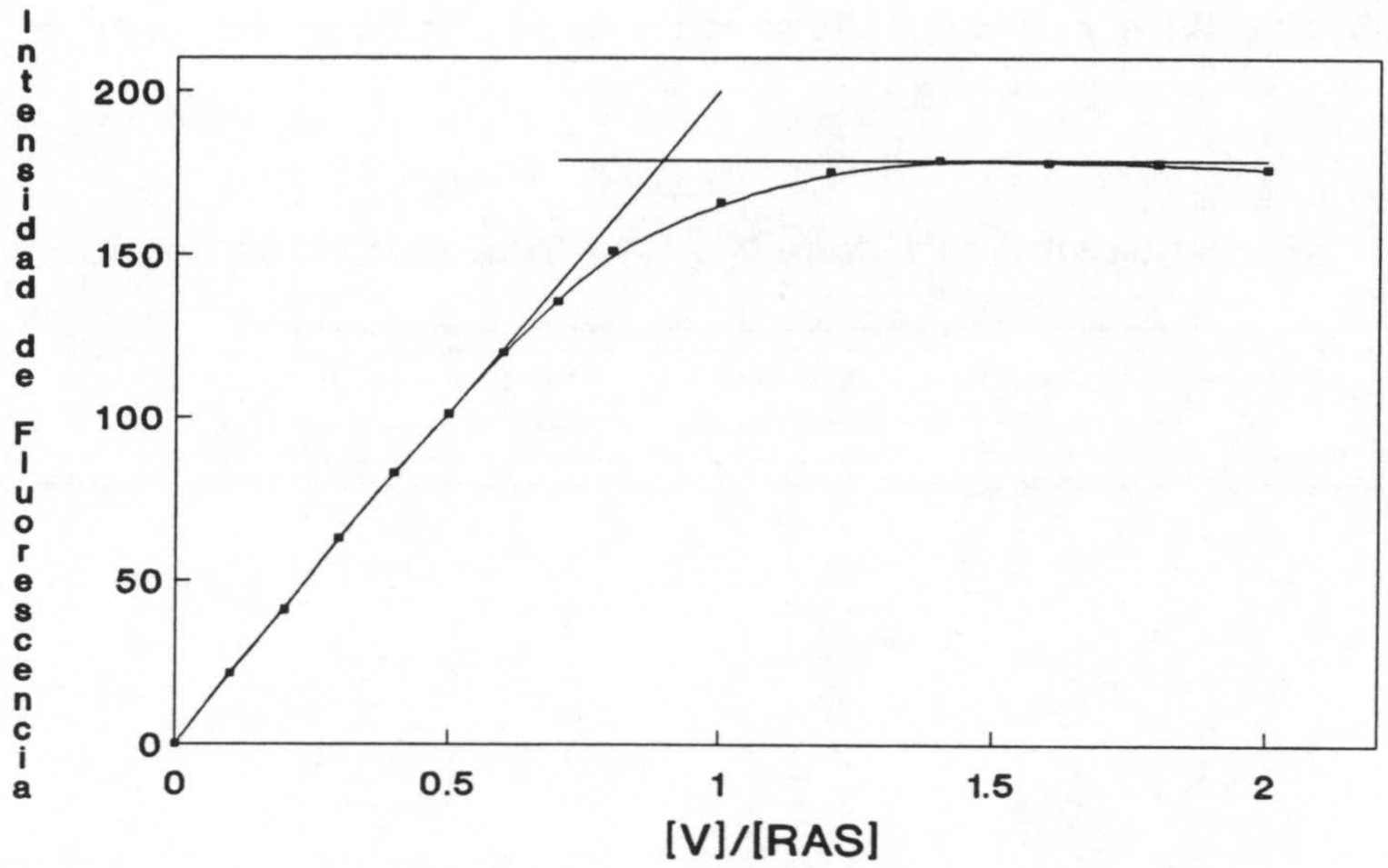


Figura V.13. Método de Yoe y Jones. [RAS]= 3'2.10^{-5} M; [BCTA]= 0'5 %; pH= 7'7

**** Método de Job***

En matraces aforados de 10 ml se introdujeron, por este orden, de 0'1 a 1'0 ml de disolución de V(V) 10^{-3} M, aumentando el volumen 0'1 ml en cada matraz, 2 ml de disolución tampón de pH 7'7, 1 ml de BCTA al 5 % y por último, de 0'9 a 0'1 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, disminuyendo el volumen en 0'1 ml al pasar al siguiente punto experimental.

Del mismo modo se preparó la correspondiente serie de blancos. Se enrasaron todos los matraces y se midió la fluorescencia a 607 nm, excitando a 505 nm. Las rendijas de excitación y emisión empleadas fueron de 7 nm.

En la Tabla V.14 se recogen los resultados obtenidos para cada relación molar encontrada. En la Figura V.14 se representan las señales de fluorescencia

obtenidas en función del cociente $m = x/x+y$, en donde x es el volumen de de disolución de V(V) e y corresponde al volumen de disolución del reactivo.

Tabla V.14

Estequiometría del complejo V(V)-RAS. Método de Job

x (ml)	y (ml)	m	IF
0'1	0'9	0'1	43'5
0'2	0'8	0'2	104'3
0'3	0'7	0'3	146'1
0'4	0'6	0'4	201'7
0'5	0'5	0'5	215'7
0'6	0'4	0'6	200'1
0'7	0'3	0'7	169'6
0'8	0'2	0'8	127'8
0'9	0'1	0'9	62'6

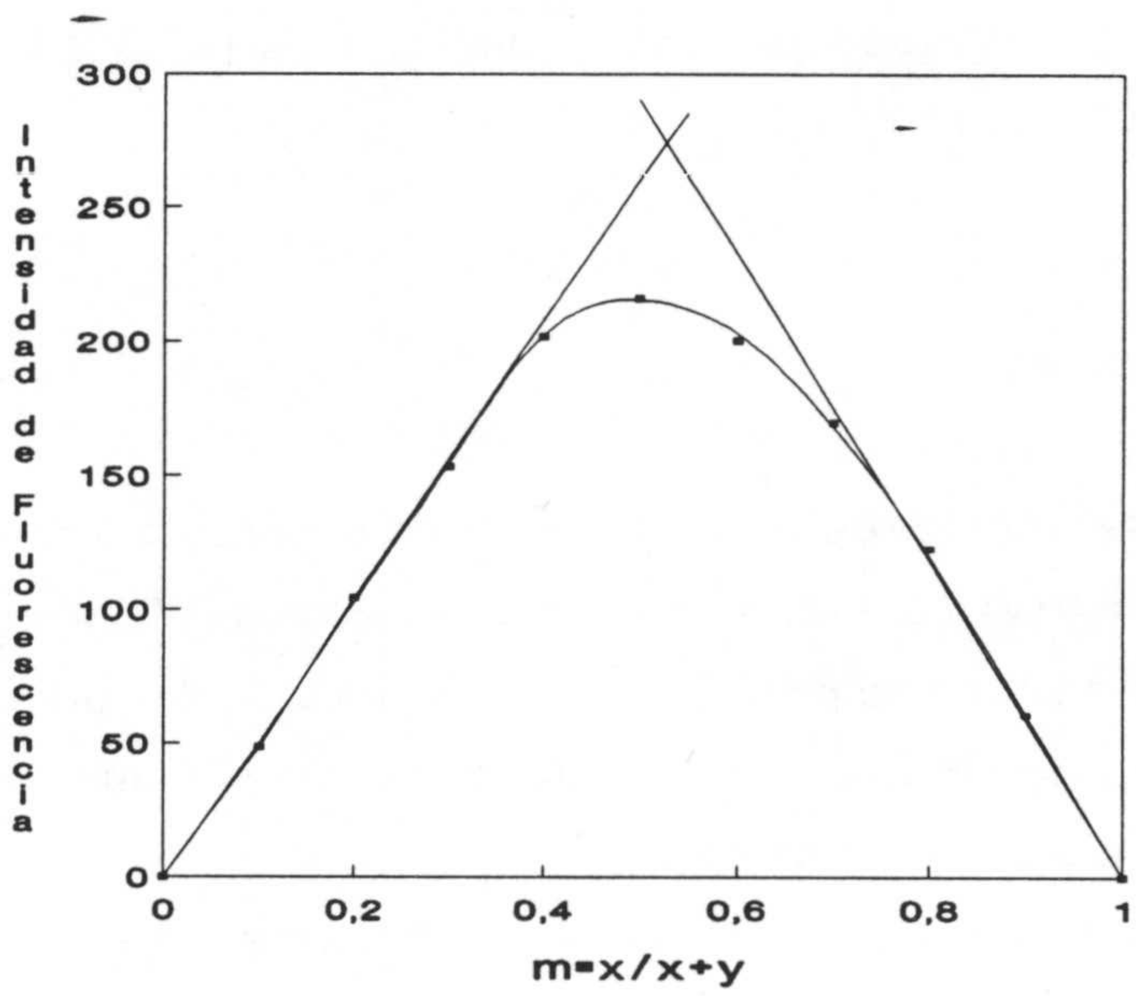


Figura V.14. Método de Job. *x*, Volumen de V(V); *y*, Volumen de RAS. [BCTA]= 0'5 %; pH= 7'7.

Mediante este método también se confirma que la relación estequiométrica entre Vanadio y el reactivo Rojo de Alizarina S en medio micelar catiónico es 1:1.

4. ESTABLECIMIENTO DE LA DETERMINACION FLUORIMETRICA EN PRESENCIA DE BCTA

4.1. INTERVALO LINEAL. RECTAS DE CALIBRADO

Posteriormente se procedió a determinar el intervalo de aplicación del método donde existe una dependencia lineal de la señal fluorescente con la concentración de V(V), realizando un estudio de la influencia de la concentración de analito sobre la fluorescencia, una vez optimizadas las variables experimentales que afectan a tal determinación.

Para ello se preparan una serie de matraces de 10 ml en los que se introducen de volúmenes crecientes de disolución de V(V) de 10 ppm, 2 ml de disolución reguladora Tris/HCl de pH 7'7, 1 ml de BCTA al 5 % y 0'32 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. De la misma forma se prepara el correspondiente blanco.

Se llevaron a cabo las medidas de fluorescencia con: λ_{ex} = 505 nm y λ_{em} = 607 nm. Las rendijas de excitación y emisión empleadas fueron de 7 nm y la temperatura de medida 25'0 ± 0'5°C. Los resultados se muestran en la Tabla V.15 y se representan en la Figura V.15.

Se observó que el intervalo lineal parece extenderse hasta el tramo comprendido entre 1'00 y 1'15 ppm de V(V), observándose a partir de este valor cierta curvatura en el ajuste de los datos experimentales, de modo que se aplicó el *Test del Fallo de Ajuste* para evaluar la adecuación del modelo de regresión lineal a los puntos experimentales a partir de los datos obtenidos en el ANOVA y observar si el último valor evaluado debe ser descartado o no del rango lineal.

Tabla V.15

Comprobación del intervalo lineal

[V(V)], ppm	IF
0'00	11'4
0'20	36'8
0'40	60'8
0'60	88'3
0'80	110'8
1'00	138'1
1'15	151'5
1'30	170'8
1'60	181'5

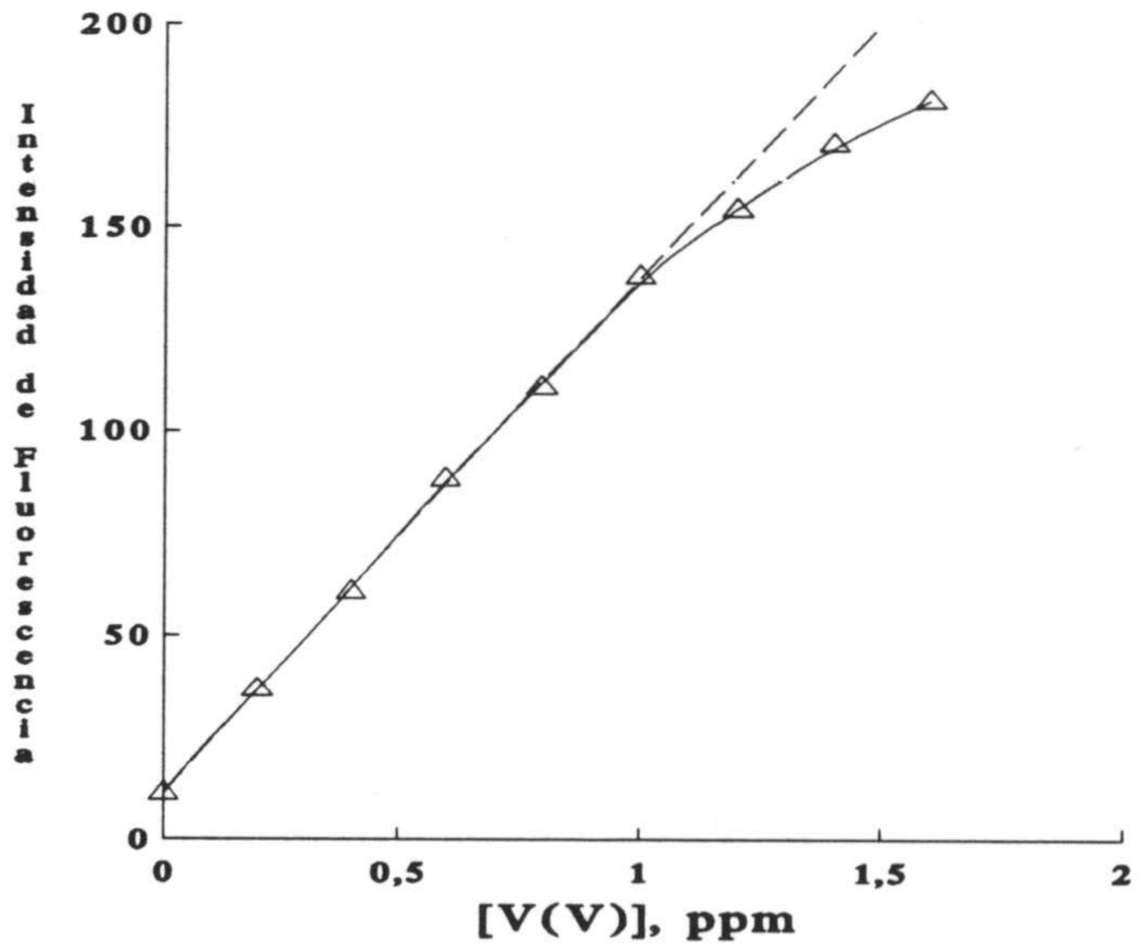


Figura V.15. Establecimiento del intervalo lineal. [RAS] = 3'2.10^{-5} M, [BCTA] = 0'5 %, pH = 7'7

Se realizaron tres réplicas para cada valor de concentración, mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla V.16.

Tabla V.16

Datos para la evaluación de la linealidad mediante el ANOVA

[V(V)], ppm	IF		
0'00	11'4	10'8	10'3
0'20	36'8	35'3	37'4
0'40	60'8	63'8	62'7
0'60	88'3	87'9	86'2
0'80	110'8	113'9	112'8
1'00	138'1	135'8	136'2
1'15	151'5	152'6	150'8

Se llevó a cabo un Análisis de la varianza con los datos del calibrado obteniéndose un valor del estadístico $F_{cal} = 5'95$. Para comprobar si existe curvatura se compara con el valor tabulado ($F_{tab}(0'05, 5, 14) = 2'96$). En este caso como $F_{cal} < F_{tab}$ ($P = 0'037$ %) existe una desviación significativa de la linealidad ya que la varianza obtenida por el fallo en el ajuste de los datos experimentales es superior a la debida al error aleatorio.

Eliminando el último punto experimental se volvió a repetir el ANOVA. En este caso el test del Fallo de ajuste concluye de modo contrario ($F_{cal} = 0'86$, $F_{tab}(0'05, 4, 12) = 3'26$) y obteniéndose por tanto un buen ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal ($P = 51'4$ %).

Debido al amplio rango de aplicación del método, se establecen dos calibrados en distintas condiciones de sensibilidad instrumental.

A) *Rango entre 0'2 y 1'0 ppm*

Queda establecido con los datos de la experiencia anterior una vez comprobado el ajuste de los puntos experimentales entre 0'2 y 1'0 ppm. Para su obtención se prepararon una serie de matraces de 10 ml que contienen: de 0'2 a 1'0 ml de disolución de V(V) de 10 ppm, 2 ml de disolución reguladora Tris/HCl de pH 7'7, 1 ml de BCTA al 5 % y 0'32 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. De igual modo se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas a 25°C, con rendijas de excitación y de emisión de 7 nm, siendo la λ_{ex} = 505 nm y la λ_{em} = 607 nm.

Se realizaron tres réplicas para cada valor de concentración y sus correspondientes intensidades de fluorescencia se han relacionado en la Tabla V.15 y se representan, sin restar el blanco, en la Figura V.16.

El ajuste de esta recta por mínimos cuadrados, considerando el blanco como un valor más y sin restarlo de los demás puntos experimentales, proporciona los valores que se reunen en la Tabla V.17.

Tabla V.17

Datos estadísticos de la recta de calibrado (Rango 0'2-1'0 ppm)

Ordenada en el origen (a) = 11'379
Desviación estándar (s_a) = 0'496 DER (a) = 4'36 %
Pendiente (b) = 126'05
Desviación estándar (s_b) = 0'819 DER (b) = 0'65 %
Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$) = 1'188
Coef. de correlación (r) = 0'9997
Coef. de determinación (r^2) = 99'93 %
g = $2'0.10^{-4}$
Fallo de Ajuste (P= 51'4 %)

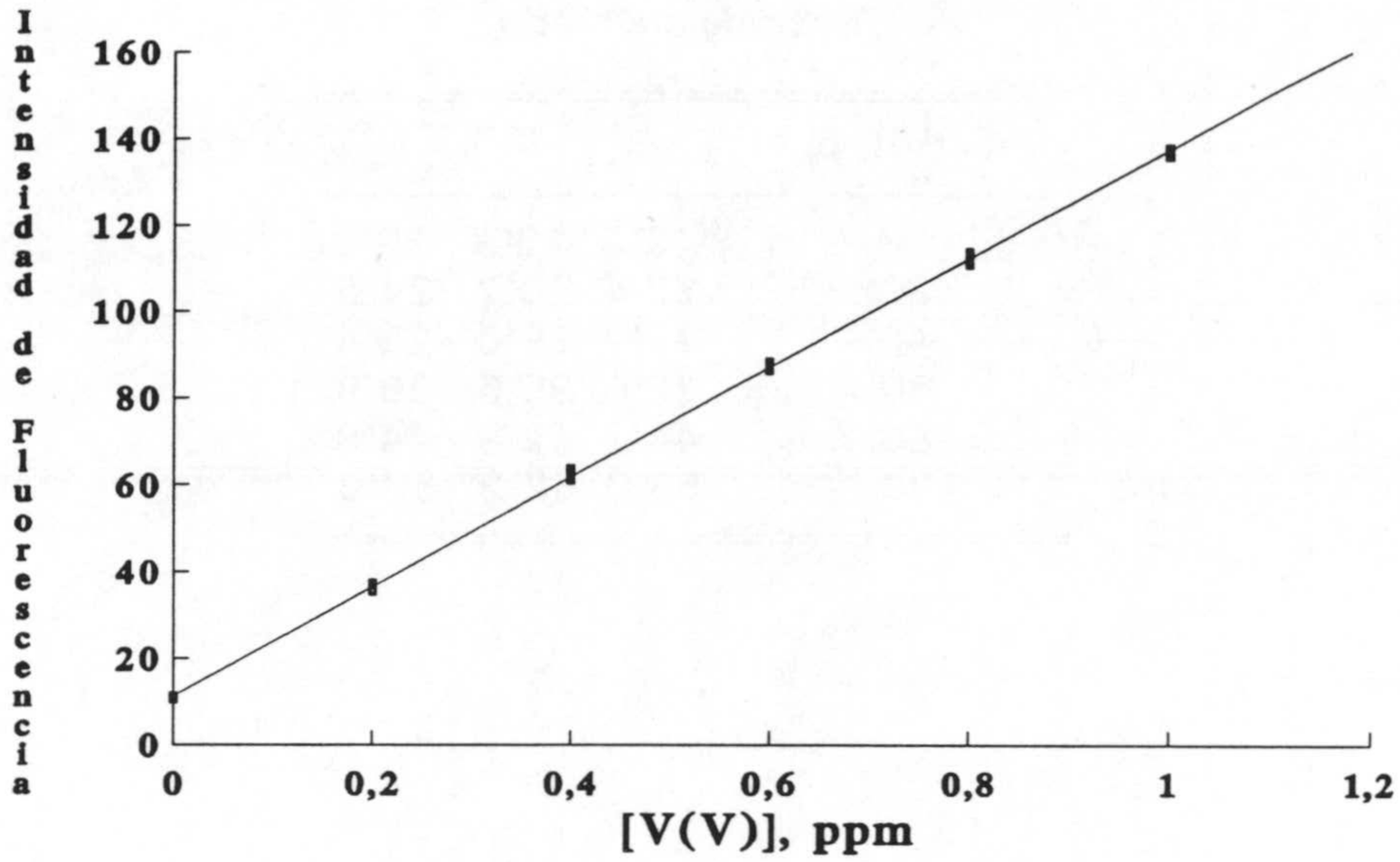


Figura V.16. Recta de calibrado (0'2-1'0 ppm). Rendijas de excitación y emisión, 7/7 nm.

B) ***Rango entre 20 y 100 ppb***

Se preparó una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron: de 0'2 a 1'0 ml de disolución de V(V) de 1 ppm, 2 ml de disolución reguladora Tris/HCl de pH 7'7, 1'0 ml de BCTA al 5 % y 0'32 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, llevando hasta el volumen final con agua destilada. Se necesitaron tres réplicas para cada valor de concentración, así como del correspondiente blanco.

Las medidas fueron realizadas termostatando el compartimento de cubetas a 25 °C, a las mismas longitudes de onda del apartado anterior, utilizando rendijas de excitación y de emisión de 12 nm.

Los resultados se expresan en la Tabla V.18 y se representan en la Figura V.17.

Tabla V.18

Recta de calibrado

[V(V)], ppb	IF		
0	13'3	12'9	12'0
20	20'4	20'7	21'6
40	27'7	29'0	28'4
60	36'5	35'5	36'9
80	44'1	42'9	44'8
100	54'0	52'2	53'0

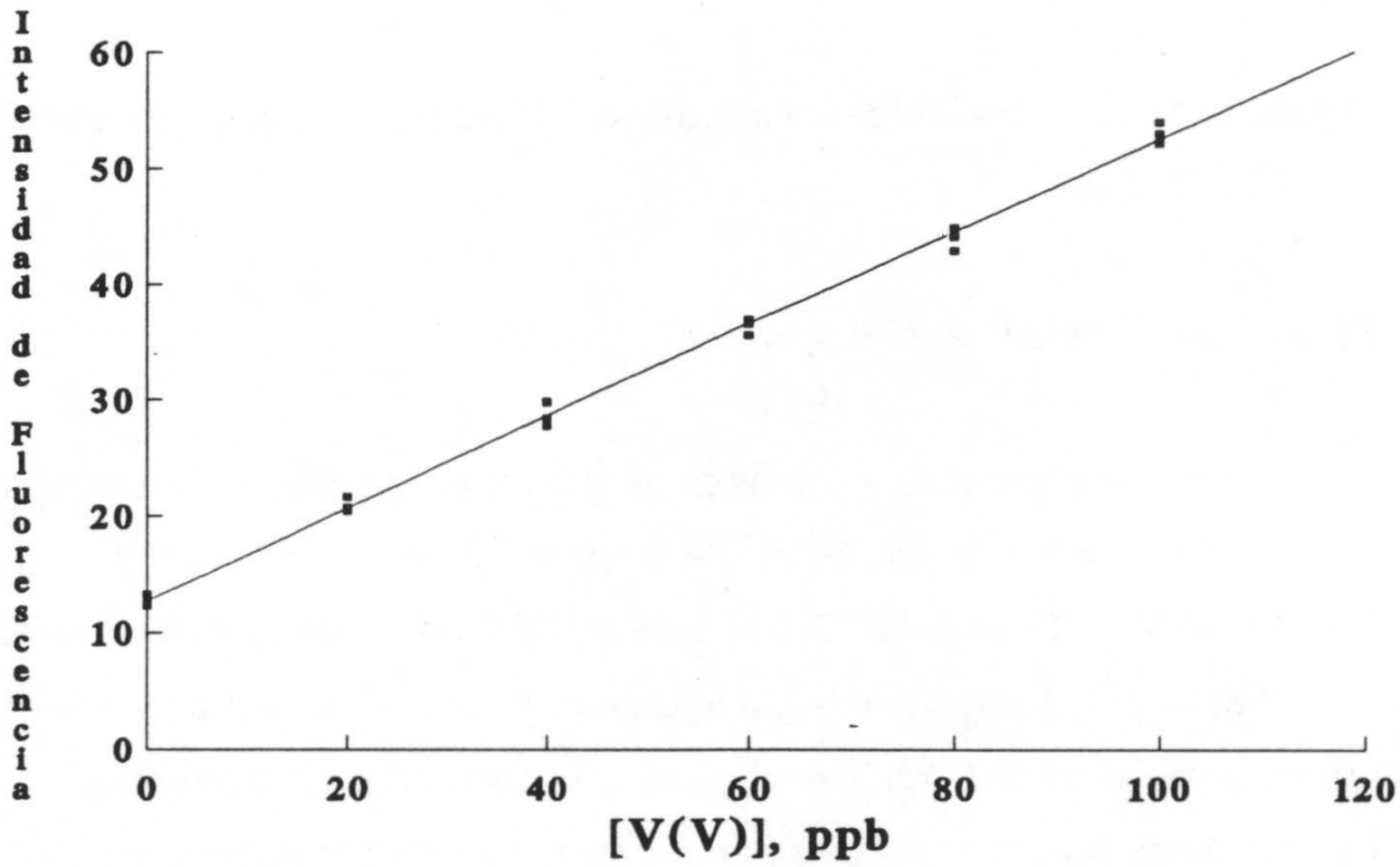


Figura V.17. Recta de calibrado (20-100 ppb). Rendijas de excitación y emisión, 12/12 nm.

El ajuste de la recta por mínimos cuadrados sin restar el blanco, proporciona la información que se recoge en la Tabla V.19.

Tabla V.19

Datos estadísticos de la recta de calibrado (Rango 20-100 ppb)

Ordenada en el origen (a) = 12'643
Desviación estándar (s_a) = 0'325 DER (a) = 2'57 %
Pendiente (b) = 0'398
Desviación estándar (s_b) = 0'005 DER (b) = 1'35 %
Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$) = 0'777
Coef. de correlación (r) = 0'9986
Coef. de determinación (r^2) = 99'71 %
g = $8'0.10^{-4}$
Fallo de Ajuste (P= 39'2 %)

En este rango también se ha aplicado el *Test del Fallo de Ajuste*, evaluando así la bondad del ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal aplicado. Como $F_{cal} = 1'12 < F_{tab}(0'05, 4, 12) = 3'26$, se obtiene un valor P mayor del 5%, lo cual implica que la posible desviación de la linealidad es debida exclusivamente al error accidental y por tanto que no existe curvatura, siendo válido el modelo lineal, con un nivel de confianza del 95 %.

4.2. PARÁMETROS DE FIABILIDAD

Se han utilizado tanto los criterios recomendados por la IUPAC como el modelo de regresión lineal, para establecer la comparación entre los diferentes parámetros que definen la calidad de un método analítico como son la linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación.

También se ha calculado el Límite de detección de Clayton que utiliza la

desviación estándar del blanco obtenida a partir de los datos de regresión.

A) *Según la IUPAC*

Límites de detección y cuantificación

Para el cálculo de los límites de detección y determinación, se preparan 10 muestras de blanco, según el procedimiento establecido, para cada uno de los rangos de concentración. Los resultados obtenidos así como su tratamiento estadístico (señal media, IFm y desviación estándar, s) se muestran en la Tabla V.20 para ambas rectas de calibrado.

Tabla V.20

Repetitividad del blanco.

Rango 0'2-1'0 ppm		*Rango 20-100 ppb*	
BLANCO	IF	BLANCO	IF
1	11'4	1	13'3
2	10'8	2	12'9
3	10'3	3	12'0
4	10'3	4	13'4
5	10'5	5	13'2
6	11'0	6	13'0
7	11'2	7	12'8
8	11'9	8	12'9
9	11'2	9	13'3
10	10'7	10	13'0
IFm	10'93	IFm	12'98
s	0'512	s	0'399

Precisión

Para su determinación, se preparan dos series de 10 matraces, cada una de las cuales con un contenido en Vanadio(V) perteneciente a cada rango de concentración:

Rango 0'2-1'0 ppm: 0'4 ppm

Rango 20-100 ppb: 60 ppb

A todos los matraces se les aplicó el procedimiento operatorio descrito. Los resultados se muestran en la Tabla V.21, en la que se encuentran los valores de intensidad de fluorescencia frente a las concentraciones halladas mediante la correspondiente recta de calibrado.

Tabla V.21

Datos de repetitividad

Rango 0'2-1'0 ppm		*Rango 20-100 ppb*	
IF	[V(V)],ppm	IF	[V(V)],ppb
60'8	0'392	36'5	59'9
63'8	0'415	35'5	57'4
62'7	0'407	36'9	60'9
60'5	0'389	37'2	61'7
61'6	0'398	35'9	58'4
62'0	0'401	36'4	59'7
63'1	0'410	36'6	60'2
60'9	0'393	37'0	61'2
62'5	0'406	35'8	58'2
62'2	0'403	36'7	60'4
$[\overline{V}]$	0'401	$[\overline{V}]$	59'80
s	0'008	s	1'398

La estimación de los parámetros mediante el modelo propuesto por la IUPAC aparece en la Tabla V.22.

Tabla V.22

Parámetros de Fiabilidad calculados con los criterios sugeridos por la IUPAC

	Rango 0'2-1'0 ppm	***Rango 20-100 ppb***
Linealidad (r^2%)	99'93	99'71
Sensibilidad de calibrado (IF/[V(V)])	126'05	0'398
Límite de detección	0'012 ppm	3'00 ppb
Límite de cuantificación	0'041 ppm	10'02 ppb
Precisión, DER %	(0'4 ppm) 2'00 %	(60 ppb) 2'33 %
Rango Dinámico lineal	8'3	3'3

B) ***Según el análisis de la regresión***

La sensibilidad analítica, así como la linealidad son establecidas mediante el uso de los datos derivados de ambos calibrados, reflejados en las Tablas V.17 y V.19.

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar tanto de los blancos, así como de cada uno de los patrones usados para el establecimiento de las rectas de calibrado, respectivamente.

Los resultados se muestran en la Tabla V.23.

Tabla V.23

Desviaciones estándar en función del calibrado

Rango 0'2-1'0 ppm		***Rango 20-100 ppb***	
[V(V)],ppm	$s/10^{-3}$	[V(V)],ppb	s
0'00	6'73	0	1'389
0'20	6'20	20	1'279
0'40	5'91	40	1'225
0'60	5'92	60	1'223
0'80	6'20	80	1'276
1'00	6'70	100	1'400

La estimación de todos los parámetros característicos del método, calculados a partir de este modelo, aparece en la Tabla V.24.

Tabla V.24

Parámetros de Fiabilidad obtenidos mediante el modelo de Regresión lineal

	Rango 0'2-1'0 ppm		Rango 20-100 ppb	
Linealidad (1- DER(b)%)	99'35		98'65	
Sensibilidad analítica	0'009 ppm		1'951 ppb	
Límite de detección	0'020 ppm		4'17 ppb	
Límite de cuantificación	0'067 ppm		13'49 ppb	
Rango dinámico lineal	5		2'4	
Precisión (DER %)	0'2 ppm	3'11	20 ppb	6'17
	0'4 ppm	1'46	40 ppb	3'10
	0'6 ppm	0'98	60 ppb	2'06
	0'8 ppm	0'77	80 ppb	1'62
	1'0 ppm	0'67	100 ppb	1'38

Es posible representar graficamente la precisión frente a cada uno de los valores de concentración del calibrado, y de esta forma y por interpolación, se puede estimar la DER(%) para cualquier valor de concentración dentro del rango lineal.

El resultado de esta representación para ambos calibrados aparece en la Figura V.18, en la que se comprueba que el error relativo sobre la concentración es menor a medida que ésta aumenta. El mayor error en la estimación corresponde a los límites de cuantificación para ambos rangos, los cuales, por definición, llevan asociado un 10 % de desviación estándar relativa.

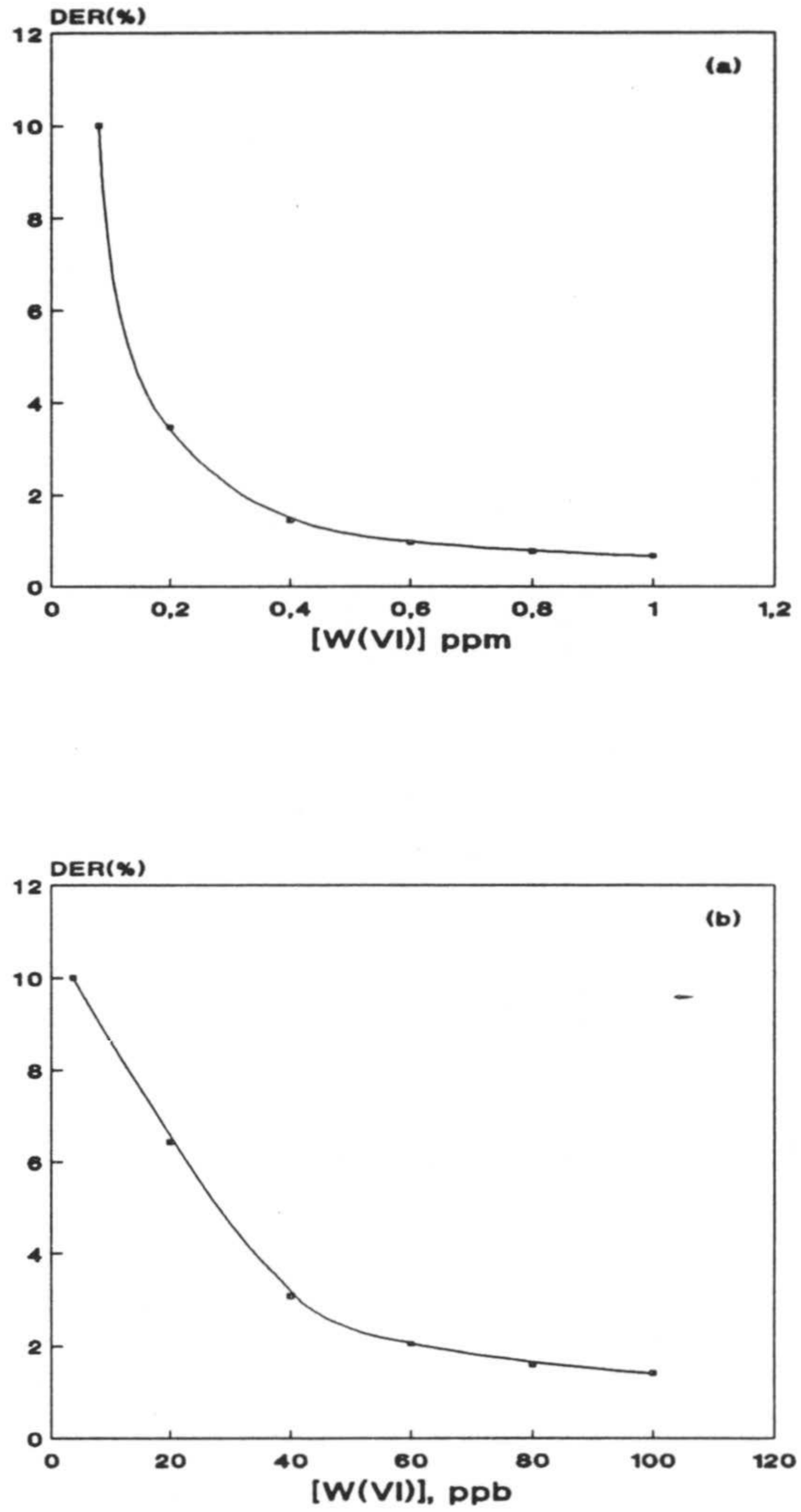


Figura V.18. Estimación de la precisión. (A) Rango 0'07-1'00 ppm; (B) Rango 13'5-100'0 ppb.

C) Límite de detección de Clayton

Se obtiene utilizando el valor de la desviación estándar de los blancos, estimada sobre la concentración. Este valor para ambos calibrados aparece en la Tabla V.20 y se ha obtenido a partir de la aplicación del modelo de regresión con réplicas para cada valor de concentración. Los resultados para ambos tramos lineales son:

$$LD = s_{blanco} * \Delta(\alpha = 0'05, \beta = 0'05)$$

* Rango 0'2-1'0 ppm

n = 18; $\Delta(n-2)$ = 3'44; LD = 0'023 ppm

* Rango 20-100 ppb

n = 18; $\Delta(n-2)$ = 3'44; LD = 4'78 ppb

Los resultados obtenidos mediante esta estimación del límite de detección están de acuerdo con los obtenidos aplicando la regresión lineal a los datos replicados del calibrado.

SELECTIVIDAD

Para establecer la selectividad del método fluorimétrico propuesto, se estudió la presencia de posibles iones interferentes en la determinación de Vanadio(V) con Rojo de Alizarina S en medio micelar.

Como criterio para decidir si la sustancia es o no interferente, se aplica el modelo propuesto, obteniéndose un intervalo de confianza sobre la señal de fluorescencia predicha, correspondiente a la concentración de analito sobre la cual se va a ensayar la interferencia.

En la Tabla V.25 se muestran las desviaciones estándar de las señales de

fluorescencia pertenecientes a cada una de las concentraciones de la recta de calibrado inferior, así como el correspondiente intervalo de confianza sobre la señal (ICR) calculado con un 95 % de confianza:

$$ICR = R \pm s_R.t$$

siendo R, señal analítica predicha a partir del calibrado; s_R, desviación estándar de la señal y t(α=0'10,n-2 grados de libertad).

Tabla V.25

Desviaciones estándar e intervalos de confianza sobre la señal predicha

[V(V)],ppb	R	s_R	ΔR (±)	ICR
20	20'60	0'814	1'421	19'2 - 22'0
40	28'57	0'800	1'396	27'2 - 30'0
60	36'53	0'800	1'396	35'1 - 37'9
80	44'49	0'814	1'421	43'0 - 45'9
100	52'45	0'842	1'470	51'0 - 53'9

t(α=0'10,16 gl) = 1'746

Debido a que la presencia de un interferente provoca un mayor error en las zona más baja del rango lineal, y con objeto de poder concretar la concentración de interferente tolerada en todo el rango de aplicación del método, se ha seleccionado una concentración de 60 ppb como valor sobre el cual ensayar los diferentes iones extraños.

La experiencia que se llevó a cabo fue la siguiente:

En matraces de 10 ml se introdujeron un cantidad de V(V) constante e igual a 60 ppb y cantidades decrecientes de cada uno de los iones ensayados como posibles interferentes, comenzando por 60 ppm y disminuyendo esta concentración hasta alcanzar un valor de intensidad de fluorescencia comprendido dentro del

intervalo de confianza. Posteriormente se aplicó el procedimiento operatorio B ya descrito y se procedió a la lectura de la intensidad de fluorescencia a 25°C, con rendijas de excitación y de emisión de 12 nm, siendo la λ_{ex} = 505 nm y la λ_{em} = 607 nm.

En la Tabla V.26 se muestran los valores de intensidad de fluorescencia mediante los cuales se ha deducido la función polinómica que mejor se ajusta a la respuesta de cada interferente, mediante el método interpolación de Lagrange.

El punto de corte de este polinómio con la banda superior o inferior del intervalo de confianza obtenido sobre la predicción de la señal correspondiente a 60 ppb, indica la concentración tolerada de sustancia interferente en todo el rango de aplicación del método.

Todos los valores de señal que no estén incluidos dentro de ese intervalo, deducido a partir de los datos del calibrado, implican que la sustancia es interferente al nivel de concentración ensayado.

Para la concentración de Vanadio(V) que hemos seleccionado (60 ppb), el intervalo de confianza sobre la señal de fluorescencia predicha, a partir de los datos del calibrado es:

$$IF \in 36'53 \pm 1'40$$

Según esto, todos los valores de concentración de ión extraño cuya intensidad de fluorescencia no esté comprendida en el intervalo {35'1 - 37'9}, al cúal le corresponde un error relativo sobre la concentración de ± 5'8 %, serán considerados como interferencia.

Tabla V.26. Estudio de Interferencias

Ión extraño	Cx/C_v	Cx(ppb)	Log Cx	R
Li(I)	1000	60000	4'78	36'4
Na(I)	1000	60000	4'78	36'8
K(I)	1000	60000	4'78	36'2
Rb(I)	1000	60000	4'78	36'6
Cs(I)	1000	60000	4'78	36'0
Be(II)	50	3000	3'48	88'7
	10	600	2'78	86'9
	5	300	2'48	78'6
	1	60	1'78	37'7
Mg(II)	1000	60000	4'78	35'8
Ca(II)	1000	60000	4'78	36'8
Sr(II)	1000	60000	4'78	35'9
Ba(II)	500	30000	4'48	28'7
	100	6000	3'78	35'8
Zr(IV)	100	6000	3'78	241'9
	50	3000	3'48	110'8
	25	1500	3'18	44'8
	10	600	2'78	35'9
Cr(III)	1000	60000	4'78	pta
	500	30000	4'48	pta
	100	6000	3'78	25'0
	50	3000	3'48	35'7
Mo(VI)	100	6000	3'78	93'8
	10	600	2'78	44'6
	5	300	2'48	37'3

Tabla V.26. (continuación)

Ión extraño	Cx/C_v	Cx(ppb)	Log Cx	R
W(VI)	50	3000	3'48	55'3
	25	1500	3'18	45'4
	10	600	2'78	37'6
Mn(II)	1000	60000	4'78	36'9
Fe(III)*	1000	60000	4'78	16'4
	500	30000	4'48	28'5
	100	6000	3'78	34'4
Co(II)	1000	60000	4'78	35'9
Ni(II)	1000	60000	4'78	36'1
Cu(II)	100	6000	3'78	20'7
	50	3000	3'48	24'1
	25	1500	3'18	35'8
Zn(II)	1000	60000	4'78	84'1
	100	6000	3'78	51'1
	50	3000	3'48	37'7
Cd(II)	1000	60000	4'78	37'7
B(III)	500	30000	4'48	54'4
	200	12000	4'08	37'3
Al(III)	100	6000	3'78	46'3
	50	600	2'78	40'4
	10	300	2'48	37'1
Sn(II)	1000	60000	4'78	42'4
	100	6000	3'78	41'7
	50	300	2'48	36'6

Tabla V.26. (continuación)

Ión extraño	Cx/C_v	Cx(ppb)	Log Cx	R
Pb(II)	500	30000	4'48	pta
	100	6000	3'78	36'3
SiO_3^{2-}	1000	60000	4'78	37'2
NO_3^-	1000	60000	4'78	36'3
NO_2^-	1000	60000	4'78	37'0
PO_4^{3-}	1000	60000	4'78	38'3
Bi(III)	500	30000	4'48	18'9
	100	6000	3'78	20'3
	50	3000	3'48	35'9
SO_4^{2-}	1000	60000	4'78	36'9
SCN^-	1000	60000	4'78	35'7
F^-	1000	60000	4'78	90'8
	500	30000	4'48	78'3
	100	6000	3'78	44'4
	50	3000	3'48	37'0
Cl^-	1000	60000	4'78	35'8
Br^-	1000	60000	4'78	36'0
I^-	1000	60000	4'78	37'9
Tartrato	1000	60000	4'78	74'7
	500	30000	4'48	41'8
	100	6000	3'78	37'2
Citrato	1000	60000	4'78	70'8
	100	6000	3'78	58'3
	10	600	2'78	48'4
	1	60	1'78	38'2

Tabla V.26. (continuación)

Ión extraño	Cx/C_v	Cx(ppb)	Log Cx	R
EDTA	1000	60000	4'78	10'1
	500	30000	4'48	14'8
	100	6000	3'78	24'4
	50	3000	3'48	36'6
$P_2O_7^{4-}$	10000	6.10^5	5'78	38'2

* $[P_2O_7^{4-}] = 600$ ppm

La cantidad tolerada para cada uno de los iones ensayados, en la determinación de Vanadio(V) con Rojo de Alizarina S en presencia del surfactante catiónico BCTA, así como la relación de tolerancia encontrada para la concentración de interferente se relaciona en la Tabla V.27.

De lo expuesto anteriormente se deduce que, de las 40 especies ensayadas, 22 son toleradas en concentraciones iguales o superiores a 60 ppm, lo que supone una relación ión extraño/analito igual o superior a 1000 veces y la mayor parte de las restantes son toleradas en relaciones comprendidas entre las 50-500 veces, lo que destaca la adecuada selectividad de la determinación fluorimétrica.

Tabla V.27. Niveles de tolerancia

Ión extraño	Cx/C_v	c_t (ppb)
Li(I)	1000	60000
Na(I)	1000	60000
K(I)	1000	60000
Rb(I)	1000	60000
Cs(I)	1000	60000
Be(II)	1	60
Mg(II)	1000	60000
Ca(II)	1000	60000
Sr(II)	1000	60000
Ba(II)	118	7063
Zr(IV)	22	1306
Cr(III)	52	3140
Mo(VI)	5	324
W(VI)	11	638
Mn(II)	1000	60000
Fe(III)	252	15171
Co(II)	1000	60000
Ni(II)	1000	60000
Cu(II)	26	1560
Zn(II)	51	3048
Cd(II)	1000	60000
B(III)	207	12417
Al(III)	6	352
SiO_3^{2-}	1000	60000
Sn(II)	9	525
Pb(II)	100	60000

Tabla V.27. (Continuación)

Ión extraño	Cx/C_v	C_t (ppb)
NO_3^-	1000	60000
NO_2^-	1000	60000
PO_4^{3-}	1000	60000
Bi(III)	60	3340
SO_4^{2-}	1000	60000
SCN^-	1000	60000
F^-	59	3532
Cl^-	1000	60000
Br^-	1000	60000
I^-	1000	60000
Citrato	1	68
Tartrato	446	26730
EDTA	54	3221
$P_2O_7^{4-}$	1000	6.10^5

Cx/C_v, Relación ión extraño/analito; C_t, Concentración tolerada

Los principales interferentes encontrados han sido Be(II), Mo(VI) y Al(III), Sn(II) y citrato, en presencia de los cuales la relación de tolerancia fue en todos los casos inferior a 10/1 (ión extraño/analito).

Es importante destacar la elevada concentración de Fe(III) que es tolerada cuando se usa como agente enmascarante el ión $P_2O_4^{4-}$, lo que hace posible la determinación en presencia de cantidades moderadas de dicho elemento.

4.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Se han establecido dos procedimientos operatorios para la determinación de V(V) aplicable a dos niveles de concentraciones:

A) *En matraces de 10 ml se introduce la disolución problema de forma que su contenido final esté comprendido entre 0'7-10'0 µg, 2'0 ml de disolución reguladora Tris/HCl de pH 7'7, 1'0 ml de disolución de BCTA al 5 % y 0'32 ml de una disolución de Rojo de Alizarina S 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. Se mide la fluorescencia de las muestras, así como del correspondiente blanco a 607 nm, una vez excitadas a 505 nm, manteniendo una temperatura constante de 25°C. Las rendijas ex/em empleadas son 7/7 nm.*

B) *Se trabaja de igual forma que en el caso anterior, pero en este caso el contenido de V(V) en los matraces de 10 ml debe estar comprendido en el intervalo entre 0'13-1'00 µg. Las rendijas ex/em utilizadas son 12/12 nm.*

La cantidad de V(V) presente se determina a las condiciones instrumentales de la correspondiente recta de calibrado.

5. APLICACIONES ANALÍTICAS

Para comprobar la utilidad del método desarrollado, se ha llevado a cabo su aplicación a muestras en las que tiene interés conocer su contenido y en las que este elemento se encuentra a niveles de trazas.

Las muestras seleccionadas para el estudio fueron:

- Concha fina (Citterea) procedente de la bahía de Algeciras (Cádiz)
- Agua de mar procedente de la bahía de Almería

5.1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN V(V) EN CONCHA FINA

Tratamiento de las muestras

Se pesan aproximadamente 3 g de la muestra a analizar previamente triturada hasta un polvo fino de pequeño tamaño de partícula que asegure su total homogenización y desecada a 110°C hasta pesada constante. Se coloca en un vaso de precipitado con suficiente margen de volumen para evitar las posibles pérdidas que se puedan ocasionar durante el tratamiento.

A continuación se le adiciona un volumen de HNO_3 concentrado (65%) suficiente para cubrir completamente la muestra sólida y se coloca en un baño de arena a temperatura elevada. Se repone el nítrico destruido, por sucesivas adiciones de pequeños volúmenes de éste, hasta que se observe el cese de la formación de espuma.

Se concentra la disolución resultante de este primer ataque hasta un volumen de aproximadamente 20 ml, y se agregan 10 ml de $HClO_4$ concentrado (70%), llevando a continuación a sequedad. Se repite la adición de perclórico y se lleva finalmente a sequedad obteniéndose un residuo blanco, que una vez frio se disuelve en 20 ml. de HCl 0'1 N (**136**).

La disolución obtenida se calienta hasta ebullición y si queda algún resto insoluble, se filtra a través de papel de filtro lavado al ácido, lavando el residuo con HCl 0'1 N y recogiendo las aguas de lavado junto con el primer filtrado.

Debido a la conveniencia de asegurar el estado de oxidación adecuado para llevar a cabo la determinación de vanadio, se adicionaron unas gotas de $KMnO_4$ 0'1 N hasta permanencia del color rosado, garantizándose así que el vanadio se encuentra como V(V).

La disolución resultante se transvasa a un matraz de 25 ml., enrasándose hasta el volumen final con agua destilada.

Eliminación de interferentes

Para eliminar el efecto del Fe(III), así como de otros metales que pueden encontrarse presentes en la muestra a analizar y que producen interferencia en la determinación de V(V), se ha seguido el procedimiento recomendado por Talvitie (**137**) que consiste en la formación de diversos oxinatos en medio ácido, solubles en cloroformo.

Para ello se toman 3 ml de la disolución obtenida tras el tratamiento de la muestra y se ajusta el pH a un valor comprendido entre 2'6-3'0. Se transvasan a un tubo de vidrio provisto de tapón de rosca de 1'5 x 10 cm (con capacidad aproximada de 12 ml) añadiendo un volumen de 1'5 ml de disolución de oxina al 0'5% en cloroformo. El tubo es sometido a agitación durante 2 min. y a continuación se centrifuga durante 1 min.

El extracto es separado con una pipeta y vertidos en un nuevo tubo en el que se procede a su lavado con un volumen de 1'5 ml de agua acidificada con HCl hasta alcanzar un pH ~ 3. El cloroformo extraido debe contener el oxinato de V(V) junto con los de Fe, Al, Co, Zn, Ni, Mo, W, Cu y Bi, si estuvieran presentes, siendo todos ellos principales interferentes en la determinación fluorimétrica propuesta.

Posteriormente, y con objeto de aislar el Vanadio(V), se procede a agitar la porción clorofórmica conteniendo los posibles oxinatos con 1'5 ml de disolución tampón NH_3/NH_4^+ de pH 9'4, mediante agitación mecánica en tubo de rosca durante 5 min. Se somete a centrifugación durante 1 min. y se recoge con una pipeta la fase acuosa que contiene el Vanadio(V) en disolución, dejando en la fase orgánica todos oxinatos de los demás iones interferentes.

Procedimiento

El contenido en vanadio(V) se deteminó siguiendo el procedimiento operatorio B, introduciendo, en matraces de 10 ml, alícuotas de disolución de fase acuosa de entre 0'4-1'0 ml, 2 ml de tampón Tris/HCl 0'1 M de pH 7'7, 1 ml de disolución de BCTA al 5 % y 0'32 ml de RAS 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada.

Se midió la intensidad de fluorescencia a 607 nm con excitación a 505 nm. Las rendijas de excitación y emisión utilizadas fueron de 12 nm.

Determinación del contenido en Vanadio(V) en concha fina

Con objeto de comprobar la exactitud de la determinación fluorimétrica propopuesta, y dado que no disponemos de muestras de referencia o certificada, se ha aplicado la metodología de adición de patrón, llevando a cabo el protocolo estadístico desarrollado en el Capítulo I.

Validación del método mediante la adición de patrón

* *Establecimiento de los Calibrados*

La aplicación de la metodología propuesta requiere el establecimiento de tres calibrados distintos:

- *Calibrado con patrones: CP* (Rango entre 20-100 ppb, Tabla V.18)

- *Calibrado con adición de patrón a una cantidad constante de muestra: CA*

Se obtiene mediante adición, en matraces de 10 ml, de concentraciones crecientes de Vanadio(V) a un volumen constante de disolución de muestra tratada igual a 0'4 ml, procedente del tratamiento de 3 g de materia seca una vez

sometida a eliminación de interferentes por extracción de los oxinatos, aplicando posteriormente el procedimiento operatorio.

- *Calibrado de Youden: CY*

Se lleva a cabo introduciendo, en matraces de 10 ml, volúmenes crecientes (0'4, 0'6, 0'8 y 1'0 ml) de la disolución procedente del tratamiento de la muestra seca y eliminación de interferentes (concentración de muestra seca en la disolución = 240 $mg.ml^{-1}$), sin adición alguna y aplicando el procedimiento operatorio.

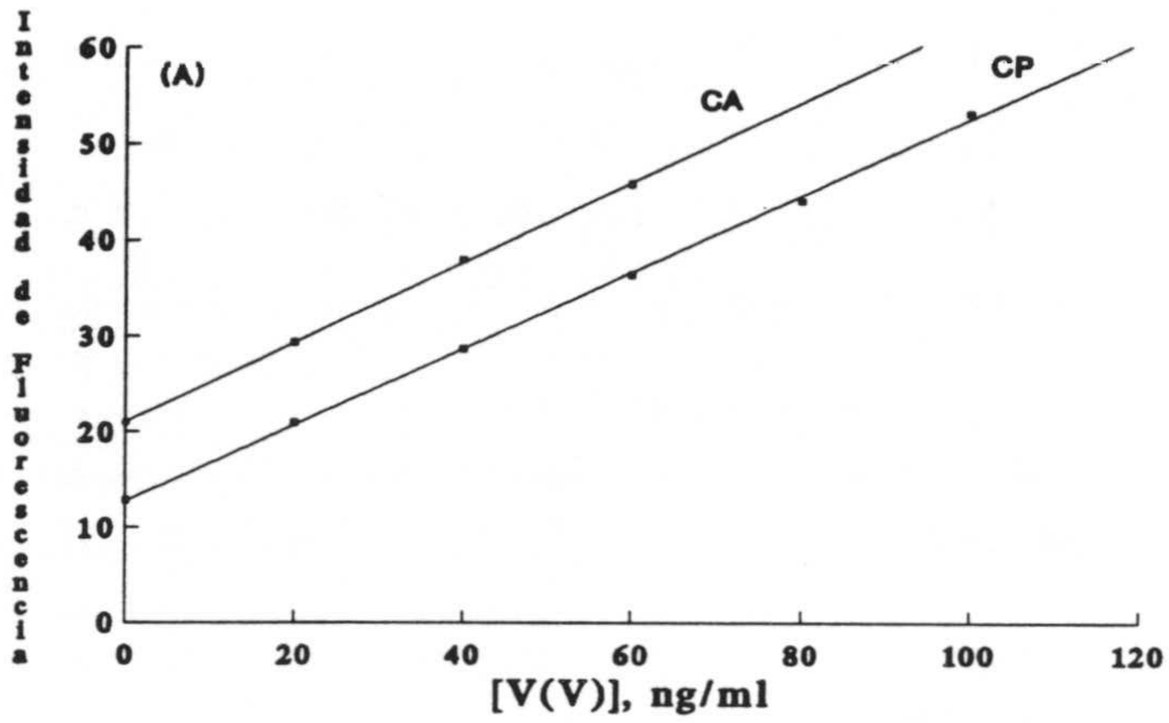
Las señales analíticas correspondientes a los tres calibrados, registradas a las longitudes de onda de 505 y 607 nm, excitación y emisión respectivamente y utilizando rendijas de 12 nm, se muestran en las Tabla V.28 y quedan representados en la Figura V.19.

Tabla V.28

Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA Y CY

	[V(V)] adic. ($ng.ml^{-1}$)	[Muestra] ($mg.ml^{-1}$)	IF
CA	0	9'6	21'0
	20		29'3
	40		37'9
	60		43'7
CY	0	9'6	21'9
		14'4	26'0
		19'2	31'2
		24'0	35'1

CA: Calibrado con adición de patrón a la muestra; CY: Calibrado de Youden con porciones de muestra



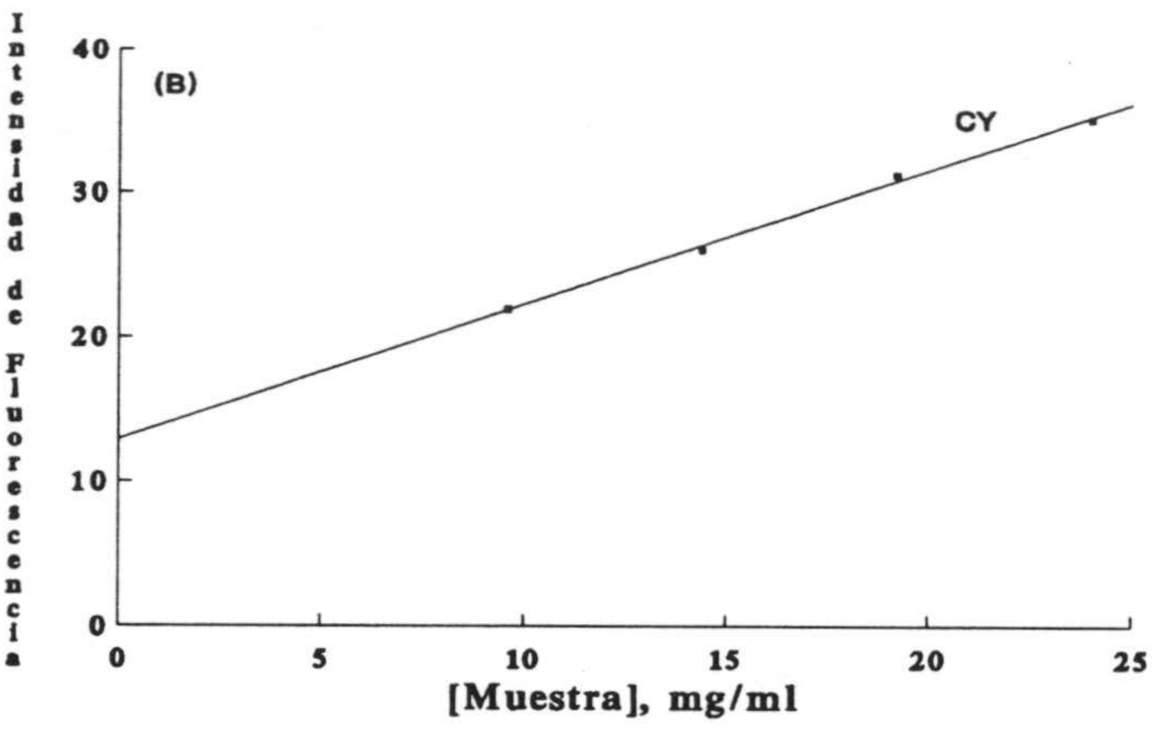


Figura V.19. Representación de los calibrados: (A) CP: con patrones (20-100 ng.ml^{-1}); CA: con adición de patrón a 9'6 mg.ml^{-1} de muestra. (B) CY: Calibrado de Youden con 9'6, 14'4, 19'2 y 24'0 mg.ml^{-1} de muestra

Los parámetros característicos de los tres calibrados se reflejan en la Tabla V.29.

Tabla V.29

Valores numéricos de los parámetros correspondiente a las rectas CA, CP Y CY

	CA	CP	CY
n	4	18	4
a	21'47	12'64(±0'69)	12'87
b	0'384	0'398	0'933
$s_{R,c}$	1'0107	0'7767	0'3860
r	0'9965	0'9986	0'9985

CP: Calibrado con patrones; CA: calibrado con adición de patrón; CY: Calibrado de Youden; n = Puntos del calibrado; a = ordenada en el origen; b = Pendiente; $s_{R,c}$ = Desviación estándar de regresión; r = coefieciente de correlación

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico descrito en el Capítulo I para llevar a cabo la validación del método analítico propuesto.

Los pasos a seguir son:

* *Comparación de Pendientes*

Para comprobar la igualdad de pendientes entre ambos calibrados se calcula un estadístico t(b) en cuya expresión interviene la desviación estándar de regresión promedio, s_p estimada a partir de las correspondientes a los calibrados CP y CA.

Los resultados del test aparecen en la Tabla V.30.

Se comprueba que el valor del estadístico t(b) calculado es menor que el valor t tabulado con un nivel de significación al 1 % para $(n_{CP} + n_{CA}-4)$ grados de libertad, por tanto, las pendientes son iguales con un nivel de confianza del 99 %, pudiéndose estimar un valor promedio, b_p entre las pendientes de ambos calibrados

y siendo posible la validación.

Tabla V.30

Resultados de la comparación de pendientes de los calibrados CP y CA

s_p	0'8061
t(b)	0'776* (P= 44'8%)
b_p	0'3969

(I) Valores obtenidos mediante las expresiones generales
(II) Valores utilizando las expresiones aproximadas
* t_{tab}(0'01, 18 g.l)= 2'878; P, Porcentaje de la Distribución t de Student; s_p= Desviación estándar de regresión promedio de CP y CA; t(b)= Estadístico t para la comparación de pendientes de CP y CA; b_p= Pendiente promedio de CP y CA.

* *Cálculo de las alturas en el origen. Blanco de Youden*

Utilizando el valor de la pendiente promedio, se han calculado los nuevos valores de las ordenadas en el origen para los calibrados con patrones (CP) y con adición (CA).

Debido a que la ordenada del calibrado de Youden está incluida en el intervalo de confianza de la ordenada del calibrado con patrones (11'95-13'33), el "blanco" de la muestra o Blanco de Youden no es significativamentedistinto del blanco utilizado en la recta de calibrado y por tanto no es necesaria su eliminación en las medidas fluorimétricas llevadas a cabo.

Estos resultados se muestran en la Tabla V.31.

Tabla V.31

Nuevas ordenadas en el origen y Blanco de Youden

		CA	CP	CY
(II)	a'	21'07	12'71	
	BY			0'16

a'= Nuevas ordenadas en el origen de CA y CP calculadas a partir de b_P; BY= Blanco de Youden.

* *Comprobación de la exactitud*

Se ha llevado a cabo madiante la comparación de los contenidos de vanadio(V) en la disolución a medir obtenidos utilizando directamente la recta de calibrado y mediante el calibrado con adición de patrón y también calculando la recuperación media obtenida en las sucesivas adiciones y comprobando que no difiere significativamente del 100 %.

A) Comparación de los contenidos de Vanadio(V) mediante CP y CA

La comparación del contenido en V(V) en la disolución de medida, obtenido a partir de los dos calibrados CP y CA, se realiza mediante el cálculo del estadístico t(c). Los resultados aparecen en la Tabla V.32.

La comparación se concluye comprobando que no existe diferencia significativa entre los contenidos calculados ya que el valor del estadístico t(c) es menor que el valor tabulado para $(n_{CP} + n_{CA}-3)$ grados de libertad al nivel de significación seleccionado, aceptándose que el método es exacto con un valor P mayor del 5 %.

En la misma Tabla aparecen los contenidos de Vanadio(V) en materia seca utilizando ambos calibrados, obtenidos al considerar el factor de dilución correspondiente.

De modo aproximado y mediante el cociente de la pendiente promedio entre CP y CA y la pendiente del calibrado de Youden, CY, es posible la estimación del contenido en vanadio(V) en materia seca. El resultado aparece en la última columna de la Tabla V.32.

Tabla V.32

Comprobación de la exactitud: contenido en Vanadio por CA y CP

	CP	CA	CY
$c_{V(V)}$ (ng.ml^{-1})	20'49	20'66	
	t(c) = 0'161 (P= 87'4%)		
	Valor crítico 2'093 (5%)		
$c_{muestra}$(μg.g^{-1})	2'13	2'15	2'35

$c_{V(V)}$: Contenido de vanadio en la disolución de medida (10 ml); t(c) = Estadístico calculado para la comparación de contenidos obtenidos por CP y CA; $c_{muestra}$ = Contenido en vanadio en muestra seca.

B) Ensayos de Recuperación

También hemos comprobado la exactitud del método mediante el cálculo de la recuperación al adicionar a una determinada cantidad de muestra, concentraciones conocidas del analito a determinar, siempre antes de llevar a cabo el proceso de eliminación de interferentes por extracción de los oxinatos en cloroformo. De este modo, no sólo se consigue la evaluación de la exactitud, sino también la comprobación de que no existen pérdidas del analito en el proceso de eliminación de interferencias aplicado.

Considerando las tres adiciones de patrón a un volumen contante de muestra en matraces de 10 ml, se obtiene una recuperación media, cuyo valor es contrastado frente a la unidad, mediante el test de la t de Student, de la forma ya descrita en el Capitulo I.

En el test de comparación de la recuperación media frente a la unidad se obtiene que el estadístico t($\Re$) calculado es menor que el valor tabulado con (n_{CA}-2) grados de libertad y un nivel de significación del 5 %,lo que implica que la recuperación obtenida del método no es significativamente distinta de 1 (o del 100%) y, por tanto que el método es exacto y que la eliminación de interferentes

no lleva consigo pérdidas considerables.

Los resultados se muestran en la Tabla V.33.

Tabla V.33

Comprobación de la exactitud: Ensayos de Recuperación

[V(V)]adic. ($ng.ml^{-1}$)	[Muestra] ($mg.ml^{-1}$)	Recuperación $\Re$
20	9'6	1'042
40		1'061
60		0'950

Cálculo aproximado: $\overline{\Re}$ = 1'018; $s_{\Re}$ = 0'0594; t($\Re$) = 0'534 (P = 64'6%);Valor crítico 4'303 (5%); $s_{\Re}$ = Desviación estándar de los valores de recuperación obtenidos;
t($\Re$) = Estadístico calculado para comparar la recuperación media frente a la unidad

* *Análisis de la muestra*

Se han llevado a cabo tres análisis de diferentes porciones de muestra, siendo determinado el contenido de vanadio(V) mediante el uso directo de la recta de calibrado una vez eliminado el "Blanco de Youden" o blanco de la muestra, calculado en la experiencia anterior.

Los resultados se muestran en la Tabla V.34.

Tabla V.34

Determinación de Vanadio(V) en concha fina

Determinación	$[V(V)]_{mat.\ seca}$ ($\mu g.g^{-1}$)
1	2'13
2	2'18
3	2'07

$[\overline{V}(V)] = 2'13\ \mu g.g^{-1}$

$s_V = 0'055$

DER = 2'58 % (n = 3)

5.2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN V(V) EN AGUA DE MAR

Procedimiento

Previamente al análisis se sometió a la muestra a filtración en embudo Buchner y utilizando papel de filtro lavado al ácido.

Siguiendo el procedimiento operatorio B, se adicionaron en matraces de 10 ml alícuotas de la muestra de agua comprendidas entre 2-5 ml, 2 ml de tampón Tris/HCl 0'1 M de pH 7'7, 0'5 ml de disolución de $P_2O_7^{4-}$ con objeto de enmascarar el posible Fe(III) existente, 1 ml de disolución de BCTA al 5 % y 0'32 ml de RAS 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada.

Se midió la intensidad de fluorescencia a 607 nm con excitación a 505 nm. Las rendijas de excitación y emisión utilizadas fueron de 12 nm.

Validación del método mediante la adición de patrón

* *Establecimiento de los Calibrados*

- *Calibrado con patrones: CP* (Rango entre 20-100 ppb, Tabla V.18)

- *Calibrado con adición de patrón a una cantidad constante de muestra: CA*

Se obtiene mediante adición, en matraces de 10 ml, de concentraciones crecientes de vanadio(V), a un volumen constante de disolución de muestra igual a 3'0 ml (3ml/10 ml= 0'3 $ml.ml^{-1}$), aplicando posteriormente el procedimiento operatorio.

- *Calibrado de Youden: CY*

Se lleva a cabo introduciendo, en matraces de 10 ml, volúmenes

crecientes (2, 3, 4 y 5 ml) del agua problema, sin adición alguna y aplicando el procedimiento operatorio.

Los datos correspondientes a los tres calibrados: con patrones (CP), con adición de patrón a la muestra (CA), y con diferentes concentraciones de muestra (CY), así como los resultados derivados de su estudio, se muestran en las Tablas V.34 y V.35, quedando representados en la Figura V.20.

Tabla V.34

Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA Y CY

	[V(V)] adic. ($ng.ml^{-1}$)	[Muestra] ($ml.ml^{-1}$)	IF
CA	0	0'3	17'1
	20		23'9
	40		31'9
	60		39'7
CY	0	0'2	15'2
		0'3	17'1
		0'4	18'2
		0'5	20'7

CA: Calibrado con adición de patrón a la muestra; CY: Calibrado de Youden con porciones de muestra

En la Tabla V.35 aparece el valor del estadístico t(b) para la comparación entre las pendientes de los calibrados CP y CA, comprobándose que el valor obtenido es menor que el tabulado y por tanto las pendientes no difieren significativamente.

Una vez comprobada la igualdad entre ambas pendientes de CP y CA, y calculada la nueva desviación estándar de regresión promedio s_p y la pendiente promedio b_p, se estima el "Blanco de Youden", que evalúa el posible efecto matriz constante, y se procede a la validación del método mediante la metodología de adición de patrón.

Tabla V.34

Valores numéricos de los parámetros correspondiente a las rectas CA, CP Y CY

	CA	CP	CY
n	4	18	4
a	17'83	12'64(±0'69)	11'64
b	0'379	0'398	1'760
$s_{R,c}$	0'4785	0'7767	0'4074
r	0'9992	0'9986	0'9895
s_p		0'7454	
t(b)		1'098* (P=28'7%)	
b_p		0'397	
a'	16'26	12'72	
BY			-1'09

* t_{tab}(0'01,18 g.l)= 2.78; P, Porcentaje de la Distribución t de Student
n= Puntos del calibrado; a= ordenada en el origen; b= Pendiente; $s_{R,c}$= Desviación estándar de regresión; r= coeficiente de correlación; s_p= Desviación estándar de regresión promedio de CP y CA; t(b)= Estadístico t para la comparación de pendientes de CP y CA; b_p= Pendiente promedio de CP y CA; a'= Nueva ordenada en el origen calculada a partir de b_p

* *Comprobación de la exactitud*

Comparación de los contenidos de Vanadio(V) obtenidos mediante CP y CA

El resultado de la comparación de los contenidos en la disolución de medida, obtenidos a partir de los dos calibrados CP y CA, mediante el estadístico t(c), se refleja en la Tabla V.34.

En el test realizado $t(c)_{cal} < t_{tab}$, no existiendo por lo tanto, diferencia significativa entre los contenidos calculados y aceptándose que el método es exacto con un nivel de significación mayor del 5 %.

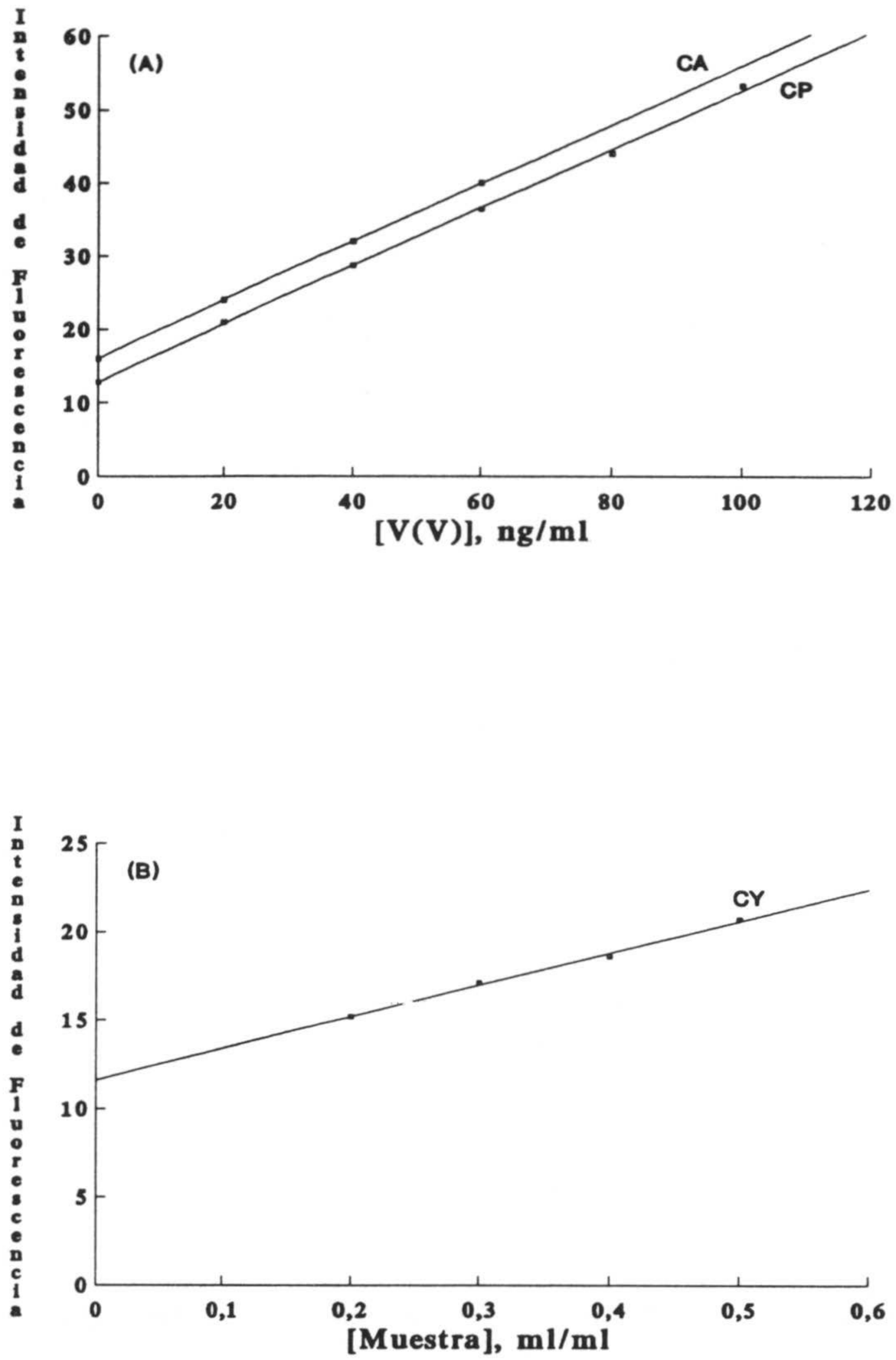


Figura V.20. Representación de los calibrados: (A) CP: con patrones (20-100 ng.ml^{-1}); CA: con adición de patrón a 0'3 ml.ml^{-1} de muestra. (B) CY: Calibrado de Youden con 0'2, 0'3, 0'4 y 0'5 ml.ml^{-1} de muestra

En la Tabla también se reflejan los datos del contenido de Vanadio(V) relativo a la muestra y la estimación aproximada utilizando la pendiente de los calibrados CP y CY.

Tabla V.35

Comprobación de la exactitud: contenido en Vanadio por CA y CP

	CP	CA	CY
$c_{V(V)}$ (ng.ml^{-1})	13'77	11'64	
	t(c) = 2'032 (P = 5'7%)		
	Valor crítico 2'093 (5%)		
$c_{Muestra}$(ng.ml^{-1})	45'8	38'8	44'4

c_V = Contenido de vanadio(V) en matraz; t(c) = Estadístico calculado para la comparación de contenidos obtenidos por CP y CA; $c_{muestra}$ = Contenido de vanadio(V) en muestra.

* *Análisis de la muestra*

El resultado de las tres determinaciones realizadas utilizando la recta de calibrado una vez considerado el "Blanco de Youden" calculado en la experiencia de validación, se muestra en la Tabla V.36.

Tabla V.36

Determinación de vanadio(V) en agua de mar

Determinación	$[V(V)]_{muestra}$ (ng.ml^{-1})
1	45'8
2	41'8
3	45'9

$[\overline{V}(V)]$ = 44'5 ng.ml^{-1}

s_V = 2'339

DER = 5'26 % (n = 3)

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

V.1. H.T. Evans, Jr. y S. Landergen, "Handbook of Geochemistry", Springer-Velag, Nueva Yok, (1974).

V.2. D. Saco, M. Alvárez y S. Martín, "Comparación de los efectos de Molibdeno y Vanadio en Phaseolus Vulgaris L.: Crecimiento, proteinas y actividades enzimáticas de la Nitrato-Reductasa", *Suelo y Planta*, **2** (4) (1992).

V.3. E. Berman, "Toxic Metals and their analysis", Ed. Heyden & Son, Londres (1980), pp.221-232.

V.4. K. Schwarz y D.B. Milne, *Science*, **174**, 426, (1971).

V.5. D.R. Osborney P. Voogt, "Análisis de los nutrientes de los alimentos", Ed. Acribia, Zaragoza (1987), p.25.

V.6. R. Roi, W.G. Town, W.G. Hunter y L. Alessio, "Ocupational Healt Guidelines for Chemical risk", ed. C.E.E pub. Eur. 8513, Luxemburgo (1983), pp.130-131.

V.7. C.A. Burtis y E.R. Ashwood, "Tielz texbook of Clinical Chemistry", Ed. W.B. Saunders company, Londres (1994), pp. 1348.

V.8. J.Z. Marcus y R.J. Mills, "Emissions from mass burn resource recovery", *Risk Anal.*, **8**, 315 (1988).

V.9. R.Z. Bachman y C.V. Banks, *Anal. Chem.*, **37**, 103 R (1965); **39**, 110 R (1967).

V.10. G.A. Abasi, *Anal. Lett.*, **26**, 1347 (1987).

V.11. H. de Beer y P.P. Coetzee, "Vanadium speciation by ion chromatography", *Fresenius J. Anal. Chem.* , **348(12)**, 806 (1994).

V.12. D.E. Buckley y R.E. Cranston, *Chem. Geol.*, **7**, 273 (1971).

V.13. R. Goecke, *Talanta*, **15**, 871 (1968).

V.14. J.W. Husler y E.F. Cruft, "Atomic absorption determination of traces elements in calcium sulfate minerals using an organic enrichment technique", *Anal. Chem.*,**41(12)**, 1688 (1969).

V.15. S. Terashima, *Japan Analyst*, **22**, 1317 (1973).

V.16. W. Luecke, *N. J. Miner. Mh.*, **6**, 263 (1971).

V.17. J. Korkisch y H. Gross, "Determination of Vanadium and Molybdenum by Atomic-absorption Spectrometry", *Talanta*, **20**, 1153 (1973).

V.18. R.J. Thompson, G.B. Morgan y L.J. Purdue, *At. Absorption Newsl.*, **9**, 53 (1970).

V.19. J.L Jiménez Seco y A. Gómez Coedo, *Rev. de Metalurgia*, **6**, 324 (1970).

V.20. N.P. Cobb y T.S. Harrison, *Metallurgia Metal Form.*, **39**, 167 (1972).

V.21. L. Capacho-Delgado y D.C. Manning, *Atom. Abs. Newsletter*, **5**, 1 (1966).

V.22. S.H. Omang, "The determination of vanadium and nickel in mineral oils by flameless graphite tube atomization", *Anal. Chim. Acta*, **56**, 470 (1971).

V.23. B.M. Talalaev, O.N. Mironova y A.Mn. Mohammund, *Zh. Analit. Khim.*, **26**, 1327 (1971).

V.24. Y.K. Chan y K. Lum-Shue-Chan, "Complex extraction of vanadium for atomic absorption spectroscopy. Determination of microgram quantities of vanadium in lake waters", *Anal. Chim. Acta*, **50**, 201 (1970).

V.25. C.J. Pickford y G. Rossi, "Analysis of high purity water by flameless atomic-absorption spectroscopy. Part I. The use of an automated sampling system", *Analyst*, **97**, 647 (1972).

V.26. J.A. Bowman y J.B. Willis, "Some applications of the nitrous oxide-acetylene flame in chemical analysis by atomic absorption spectrometry", *Anal. Chem.*, **39(11)**, 1210 (1967.

V.27. M. Puyo y R. Thiel, *Bull. Cent. Rech. Pau.* **1**, 453 (1967).

V.28. A. Manjarrez y C. Pereda, *Rev. Soc. Quím. Mex.*, **13**, 53 A (1969).

V.29. R. Goux, *Meth. Phys. Analyse*, **6**, 118 (1970).

V.30. R.A. Shiart y R.D. Branch, *Perkin-Elmer Instrum. News*, **21**, 1 (1970).

V.31. B.R. Myson, S.H. Givand y F.H. Nielsen, *J. Agric. Food. Chem.*, **25**, 297 (1977).

V.32. D.R. Myron, T.J. Zimmerman, T.R. Schuler, L.M. Klevay, D.E. Lee y F.H. Nielsen, *Am. J. Chim. Natr.*, **37**, 527 (1978).

V.33. D.A. Segar y J.L. Gilio, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2**, 291 (1973).

V.34. H.V. Weiss, M.A. Guttman, J. Korkisch y I. Steffan, "Comparison of methods for the determination of vanadium in sea-water", *Talanta*, **24**, 509 (1977).

V.35. D.C.G. Pearton, J.D. Tailor, P.K. Faure y T.W. Steele, "The determination of vanadium in silicate materials by atomic absorption spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta.*, **44**, 353 (1969).

V.36. H.J. Crump-Wiesner, H.R. Feltz y W.C. Purdy, "The determination of vanadium in silicate in brines by atomic absorption spectroscopy", *Anal. Chim. Acta.*, **55**, 29 (1971).

V.37. H.J. Crump-Wiesner y W.C. Purdy, "Extraction of vanadium into isobutyl methyl ketone", *Talanta*, **16**, 124 (1969).

V.38. S.L. Sachdev, J.W. Robinson y P.W. West, "Effect of mixed organic solvents on atomic absorption spectrophotometry of refractory metals", *Anal. Chim. Acta.*, **37**, 156 (1967).

V.39. R.E. Mansell y H. Emmel, *Atomic. Abs. Newsletter*, **4**, 365 (1965).

V.40. T. Nakahasa, M. Munemori y S. Musha, *J. Chem. Soc. Japan. Pure Chem. Sect.*, **90**, 697 (1969).

V.41. N.K. Rudnevskii, V.T. Demarin y T.M. Gruzdeva, *Zh. Prikl. Spektrosk.*, **14**, 567 (1971).

V.42. Y.K. Chan y K. Lum-Shue-Chan, *Fenxi Huaxue*, **58**, 15 (1972).

V.43. B. Jost y R. Bock, *Z. Anal. Chem.*, **250**, 366 (1970).

V.44. Idem, *ibid*, **250**, 358 (1970).

V.45. I. Kojima, T. Uchida, M. Nanbu y Ch. Iida, "Synergic extraction and atomic absorption spectrometric determination of vanadium in silicates", *Anal. Chim. Acta*, **93**, 69 (1977).

V.46. G. Bagur, D. Gázquez, M Sánchez y A.M. Martín, "Synergistic extraction-atomic Spectrophotometric determination of Vanadium in foodsand petroleum crudes with 5,5'-Methylenedisalicylohydroxamicacid", *Anal. Lett.*, **26**(1), 125 (1993).

V.47. C.W. Fuller, *Atomic. Absorp. Newsletter*, **12**, 40 (1973).

V.48. L.A. May y B.J. Presley, *Atomic. Absorp. Newsletter*, **13**, 144 (1974).

V.49. C. Riandaz, P. Linhares y M. Pinta, *Analusis*, **3**, 303 (1975).

V.50. S.S. Krishman, S. Quitthal y D.R. Crapper, *Can. J. Spectrosc.*, **21**, 25 (1976).

V.51. M.M. Barbooti y F. Jasim, "Electrothermal atomic-absorption determination of vanadium", *Talanta*, **29**, 107 (1982).

V.52. M. Ishizaki y S. Ueno, "Determination of sunmicrogram amounts of vanadium in biological materials by extraction with N-cinnamoyl-N-2,3-xylylhydroxylamine and flameless atomic-absorption spectrometry with an atomizer coated with pyrolytic graphite", *Talanta*, **26**, 523 (1979).

V.53. J.P. Buchet, E. Knepper y R. Lauwerys, "Determination of vanadium in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **136**, 243 (1982).

V.54. S.D. Stroop, G. Helimel y L.H. Lajunen, *Anal. Chim. Acta*, **158**, 297 (1984).

V.55. L. Pyy, E. Hakala y L.H. Lajunen, "Screening for vanadium in urine and blood serum by electrothermal atomic absorption spectrometry and D.C. plasma atomic emission spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **158**, 297 (1984).

V.56. P.B. Barrera, P.C. Calvo y B.F. Martínez, *Anal. Lett.*, **24**, 447 (1991).

V.57. A. Frankenberger, R.R. Brooks y M. Hoashi, "Determination of vanadium in steels and geological materials by liquid-liquid extraction and graphit furnace atomic absorption spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **246**, 319 (1991).

V.58. M.W. Arbonine y N.J. Smith, *M. Spectrosc.*, **12**, 54 (1991).

V.59. M. Kinuva y Y. Yoshimi, *Nippon Kagaku Kaishi*, **5**, 361 (1991).

V.60. J.R. Moody y R.M. Lindstrom, *Anal. Chem.*, **49**, 2264 (1977).

V.61. A. Gómez Coedo, M.T. Dorado López y J.L. Jiménez Seco, *Rev. Metalurgia*, **15**, 97 (1979).

V.62. R.A. Nadkarni, "Multitechnique multielemental analysis of coal and fly ash", *Anal. Chem.*, **52**, 929 (1980).

V.63. K. Akatsuka y I. Atsuya, *Bunseki Kagaku*, **29**, 714 (1980).

V.64. H. Tao, A. Miyazaki, K. Bansho y Y. Umezaki, "Determination of trace levels of heavy metals in waters by extraction with ammonium tetramethyleneammoniumhexamethylenedithiocarbamateinto xylene followed by inductively-coupled plasma emission spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **156**, 159 (1984).

V.65. T. Akagi, K. Fuwa y H. Haraguchi, "Simultaneous multi-element determination of trace metals in sea water by inductively-coupled plasma atomic emission spectrometry after coprecipitation with gallium", *Anal. Chim. Acta.*, **177**, 139 (1985).

V.66. M. Sugiyama, O. Fujino, S. Kihara y M. Matsui, "Preconcentration by dithiocarbamate extraction for determination of trace elements in natural

waters by inductively-coupled plasma atomic emission spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **181**, 159 (1986).

V.67. H. Watanabe, M. Aikaru y M. Kiboku, *Chem. Express*, **5**, 825 (1990).

V.68. H.M. Al-Swaidan, *Anal. Letter*, **23**, 1345 (1990).

V.69. Y. Danzaki, "Determination of sub-μg/g amounts of vanadium in iron by N-benzoyl-N-phenylhydroxylamine-chloroform solvent extraction ICP-AES", *Fresenius J. Anal. Chem.*, **342**, 103 (1992).

V.70. K. Hirayama, S. Kageyama y N. Unohara, "Mutual separation and preconcentration of vanadium (V) and vanadium (IV) in natural waters with chelating functional group immobilized silica gels followed by determination of vanadium by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry", *Analyst*, **117**, 13, (1992).

V.71. R. Sara, S.G. Hulden y L. Harju, *Kemia-Kemi*, **8**, 774 (1981).

V.72. D. Bertrand, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **23**, 391 (1941).

V.73. M. Tanaka y I. Kojima, "Effect of reagent concentration in the photometric determination of vanadium (V) with 8-quinelinol", *Anal. Chim. Acta*, **36**, 522 (1966).

V.74. N. Kurmaiah, D. Satyanarayana y V.P.R. Rao, "Extraction and spectrophotometric determination of vanadium (V) with 8-hydroxyquinoline", *Talanta*, **14**, 495 (1967).

V.75. W.N. Evans y D. Caughlin, "Evaluation of Methods for the Determination of Total Molybdenum and Vanadium in Foodstuffs using spectrophotometric measurement", *Analyst*, **110**, 681 (1985).

V.76. Takao Yotsuyanagi, Junichi Il y Karuo Aomura, *Talanta*, **16**, 611 (1969).

V.77. K.N. Bagdasasov, Kh. A. Achmedova y O.A. Tataev, *Zavods. Lab.*, **35**, 12 (1969).

V.78. G. Chakrapani, D.S.R. Murty, B.K. Balah y R. Rangaswany, "Spectrophotometric method for the determination of V in Uranium rich hydrogeochemical samples using Pyridil Azo Resorcinol (PAR)", *Talanta*, **54**, 541 (1993).

V.79. A. Hofer y R. Heidinger, *Z. Anal. Chem.*, **246**, 125 (1969).

V.80. E.S. Pilkington y W. Wilson, "The spectrophotometric determination of vanadium in ilmenite", *Anal. Chim. Acta*, **47**, 461 (1969).

V.81. E.M. Donaldson, "Determination of vanadium in refractory metals, steel, cast iron, alloys and silicates by extraction of an NBPHA complex from a sulphuric-hydrofluoric acid medium", *Talanta*, **17**, 583 (1970).

V.82. B.V. Agaswala y A.K. Dey, *Mikrochim. Acta*, 664 (1969).

V.83. A. Ikehata y T. Shimizu, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **38**, 1385 (1965).

V.84. V. Patrovsky, *Collection Czech. Chem.* , **35**, 1599 (1970).

V.85. V. Patrovsky, "Extractive photometric determination of vanadium with catechol and a tertiary amine", *Talanta*, **16**, 456 (1969).

V.86. V. Patrovsky, *Collection Czech. Chem. Commun*, **31**, 3392 (1966).

V.87. E.L. Baghanly y T.D. Ali-Zade, *Zavods Lab.*, **36**, 541 (1970).

V.88. S. Tsukada y R. Demura, "Colorimetric determination of V in food using N-(2,3-xylyl)-cinnamohychoxamicacid", *Eisei Kagaku*, **30(2)**, 79 (1984).

V.89. R.A. Odesinde, A.O. Jiboku, J.A. Faniran, B.B. Adeleke, "Spectroscopy study of V(V) in mushroom", *Food Chem.*, **17(3)**, 215 (1985).

V.90. D. Wong, G. Xie, W. Zhang, Q. Pan, "Spectrophotometric Study of ternary system V-4,5-dibromidephenylfluorone-BCTA",*Huaxue Shiji*, **7(1)**, 33 (1985).

V.91. S. Li, T. Guo, W. Hu, "Spectrophotometric determination of V with diphenylcarbozide and cetyltrimethylamonibromide",*Fenxi Huaxue*, **14(2)**, 129 (1986).

V.92. I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, T. Tanaka, Y. Nakahashi, A. Yoshii, "Spectrophotometric determination of V with o-hydroxiquinolftaleine in presence of cationic surfactant", *Anal. Lett.*, **20(5)**, 747 (1987).

V.93. G. Jian, "Photometric determination of microquantites of V with micellar solubilization", *Yejin Feuxi*, **13(1)**, 41 (1993).

V.94. J.L. Martínez-Vidal, P. Cervantes, A. Fernández-Alba, F. Salinas, "Determinación por extracción espectrofotométrica de V usando el complejo ácido o^{a}-acetil-N-fenilmandelohidroxámico-V-tiocianato",*Quím, Anal.*, **10(3)**, 205 (1991).

V.95. M. Otto, G. Schöbel y G. Werner, "Kinetic-catalytic determination of vanadium in non-aqueous solvents", *Anal. Chem. Acta*, **147**, 287 (1983).

V.96. A. Sevillano-Cabeza, J. Medina-Escriche y F. Bosch Reig, "Determination of vanadium by means of its catalytic effect on the potassium bromate oxidation of pyrogallol red", *Analyst*, **109**, 1559 (1984).

V.97. S. Nakano, C. Yamada, M. Sakai y T. Kawashima, *Anal. Sci.*, **2**, 61 (1988); *Chem. Abstr.*, **105**, 71719 p.

V.98. R.M. Marcé, M. Calull, J. Torres y F. Borrull, "Thermometric determination of trace amounts of vanadium (V) in petroleum products using the chromotropic acid-bromate reaction", *Analyst*, **113**, 505 (1988).

V.99. A. Ch. Zotou y C.G. Papadopoulos, "Kinetic-spectrophotometricdetermination of trace amounts of vanadium (V)", *Analyst*, **115**, 323 (1990).

V.100. Y. Lin y J. Lu, *Feuxi Huaxue*, **20(2)**, 205 (1992).

V.101. T. Fukasawa y T. Yamane, "Determination of trace vanadium in natural waters by a combined Ion Exchange-Catalytic photometric method", *Anal. Chim. Acta*, **88**, 147 (1977).

V.102. T. Fukasawa, S. Kawakubo y T. Yamanouchi, "Highly sensitive Spectrophotometric kinetic determination of Vanadium by catalysis of the Gallic acid-bromate reaction", *Anal. Chim. Acta*, **171**, 325 (1985).

V.103. T. Fukasawa, S. Kawakubo y A. Unno, "Flow-Injection Spectrophotometric Determination of trace Vanadium based on catalysis of the gallic acid bromate reaction", *Anal. Chim. Acta*, **183**, 269 (1986).

V.104. R. Forteza y V. Cerdá, *Anal. Chem.*, **58**, 453 (1986).

V.105. M.J. Fishman y M.W. Skougstad, "Catalytic Determination of Vanadium in Water", *Anal. Chem.*, **36**, 1643 (1964).

V.106. Q. Weiguo, "Determination of trace Vanadium in Water by a modified Catalytic-Photometric Method", *Anal. Chem.*, **55**, 2043 (1983).

V.107. B. Patel, S.J. Haswell y R. Crzeskoviak, *J. Anal. Atomic Spec.*, **4**, 195 (1980).

V.108. R.R. Greenberg y H.M. Kingston, "Trace Element analysis of natural Water samples by Neutron Activation analysis with chelating resin", *Anal. Chem.*, **55**, 1160 (1983).

V.109. Z. Marczenko, "Separation and Spectrophotometric Determination of Elements", *Ellis Horwood Limited, Inglaterra* pp. 621-631 (1986).

V.110. S.N. Surendra y A.K. Key, "Sodium 3-alizarin sulphonate as a chromophoric reagent. Colorimetric Determination of V(V)", *J. Prakt. Chem.*, **20**, 225 (1963).

V.111. S. Rani y S.V. Barneji, *Microchem. J.*, **18**, 636 (1973).

V.112. E. Alvarez-Manzaneda y T.T. Gámiz-Garófano, "Kinetic-PhotometricDetermination of V(V) with 1,8-diamin-4,5-

dihydroxyanthraquinone-2,7-disulfonicacid", *Anal. Lett.*, **21(6)**, 1055 (1988).

V.113. N.L. Babenko, M.Sh. Blokh y T.P. Guseva, "Spectrophotometric Determination of V with Carminic Acid and Hexadecyltrimethylamonium clhoride in Metallurgical Samples", *Zh. Anal. Khim.*, **40(6)**, 1028 (1985).

V.114. N.L. Babenko, M.Sh. Blokh y G.N,. Tashuta, "Spectrophotometric Determination of Vanadium with Carminic acid and hexadecultrimetilammonium clhoride in Metallurgical Samples", *Zh. Anal. Chem.*, **42**(10), 1829 (1987).

V.115. J. Simek, N.T. Son y E. Ruzicka, "Spectrophotometric Study of the reaction between dyes of Alizarin Green series and Vanadates in the presence of cetylpyridinium cation", *Chem. Pap.*, **39(11)**, 91 (1985).

V.116. N.L. Babenko, G.N. Tashuta, M.Sh. Blokh y Z.V. Medvedeva, "Spectrophotometric Study and Analytical Use of 9,10-anthraquinone derivatives in the presence of Cationic Surfactant", *Zh. Anal. Khim.* **45(5)**, 970 (1990).

V.117. G.N. Tashuta, M.Sh. Blokh y N.L. Babenko, "Stability of V(IV) Complexes with Hydroxyanthraquinone Derivatives modified by Cationic Surfactants", *Kompleson. Izpol'z Miner. Syr'ya*, **4**, 40 (1990).

V.118. V.P. Rao y G.G. Rao, *Z. Anal. Chem.*, **161**, 406 (1958).

V.119. J. Bognar y A. Jellinek, "Catalitic Determination of traces of Vanadium with a Landolt system", *Mikrochim. Acta*, 1013 (1968).

V.120. K.J. Koh y D.E. Ryan, "Fluorescence and metallic valency states. Part. VI. Determination of Vanadium with Benzoic Acid", *Anal. Chim. Acta*, **57**, 295 (1971).

V.121. A.T. Pilipenko, A.P. Kostyshina y N.M. Nazarchuk, "Determination of trace amounts of Vandium by the quenching of gallium lumogallionate luminiscence", *Ukr. Khim. Zh.*, **42(5)**, 521 (1976).

V.122. A.T. Pilipenko, A.I. Volkova y T.L. Shevchenko, "Conversion of V(V) to a fluorescent compound for its subsequent Fluorimetric Determination", *Otkrytiya Izobret Prom. Obraztry Tovarnye Znaki*, **55(47)**, 128 (1978).

V.123. T.L. Schevchenko, A.T. Pilipenko y A.I. Volkova, "Fluorescent Complex of V(V) with 4-(2-Pyridilazoresorcinol and Saphranine T", *Ukr. Khim. Zh.*, **45(5)**, 456 (1979).

V.124. P. Grases, C. Genestar y F. Salinas, "Pyrazoline and Isoxazolines as fluorimetric reagents Kinetic-Fluorimetric Determination of Vanadium", *Anal. Chim. Acta*, **148**, 245 (1983).

V.125. C. Genestar, J.J. Gil y F. Grases, "Interaction of some Catecholamines with inorganic species. Fluorimetric Study of analytical applications", *Analusis*, **12(9)**, 462 (1984).

V.126. N. Jie y W. Liu, "Fluorimetric Reaction of Vanadium with thiamine and itsapplication", *Feuxi Huaxue*, **19(11)**, 1314 (1991).

V.127. M. Román, F. García Sánchez y A. Gómez-Hens, "Determinación espectrofluorimétrica de V(V) mediante 1,4-Diamino-5-Nitroantraquinona", *Química Analítica*, **28**, 191 (1974).

V.128. F. Salinas, F. García Sánchez, F. Grases y C. Genestar, "Determinación de V(V) by means of 1-Amino-4-hydroxianthraquinone by a kinetic-Spectrofluorimetric method", *Anal. Lett.*, **13** (1980).

V.129. F. Salinas, F. García Sánchez y C. Genestar, "Fluorimetric Determination of Vanadium based on its reaction with 1-Amino-4-Hydroxyanthraquinone", *Microchem. J.*, **27**, 26 (1982).

V.130. F. García Sánchez, A. Navas Díaz, M. Santiago y F. Grases, "Kinetic Fluorimetric Determination of traces of Vanadium by means of catalized autoxidation process", *Talanta*, **28**, 833 (1981).

V.131. A. Navas Díaz, M. Santiago, F. Grases, J.J. Laserna y F. García Sánchez, "Iron (III) as a activator for Catalitic-Fluorimetric Microdetermination of V(V)", *Talanta*, **28**, 833 (1981).

V.132. R. Forteza, M.T. Oms, J. Cárdenas y V. Cerdá, "Flow Injection Analysis Automatization with Fluorimetric Detection and its applications to Vanadium Determination in Petroleum derivatives", *Analusis*, **18**(8), 491 (1990).

V.133. F. Salinas, A. Muñoz de la Peña e I. Durán Merás, "Spectrofluorimetric Determination of Vanadium (V) in Petroleum Crudes and Basic flag with Nuclear Fast Red", *Analyst*, **113**, 987 (1988).

V.134. J.H. Yoe y A.L. Jones, *ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **16**, 111 (1944)

V.135. P. Job, *Ann. Chim.*, **9**, 114 (1927)

V.136. G. Middlenton y R.E. Stuckey, *Analyst*, **79**, 138 (1955).

V.137. N.A. Talvitie, *Anal. Chem.*, **5**, 604 (1953).

CAPÍTULO VI

COMPLEJO TERNARIO Zr(IV)-EDTA-RAS. DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE CIRCONIO Y EDTA

VI.A. DETERMINACIÓN DE CIRCONIO (IV)

1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA DETERMINACIÓN DE CIRCONIO(IV)

El Zr que existe sólo como Zr(IV), bien como Zr^{4+} o ZrO^{2+}, tiene una pronunciada afinidad por átomos de oxígeno donores, de grupos carboxílico, hidroxilo, hidroxiácido, éter, etc, en este orden : $R_3 \equiv N < R\text{-}O\text{-}R < R\text{-}COO^- < RO^- < OH^- < O^{-2}$ por lo que forma complejos con $H\text{-}COO^-$, CrO_4^-, tartratos, citratos, lactatos , glicolatos, acetilacetona, oxina, 5-sulfosalicilato, EDTA, Rojo de Alizarina S y Alizarina, ect. Tambien son muy estables los complejos con F^-.

El complejo con EDTA, que ha sido estudiado potenciométricamente **1** y espectrofotométricamente(**2**), es de estequiometría 1:1. El Zr(IV) es formador de complejos mixtos con EDTA u otros ácidos poliaminopolicarbixílicos y otros agentes complejantes tales como $C_2O_4^{2-}$, citrato, lactato 5-sulfosalicilato, tiron, oxileno, Rojo de Alizarina y Alizarina S, etc (**3**). El Zr(IV) tiene tendencia a hidrolizarse y a polimerizarse a medida que aumenta la concentración.

El Zr es un constituyente común de muchos minerales, pero usualmente se encuentra en muy pequeñas cantidades. Su uso creciente en aleaciones y en industria cerámica ha aumentado la necesidad de disponer de métodos para su determinación que sean no tediosos y más exactos.

Para el análisis de Zr se ha utilizado absorción atómica, espectroscopía de emisión, fluorescencia de rayos X, análisis por activación neutrónica, cromatografía líquida de alta resolución, espectrofotometría, espectrofluorimetría, etc. Comentaremos especialmente la utilización de métodos espectrofotométricos, centrándonos en los que emplean como reactivos derivados antraquinónicos, y dado el carácter de esta Memoria, en los métodos fluorimétricos utilizados en la determinación de Zr(IV).

Determinación espectrofotométrica de Zr(IV) utilizando como reactivos derivados antraquinónicos.

Recordemos que el Rojo de Alizarina S fue propuesto por De Boer (**4**), en 1925 como reactivo para la identificación de Zr(IV) y recomendada para el mismo fin por Charlot y Bezier (**5**), en 1943, y Wenger y Col. (**6**) en 1945.

El posible uso de este reactivo en Análisis cuantitativo lo estudian Yoe y Overholser (**7**) en 1943 y Green en 1948, el primero en presentar un método para la determinación colorimétrica de Zr en arcillas y rocas silicatadas mediante Alizarina S (**8**). Para la determinación de Zr en platino, Tananaev y Khovyakova proponen una colorimetría mediante patrones coloreados (**9**). La reproducibilidad de los resultados analíticos es criticada por Mayer y Bradshaw que atribuyen los bajos valores de las absorciones obtenidas a hidrólisis irreversible de los iones Zr^{4+} (**10**). La formación policationes de circonio también produce, a menudo, complicaciones en la determinación colorimétrica de Zr (IV) con Rojo de Alizarina S (**11**).

El complejo rojo-purpurina de estequiometría 1:1 que se forma en medio ácido (pH 0'6-1'5) es estable por lo menos 1 hora. Al trabajar en medio ácido el método es muy selectivo (a pH 1 no interfieren cantidades moderadas de Al, Fe^{3+}, Ti y Th). La interferencia de grandes cantidades de Fe(III) se eliminan con ácido ascórbico. Interfieren F^-, SO_4^{-2} y PO_4^{-3} fundamentalmente. La absorbancia se mide a 510 nm y el método fue aplicado por Wenger a la determinación de Zr en aleaciones de magnesio (**12**). Gubeli y Jacob aconsejan trabajar con soluciones recientemente preparadas y calentando previamente en medio 2'5 M en ClH destruyen los polímeros formados. Miden la absorbancia a 555 nm (**13**). Otros autores hacen énfasis en diferentes aspectos ya comentados de la reacción (**14, 15**) y se dan métodos para la determinación de Zr en Hiduminium RA350 y aleaciones similares (**16**), o bien Degenhardt determina Zr en rocas, minerales y aguas, midiendo la absorbancia a 546 nm (**17**). El mismo autor realiza además un estudio sobre la distribución geoquímica del Zr en la litosfera analizando 287

minerales y rocas (**18**). Silverman y Wausley proponen un método de determinación espectrofotométrica de Zr en Th midiendo la absorbancia a 540 nm (**19**).

Manning y White (**20**) proponen un método espectrofluorimétrico diferencial de determinación de Zr(IV) usando Rojo de Alizarina S, que Freund y Hollrook lo aplican a la determinación de Zr en presencia de Hf (**21**).

El ácido rufigálico (1,2,3,5,6,7-Hexahidroxiantraquinona) fue utilizado como reactivo espectrofotométrico de Zr(IV), operando en medio ácido ClH 1 M y midiendo la absorbancia a 560 nm. El procedimiento permite determinar de 3-9 μg/ml de Zr(IV) (**22**).

El purpurinsulfonato sódico (1,2,4-Trihidroxiantraquinona-3-sulfonato sódico) fue propuesto en 1975 por Román y Alvarez-Manzaneda como reactivo para la determinación espectrofotométrica de Zr(IV) por debajo de 7μg/ml midiendo la absorbancia a 600 nm, en un medio de pH 0'75-0'93 (**23**).

La 1-Amino-4-hidroxiantraquinona ha sido propuesta como reactivo para la determinación espectrofotométrica de 24-113 μg de Zr(IV) operando a pH = 3'5 y midiendo la absorbancia a 600 nm. Se utiliza CN^- como agente enmascarante para algunos interferentes (**24**).

La 4,8-Diamino-1,5-Dihidroxiantraquinona-2,6-Disulfonato sódico se ha utilizado en la determinación espectrofotométrica de Zr(IV), en un intervalo de 20-200 μg, midiendo en un medio de pH = 0'17, la absorbancia a 700 nm. Interfieren PO_4^{-3}, F^-, BrO_3^-, $PO_4H_2^-$, CrO_4^{-2}, EDTA y Fe entre otros (**25**).

Las reacciones comentadas hasta este momento se basan en la formación de complejos binarios con Zr(IV). Un método espectrofotométrico, basado en la formación de un complejo ternario con Zr(IV), es el que emplea Alizarina (1,2-Dihidroxiantraquinona) y F^-. Se trabaja en un medio que tiene metilisobutilcetona, a pH = 8'9 y la absorbancia se mide a 556 nm. El método permite la determinación de < 20 μg de Zr(IV). Diferentes interferentes se enmascaran con

EDTA (**26**).

Determinación espectrofluorimétrica de Zr(IV)

Para la determinación fluorimétrica de Zr(IV) se han recomendado reactivos que teniendo grupos OH vecinales, sean capaces de formar quelatos fluorogénicamente favorables, como es el caso de la flavona como reactivo fluorogénico de Zr(IV) y experimentalmente se ha demostrado que los 3-hidroxiderivados de la flavona forman quelatos fluorescentes con Zr(IV). No hemos encontrado antecedente alguno sobre la utilización de derivados de la antraquinona como reactivos fluorimétricos de Zr(IV).

El flavonol (3-hidroxiflavona), en medio moderadamente fuerte en H_2SO_4, origina con Zr(IV) una fluorescencia azul. El método permite la determinación fluorimétrica de Zr(IV) en minerales, arcillas, arenas refractarias, etc, que lo contienen por debajo de un 0'25 %. Sólo interfiere Hf(IV), pero se recomienda la eliminación previa del Fe y otros metales pesados por procedimientos electrolíticos (**27**).

La datiscina (2',3,5,7-tetrahidroxiflavona) se sugiere como un reactivo selectivo para la determinación fluorimétrica de Zr(IV). Se trabaja en medio ClH 6N y se mide la fluorescencia a 520 nm. El método permite la determinación de 0'005 a 3 μg /ml de Zr y se aplica a su determinación en aleaciones (**28**).

Files emplea la 3,4',7-Trihidroxiflavona disuelta en etanol en un medio que es 3M en SO_4H_2. Al trabajar en ese medio ácido, muchos de los componentes asociados al Zr en aleaciones y minerales, no interfieren en cantidades de miligramos. Las interferencias más acusadas son las de Mo, Ti, Th, Sb,y Sn. Se mide la fluorescencia a 475 nm excitando a 417 nm (**29**).

La 3-hidroxicromona es un 2-fenilderivado de la 3-hidroxiflavona que ha sido propuesto como reactivo fluorogénico para la determinación de Zr(IV) (**30**).

La determinación de Zr y Hf con miricetina (3,3',4',5,5',7-hexahidroxiflavona) ha sido descrita por Talipov y col. El metal es tratado con solución de reactivo en presencia de 40 % de etanol y la fluorescencia del complejo formado se mide a 536 nm (para el Zr) y 520 nm (para Hf) excitando a 436 nm. En presencia de ácido ascórbico, tiourea, H_2O_2 y ClH concentrado, 10 veces exceso de Hf y una gran cantidad de metales pesados no interfieren en la determinación de Zr. Para el ensayo de Hf en ausencia de Zr, los metales pesados son también complejados con tiourea y ácido ascórbico. El método se ha empleado para la determinación de 50-600 ppb de Zr y de 20-200 ppb de Hf en aleaciones y aguas subterráneas (**31**).

La morina (2', 3, 4', 5, 7-pentahidroxiflavona) forma con Zr(IV) un complejo altamente fluorescente, así como con un elevado número de iones metálicos que son fluorescentes en las mismas condiciones. Se trabaja midiendo la fluorescencia en medio 2 M en HCl, antes y después de adicionar EDTA. En este medio no interfiere As, Be, Bi, Cd, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Hf, Mo, Ni, Tl, Ge y Zn en concentraciones tan altas como 8 mg/100 ml. En este medio ácido, Al, Sb y Sn forman complejos fluorescentes con el reactivo. Sin embargo, Zr puede ser determinado en presencia de los mismos previa adición de EDTA (la fluorescencia del complejo con Zr(IV) es atenuada por EDTA, mientras que la fluorescencia de los otros complejos permanece, por lo que la determinación de Zr(IV) se realiza por diferencia). El método se ha aplicado a la determinación de Zr(IV) en rocas silicatadas o materiales de composición similar (**32**).

Plotsikwa y col. (**33**) utilizaron la morina en medio ácido y en presencia de complexona III para la determinación fluorimétrica de Zr(IV) en muestras de interés geológico. Se mide la fluorescencia a 510 nm y el método se aplica a muestras que contienen de 0'002-0'007 % de Zr.

Gan y col. (**34**) determinan fluorimétricamentetrazas de Zr(IV) en materiales geológicos, con separación por intercambio iónico, haciendo uso del complejo triple Zr(IV)-Morina-SO_4^{-2} (1:1:1) que se forma en un medio que contiene H_2SO_4.

Se excita a 369 nm y su mide a 505 nm. El límite de detección es de 2 μg/ml, el coeficiente de variación de 7'12 % y la recuperación es del 95-101 %.

La reacción con morina ha sido investigada con detalle por Pilipenko y col. (**35**), que usan soluciones micelares para exaltar la sensibilidad. Usando sulfato de hexadecilpiridinio y etanol, la fluorescencia a 572 nm, excitando a 436 nm, es rectilínea, en relación a Zr(IV) o Hf(IV) en el rango 1-100 ng/ml. No influyen Co, Ni, Mn, Fe, Ta, Mo, V, Cr y Ti. Interfieren F^-, citratos y $C_2O_4^{-2}$; W y Mo pueden eliminarse con tartratos. Los mismos autores, afirman que el complejo triple que forma Zr o Hf con Morina y SO_4^{2-} en solución acuosa etanólica (80 % de etanol) en un medio que contiene H_2SO_4, emite a 512 nm excitando a 436 nm y permite la determinación de 1-100 ng/ml de Zr o Hf. El método se ha aplicado a la determinación de Zr(IV) en aleaciones refractarias. Complejos triples, análogamente fluorescentes, se forman con Morina, BCTA y SO_4^{-2} en solución etanólica (80 % de etanol) y en presencia de SO_4H_2. Se puede determinar 10 ng/ml de Zr o Hf (**36**).

Se han utilizado columnas con morina inmovilizada para la determinación fluorimétrica de Zr (IV) en aguas, LD = 1 μg/ml (**37**).

Hércules, en 1961, propone un método de determinación de microgramos de Zr(IV), en presencia de miligramos de Fe, V y Ti, que implica extracción previa del Zr(IV) con 2-tenoiltrifluoracetona (TTA) disuelta en xileno, y desarrollo de la fluorescencia con quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxiflavona). Se opera en medio 2'5 M en HCl y elevado contenido en etanol. Se excita a 440 nm y se mide la fluorescencia a 505 nm. La precisión del método es del 4 %, LD = 0'05 μg de Zr y la mínima cantidad de Zr(IV) que puede ser determinada con precisión del 10 % es 0'14 μg (**38**).

La fluorescencia del complejo Zr(IV)-quercetina se exalta cuando la reacción se realiza en papel de filtro. Basándose en ello, Desai y Sulhalatha proponen un método fluorimétrico de determinación de microcantidades de Zr(IV) en rocas, separando previamente el Zr(IV) por la técnica del "ring-oven" (**39**).

La quercetina-7-glucósido fue propuesta por Morozova y col. en 1979, para

la determinación fluorimétrica de Zr(IV), a pH = 1'1 con tampón acetato con un medio al 60 % en acetona. Se puede determinar de 0'33 a 33 μg/ml de Zr(IV) y se mejora la selectividad del método usando agentes enmascarantes. El coeficiente de variación es 12 % y en la determinación de 1 a 2'5 μg de Zr en 15 ml de volumen. El método se aplicó a aguas minerales y a aguas naturales y contaminadas previa extracción del Zr(IV) (**40**) con tenoiltrifluoroacetona (TTA); el coeficiente de variación es menor del 17 % en la determinación de 1 a 3 μg/ml de Zr(IV) (**41**).

Zel'tzer y col. usan el mismo reactivo para el desarrollo de mezclas de Zr y Hf. El ensayo de 3-30 ppb de Zr en presencia de hasta 50 veces la cantidad de Hf se hace con el reactivo acetona y tampón acetato a pH = 1'1. La fluorescencia del complejo con Zr se mide a 540 nm excitando a 436 nm. Para determinar 5-50 ppb de Hf en presencia de 75 veces exceso de Zr, otra porción de muestra se trata con acetona, H_2O_2 y ClH 8 M midiendo la fluorescencia a 520 nm, excitando a 436 nm. El método fue usado para determinar 0'9-6'2 ppb de Zr y de 0'2-0'5 ppb de Hf en aleaciones a base de Mg y W (**42**).

La 3,7-dihidroxiflavona en metanol al 50 %, a pH = 2 conseguido mediante ClH y 0'02 M en SO_4Na_2, forma un complejo fluorescente con Zr(IV) de estequiometría 1:1, que se utiliza para la determinación fluorimétrica del mismo, de 2-40 ng/ml, excitando a 395 nm y midiendo la fluorescencia a 465 nm. El método se aplica también a la determinación simultánea de Zr y Hf con un error del 5 % (**43**).

El método fluorimétrico de determinación de Zr(IV) usando azul de calceína (ácido 3-aminometil-4-metilumbelliferona-N,N-diacético) es muy sensible pero poco selectivo pues interfiere seriamente Ag, Bi, Cd, Cu, Fe, Mo, Mn, Ni, Pb, Sn y As. El complejo es 1:1 a pH = 5'5. Su fluorescencia se mide a 405 nm excitando a 350 nm. La deviación estándar es 1,8 % para 100 ng de Zr (**44**). Tambien el Zr(IV) con azul de calceína y F^- forma una complejo ternario fluorescente (**45**).

Para la determinación fluorimétrica de Zr(IV) en presencia de Ti, W y Mo, se propone la 8-hidroxiquinoleina por Schneider y Roselli. El quelato, obtenido con tampón HF/ tartrato a pH = 9, se extrae con cloroformo y la fluorescencia se mide 520 nm excitando a 398 nm. El límite de detección es 1 μg de Zr. El coeficiente de variación 2'3 %. Es posible determinar 0'33 μg/ml de Zr en una mezcla que contiene además 10 veces de Mo y W y 6 veces de Ti (**46**).

Un método fluorescente mejorado por EDTA para la determinación fluorimétrica de Zr(IV) emplea el 8-hidroxiquinoleína-5-sulfonato. Se opera a pH = 6, y se mide la fluorescencia a 500 nm excitando a 360 nm. El intervalo de utilización es 0'5 mg/ml a 1 μg/ml. El límite de detección es de 0'5 ppb, y se aplica a la determinación de Zr(IV) en muestras geológicas (**47**).

Se han usado derivados de la 4-aminoantipirina como reactivos fluorogénicos de Zr(IV). El salicilideno-4-aminoantipirina forma con Zr(IV) un complejo fluorescente de estequiometría 1:2 (Zr:R) en un medio que contiene 40 % de etanol y pH de 1 a 2 fijado con ClH. La fluorescencia se mide a 554 nm excitando a 366 nm. El límite de detección es 0'008 μg/ml de Zr (**48**). Esta reacción se usa para la determinación de 0'03-10'00 μg/ml de Zr(IV) en presencia de algunos iones metálicos, utilizando como agente enmascarante Trilon B. La desviación standar relativa 1'43 % a 5'95 % (**49**).

El β-hidroxinaftol-4-aminoantipirina, reacciona con Zr(IV) a pH 0-0'5 en tampón CH_3COONa/ClH para formar un complejo neutro fluorescente de estequiometría 1:2 (Zr:R). La fluorescencia se mide a 480-510 nm excitando a 366 nm. La sensibilidad es de 0'1 μg/ml y el error de 1'9-6'0 % (**50**).

La determinación espectrofluorimétrica de Zr y Hf con ácido salicílico y rodamina B ha sido descrita por Ramakrishna y Subramanian. El Zr es selectivamente extraido en un medio 1 M en monocloroacético de pH = 1'4-1'6 y ácido salicílico 0'3 M con metilisobutilcetona. La fase orgánica se trata con HCl 2'5 M y la fase acuosa se trata después con ácido salicílico en metanol y rodamina

B, y se extrae con benceno, midiendo la fluorescencia del extracto a 575 nm, excitando a 546 nm. El procedimiento se aplica a muestras de Hf conteniendo de 4'4-14'5 % de Zr (**51**).

El Zr forma complejo fluorescente en medio ácido con biacetilmonoxina nicotinilhidrazona disuelta en etanol. El pH = 1'5-1 es conseguido con H_2SO_4. El complejo es ternario, de estequiometría 1:2:1 ($Zr:R:SO_4^{-2}$). Se excita a 415 nm y la fluorescencia se mide a 500 nm. El método permite determinar de 5-100 ng/ml de Zr. Se aplica además a la determinación de mezclas binarias Ti + Zr; Ti + Hf y Zr + Hf (**52**). Se ha utilizado la técnica de la espectroscopía de fluorescencia sincronoderivada para la resolución de mezclas binarias y ternarias de Ti, Zr y Hf, basándose en los complejos fluorescentes con la biacetilmonoxina nicotinilhidrazona en medio ácido (**53**).

Pal y Choudhury han propuesto los triazen-N-óxidos como reactivos fluorimétricos de Zr para su determinación a niveles de nanogramos.

El β-(2-hidroxifenil)-1-feniltriazen-N-óxido forma complejos fluorescentes con Zr, Hf, Nb y Ta. En el rango de pH de 1'65-1'95 la fluorescencia del complejo con Zr es lineal entre 5 ppb-1'5 ppm, midiendo la fluorescencia a 570 nm excitando a 435 nm. Errores relativos de $\leq$ 0'68 %, se obtiene en el análisis de mezclas conteniendo 0'32-0'79 % de Zr (V y Mo no interfieren) (**54**). Los mismos autores utilizan el 3-(2-carboxifenil)-1-metiltriazen-N-óxidoen el intervalo de pH de 0'8-1'10 para la determinación fluorimétrica de Zr en el intervalo entre 25 ppb-1'5 ppm, midiendo la fluorescencia a los 35 minutos la mezcla de reactivos a 510 nm excitando a 378 nm. De 35 especies ensayadas, sólo Nb, EDTA y $C_2O_4^{-2}$ interfieren (**55**).

2. ESTUDIO DEL COMPLEJO TERNARIO CIRCONIO(IV)-EDTA-ROJO DE ALIZARINA S

2.1. CARACTERISTICAS ESPECTRALES

En el estudio de la selectividad del método espectrofluorimétrico de Boro(III) con Rojo de Alizarina S a pH 7'4, propuesto en esta memoria, observamos que la utilización de la sal disódica del ácido Etilendiaminotetracético aumentaba el nivel de tolerancia de numerosos iones interferentes. Al ensayar el Zr(IV) como posible interferente, se comprobó que utilizando este enmascarante se producía un considerable aumento en la señal fluorescente, lo que nos llevó a pensar en la posible formación de un complejo ternario fluorescente de Zr(IV) con EDTA y Rojo de Alizarina S como reactivo.

Con objeto de determinar las longitudes de onda a las cuales este complejo ternario presentaba su fluorescencia máxima y comprobar su variación con la acidez del medio, se registraron los espectros no sólo del complejo ternario Zr(IV)-EDTA-RAS, sino tambien del binario Zr(IV)-RAS. Se pudo comprobar que el complejo binario solo presenta una débil fluorescencia para valores de pH entorno a 7'0, mientras que la fluorescencia aumenta notablemente en presencia de EDTA, para valores de pH ligeramente ácidos y próximos a la neutralidad. A lo largo de todo este Capítulo se utiliza la sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético.

En la Figura VI.1 se representan los espectros de excitación y emisión a pH= 5'0. Para su obtención, se adicionó en matraz de 10 ml, 0'1 ml de disolución de Zr(IV) de 10^{-3} M, 0'1 ml de disolución de RAS 10^{-3} M y 1'0 ml de disolución de EDTA 0'1 M, consiguiendo el pH mediante NaOH/HCl y completando hasta el volumen final con agua destilada.

Se preparó un blanco que contenía todos los reactivos menos Zr(IV).

Los espectros se realizaron en modo no corregido, utilizando rendijas de

excitación y emisión de 5 nm. La velocidad de barrido fue de 480 nm/min y la respuesta de 0'5 s.

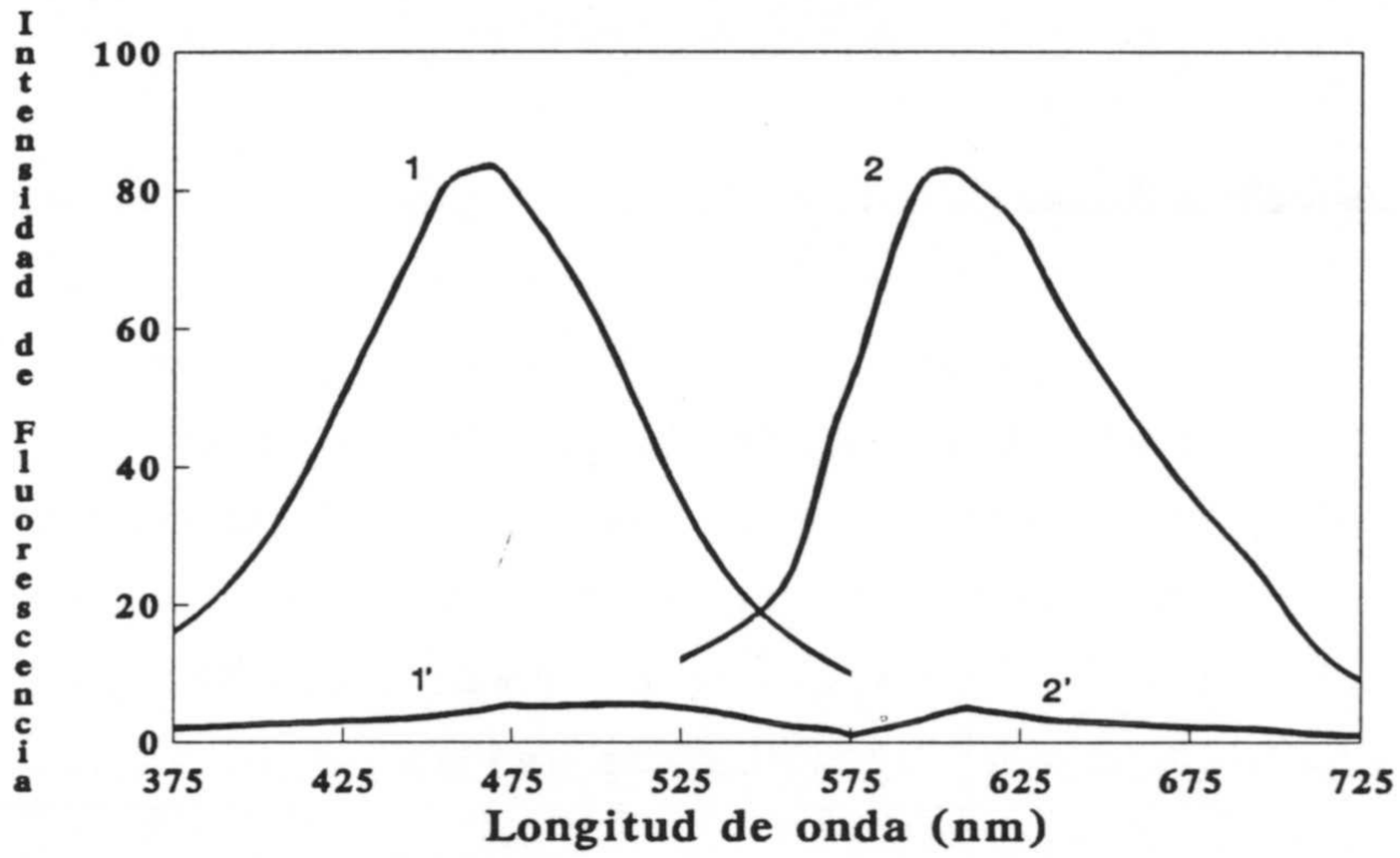


Figura VI.1. Espectros de excitación y de emisión del sistema: Zr(IV)-EDTA-RAS a pH= 5'0 (1 y 2) y Blanco (1' y 2'). [Zr(IV)]= [RAS]= 1.10^{-5} M, [EDTA]= 0'01 M

Se observó que el complejo ternario presentaba una intensidad de fluorescencia máxima a 605 nm, excitando a 470 nm.

2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Debido a la intensa fluorescencia que presentaba el sistema Zr(IV)-EDTA-RAS, se procedió al establecimiento de las condiciones experimentales óptimas para la determinación de Zr(IV) mediante la formación de este complejo ternario.

* <u>Influencia del pH</u>

En un vaso de 500 ml se preparó una disolución que contenía concentraciones de Zr(IV) y RAS de 10^{-5} M y una concentración de EDTA de 0'01 M. Los diferentes valores de pH se obtuvieron por sucesivas adiciones de NaOH y HCl de concentraciones adecuadas. Se midió la fluorescencia a temperatura ambiente, a las longitudes de onda de los máximos: λ_{ex} = 470 nm, λ_{em} = 605 nm utilizando rendijas de ex/em 5/5 nm. Los resultados se muestran en la Tabla VI.1 y se representan en la Figura VI.2.

En la gráfica se muestran las curvas señal vs. pH obtenidas para el complejo ternario y un blanco de reactivos sin Zr(IV), así como la curva diferencia de ambas, observándose que en el intervalo de pH comprendido entre 5'3-6'3, la fluorescencia del sistema es máxima y permanece constante y que en todo el rango estudiado el blanco presenta una emisión fluorescente practicamente nula.

De esta experiencia se selecciona como valor de pH óptimo el de 5'5, encontrándose en la parte central de la meseta.

Tabla VI.1

Influencia del pH

pH	IFc	IFb
3'0	1'5	1'2
4'0	13'3	1'2
4'5	43'6	1'4
5'0	60'2	1'9
5'2	100'5	4'9
5'3	110'2	4'5
5'4	111'9	3'6
5'6	110'4	1'6
6'0	110'5	1'3
6'3	111'5	1'0
6'5	87'6	1'9
7'0	80'2	0'8
8'0	35'4	1'8
9'0	31'9	1'0

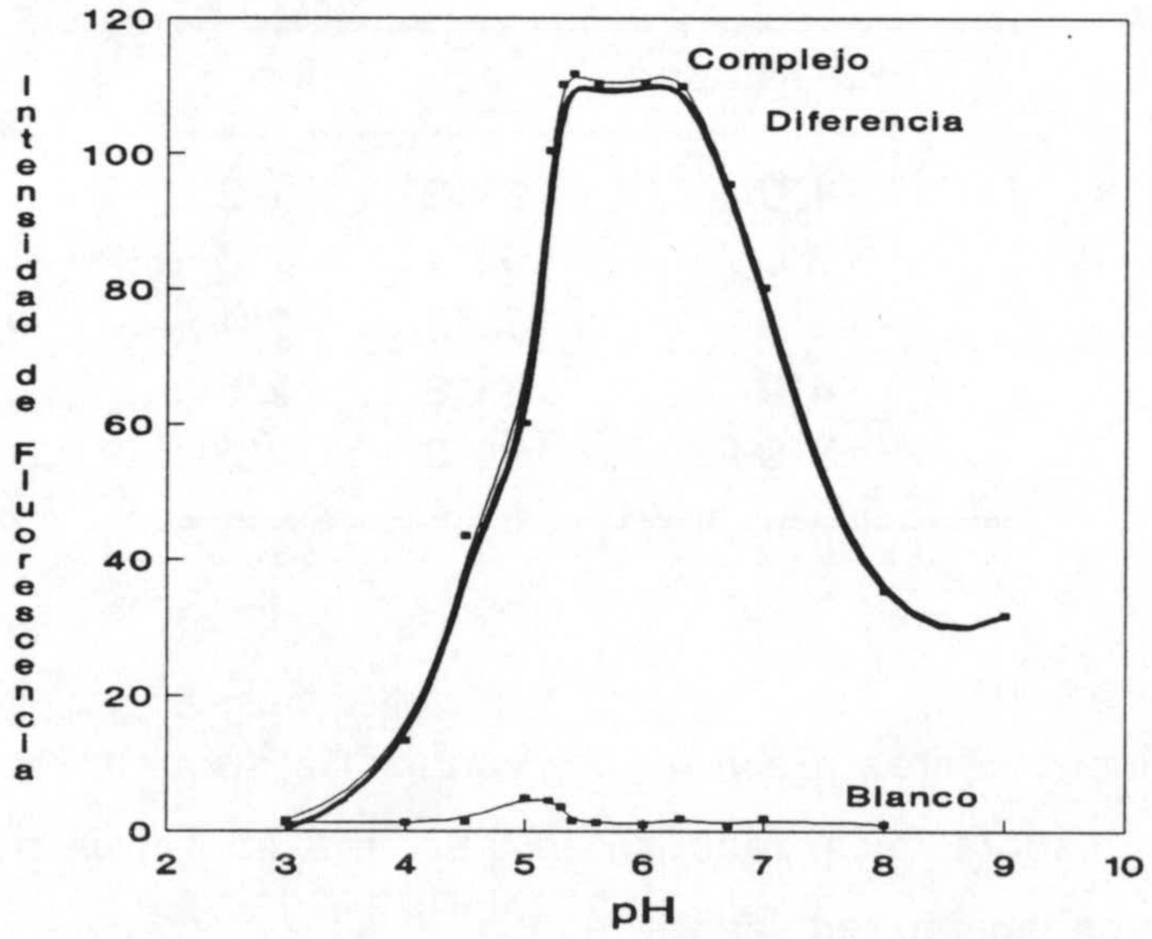


Figura VI.2. Influencia del pH. [Zr(IV)] = [RAS] = 1.10^{-5} M; [EDTA] = 0'01 M.

* **Influencia de la concentración de disolución Reguladora**

Para seleccionar la concentración de tampón adecuada para llevar a cabo la determinación fluorescente, se realizó una experiencia a pH 5'5 variando la cantidad de disolución reguladora adicionada una vez comprobado que la naturaleza del tampón acético/acetato sódico no alteraba la señal fluorescente.

En matraces de 10 ml se adicionó: 0'1 ml de Zr(VI) 10^{-3} M, 0'1 ml de disolución de RAS, 1'0 ml de disolución de EDTA 0'1 M y el volumen indicado de tampón acético/acetato 1 M de pH 5'5, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. Se midió la fluorescencia a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 470 nm y λ_{em} = 605 nm y rendijas de excitación y emisión de 5 nm.

Los resultados se recogen en la Tabla VI.2

Tabla VI.2

Influencia de la concentración de tampón

V(ml) Tampón	IFc	IFb
1'0	109'2	1'2
2'0	104'1	2'3
3'0	113'5	2'4
4'0	111'8	2'5
5'0	100'3	2'5

La señal fluorescente sufre muy poca variación al aumentar la concentración de disolución reguladora, alcanzándose un valor máximo al adicionar 3 ml, así como una buena capacidad reguladora.

* **Estabilidad del sistema y Orden de Adición**

Con objeto de comprobar si el orden de adición era una variable que afectaba significativamente al desarrollo de la fluorescencia del sistema, se llevó a cabo una experiencia en la que se prepararon una serie de matraces de 10 ml que contenían concentraciones de Zr(IV) y RAS 10^{-5} M y una concentración de EDTA 0'01 M, y en los que se modificó el orden de adición de la forma indicada en la Tabla VI.3.

Las medidas se realizaron a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 470 nm y λ_{em} = 605 nm y rendijas de excitación y emisión de 5 nm.

Tabla VI.3

Influencia del orden de adición de los reactivos

Orden de Adición	IFc	IFb	IF
1. Zr(IV) + EDTA + Tampón + RAS	118'9	1'2	117'7
2. Zr(IV) + RAS + EDTA + Tampón	90'6	1'4	89'2
3. Zr(IV) + Tampón + EDTA + RAS	92'8	1'3	91'5
4. Zr(IV) + EDTA + RAS + Tampón	118'1	1'6	116'5
5. Zr(IV) + RAS + Tampón + EDTA	72'5	1'3	70'5
6. Zr(IV) + Tampón + RAS + EDTA	44'6	1'8	42'8

Se observó que el orden de adición es crítico para el desarrollo de la fluorescencia del sistema, pudiendose comprobar que la señal máxima se consigue cuando se adiciona al ión metálico consecutivamente la disolución de EDTA, resultando indiferente la adición posterior de la disolución de RAS o la disolución reguladora acético/acetato.

Para establecer una posible relación entre la crítica influencia que presentaba el orden de adición y la cinética de formación del complejo ternario fluorescente, se estudió la estabilidad que presentaban las medidas para cada uno

de los órdenes de adición ensayados, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla VI.4.

En esta solo se reflejan las señales fluorescentes del complejo ya que los correspondientes blancos no sufren modificación en el trascurso del tiempo.

Tabla VI.4

Estabilidad del sistema Zr(IV)-EDTA-RAS

Orden de adición	0	10 min	15min	30min	60 min	180 min	360 min
1	80'1	111'4	122'8	121'5	123'5	123'0	124'0
2	66'8	82'3	96'2	100'5	106'9	113'1	120'0
3	65'5	85'9	98'5	102'5	104'6	105'4	107'7
4	82'0	110'8	122'7	123'0	124'8	123'0	123'2
5	63'3	69'8	76'9	87'5	97'7	105'4	113'1
6	40'2	41'3	44'6	58'2	61'5	70'0	76'9

A la vista de los resultados se deduce que la formación del complejo ternario no es instantánea y que es necesario la formación previa del complejo binario Zr(IV)-EDTA para que la fluorescencia del sistema Zr(IV)-EDTA-RAS se desarrolle más rapidamente. Esto se pone de manifiesto al comprobar que en todos los ordenes de adición ensayados la señal aumenta al transcurrir el tiempo, llegando incluso a alcanzarse la fluorescencia máxima pasadas algunas horas. En el caso de formación previa del complejo binario Zr(IV)-RAS, es necesario esperar más de 2 horas para conseguir la total formación del ternario fluorescente.

De esta experiencia se selccionan como ordenes de adición más convenientes aquellos en los que se adiciona el EDTA despues del Zr(IV). El orden de adición utilizado en posteriores experiencias será:

Zr(IV) + EDTA + Tampón + RAS

También se deduce que es necesario esperar al menos 15 min. para la total formación del complejo ternario fluorescente Zr(IV)-EDTA-RAS.

* **Influencia de la Temperatura**

Se preparó una disolución que, en un volumen final de 50 ml contenía una concentración de Zr(IV) de 10^{-5} M, 5 ml de EDTA 0'1 M, 15 ml de tampón acetato de pH 5'5 y una concentración de RAS de 10^{-5} M. El matraz se introdujo en baño termostático y una vez alcanzada la temperatura deseada, se medía la fluorescencia del sistema, cambiando el contenido de la cubeta para cada medida.

Las medidas se realizaron a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 470 nm y λ_{em} = 605 nm y rendijas de excitación y emisión de 5 nm.

En la Tabla VI.5 se reunen los resultados de esta experiencia, observándose que la temperatura no parece ejercer ningún efecto sobre la fluorescencia del sistema, y por lo tanto es posible trabajar a temperatura ambiente.

Tabla VI.5

Influencia de la Temperatura

Tª (°C)	IFc	IFb
5	118'7	1'6
10	116'7	1'6
15	117'4	2'0
20	120'3	1'6
25	121'7	1'5
30	121'0	1'2
35	120'3	1'1
40	118'8	1'0
45	118'1	1'8
50	117'4	1'5

* **Influencia de la concentración de Rojo de Alizarina S**

Para establecer la concentración de reactivo óptima para que la señal del complejo ternario fluorescente sea máxima, se prepararon una serie de matraces de 10 ml a los que se les adicionó: 0'1 ml de Zr(IV) de concentración 10^{-3} M, 1'0 ml de disolución de EDTA 0'1 M, 3'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 5'5 y volúmenes crecientes de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. De la misma forma fueron preparados los correspondientes blancos.

Los resultados de las medidas de intensidad de fluorescencia, a las longitudes de onda de medida y rendijas de excitación y emisión de 5 nm, del complejo y su respectivo blanco, medidas una vez trascurridos 15 min, se reflejan en la Tabla VI.6 y se representan en la Figura VI.3.

Tabla VI.6

Influencia de la concentración de RAS

[RAS].10^5 M	IFc	IFb
0'1	18'7	0'7
0'3	48'7	0'5
0'5	73'3	0'4
0'8	94'5	1'0
1'0	119'2	1'2
1'5	135'8	1'3
2'0	154'5	1'8
3'0	157'2	2'0
4'0	156'6	2'1
5'0	158'0	3'2
6'0	147'4	4'0

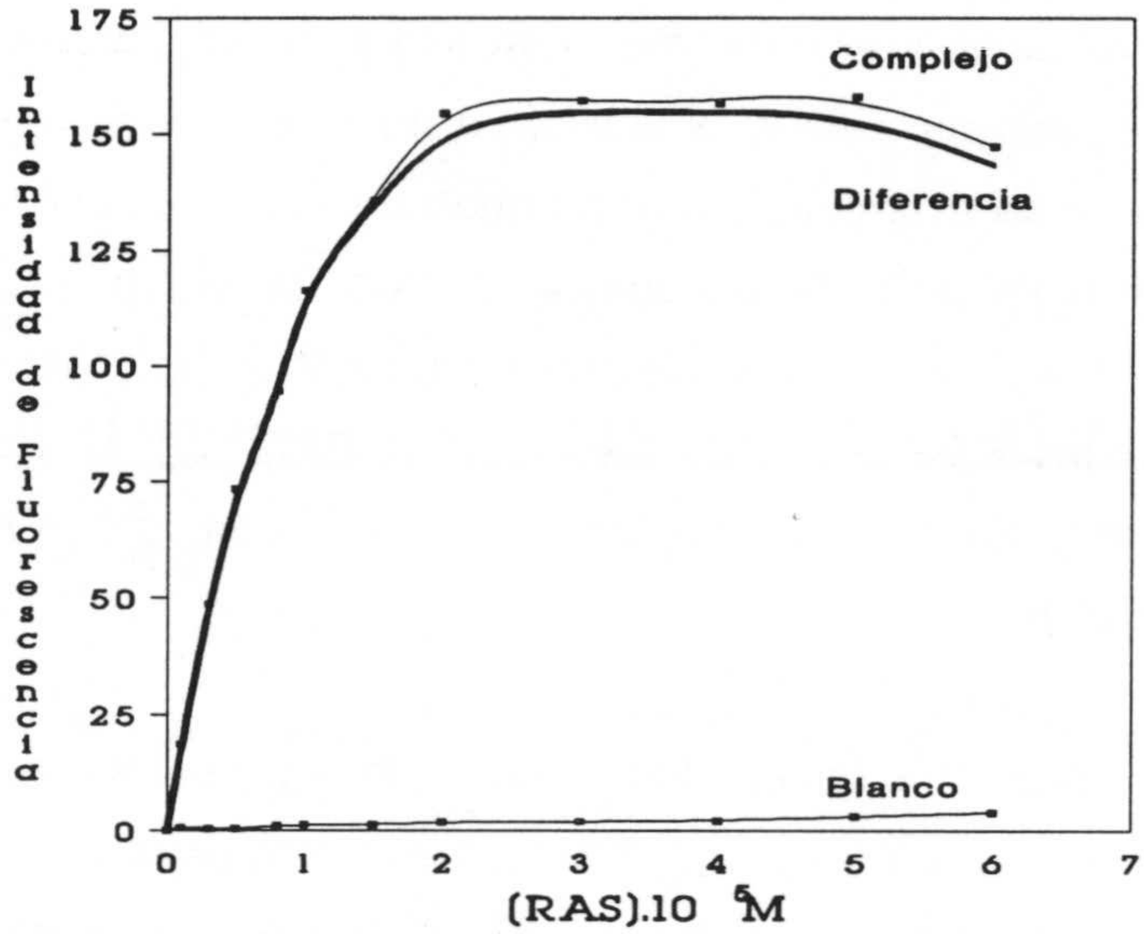


Figura VI.3. Influencia de la concentración del reactivo RAS. [Zr(IV)]= 1.10^{-5} M. [EDTA]= 0'01 M, pH= 5'5.

La fluorescencia del sistema aumenta linealmente con la concentración de reactivo, hasta alcanzar una concentración de 2.10^{-5} M, a partir del cual la señal permanece constante, sufriendo una leve disminución al sobrepasar una concentración de 6.10^{-6} M.

Para posteriores experiencias se ha seleccionado como óptimo un valor de 3.10^{-5} M en RAS, por encontrarse éste comprendido en la parte central de la meseta.

* **Influencia de la concentración de EDTA**

Para determinar la influencia que ejerce la concentración de EDTA en la formación del complejo ternario y establecer la concentración óptima de trabajo, se preparó una serie de matraces de 10 ml que contenían, en el orden de adición seleccionado: 0'1 ml de Zr(IV) de concentración 10^{-3} M, volúmenes crecientes de disolución de EDTA de diferentes concentraciones, 3'0 ml de disolución reguladora acético/acetatode pH 5'5 y 0'3 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. De la misma forma fueron preparados los correspondientes blancos.

Las medidas se registraron a los 15 min. de la preparación, a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 470 nm y λ_{em} = 605 nm y rendijas de excitación y emisión de 5 nm. Los resultados se muestran en la Tabla VI.7 y se representan en la Figura VI.4.

Tabla VI.7

Influencia de la concentración de EDTA

[EDTA] M	IFc	IFb
0	10'6	2'4
2.10^{-6}	36'0	2'6
6.10^{-6}	93'3	1'7
8.10^{-6}	116'6	1'9
1.10^{-5}	152'6	1'6
5.10^{-5}	152'3	1'2
1.10^{-4}	156'8	1'5
5.10^{-4}	154'8	1'2
1.10^{-3}	152'5	1'3
5.10^{-3}	152'6	1'8
1.10^{-2}	153'1	1'0
5.10^{-2}	152'9	1'1
7.10^{-2}	154'0	1'3

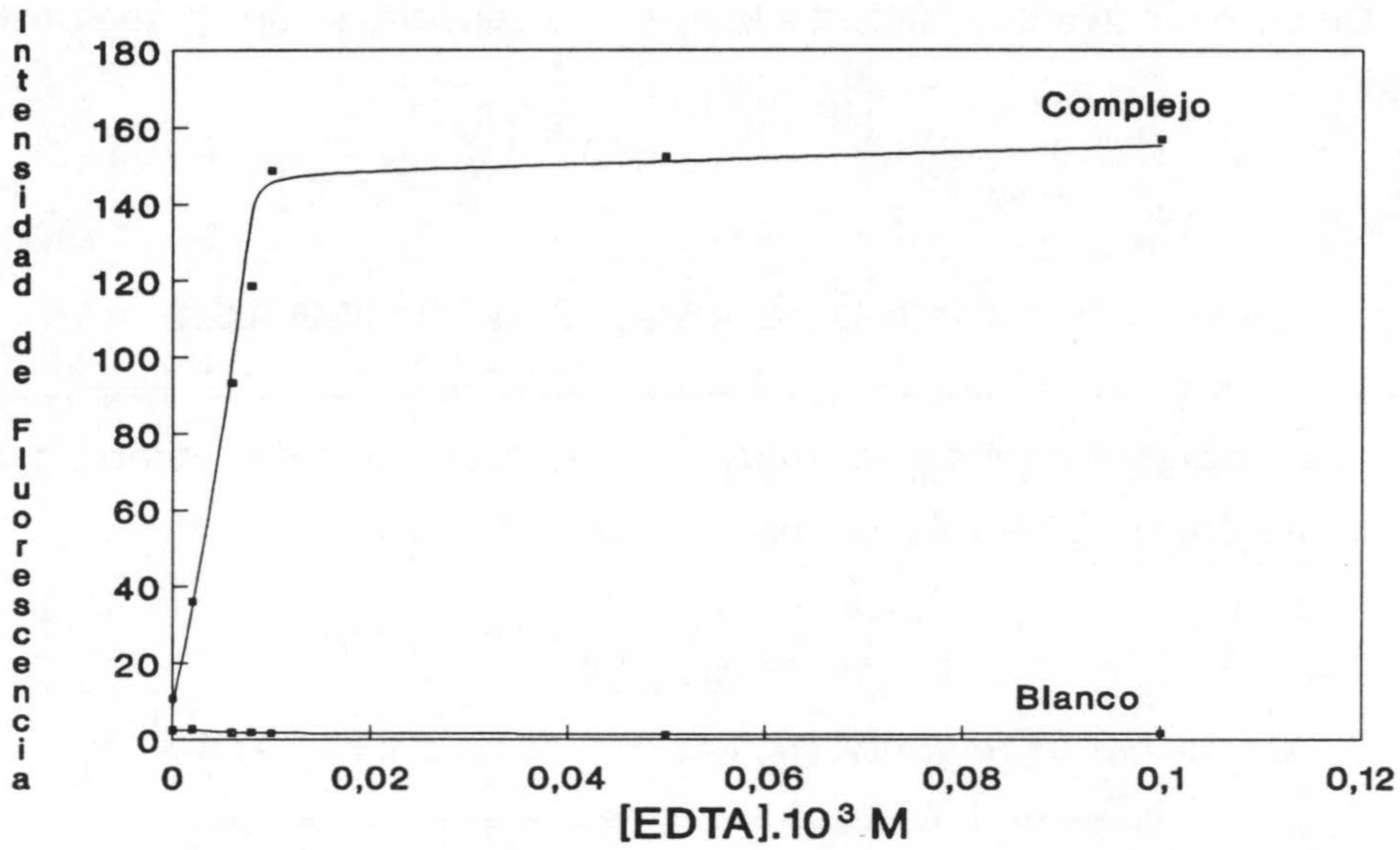


Figura VI.4. Influencia de la concentración del ligando EDTA. [Zr(IV)] = 1.10^{-5} M. [RAS] = 3.10^{-5} M, pH = 5'5.

Se observa que a partir de una concentración de EDTA de 1.10^{-5} M se consigue la total formación del complejo ternario fluorescente, alcanzándose así un valor máximo en la señal. En la experiencia se pone de manifiesto que para concentraciones elevadas de EDTA la señal permanece máxima y constante, hecho que permite la llevar a cabo la determinación de Zr(IV) en presencia de una alta concentración de este ligando.

La principal ventaja que esto supone es que la sal disódica del EDTA no solo actuará como ligando en la formación del ternario con Zr(IV) y RAS, sino que al estar en un considerable exceso, podrá actuar como agente enmascarante de posibles iones interferentes que afecten a la determinación, siendo posible

establecer una determinación bastante selectiva.

De estos resultados, se selecciona como concentración óptima un valor de 0'01 M.

* **Resumen de la optimización de variables experimentales**

Los valores óptimos que influyen en la formación del complejo ternario fluorescente Zr(IV)-EDTA-RAS se resumen en la Tabla VI.8.

Tabla VI.8

Optimización de variables para el sistema Zr(IV)-EDTA-RAS

Variable	Valor óptimo
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	470/605 nm
pH	5'5
[Dis. reguladora]	AcH/AcNa 0'3 M, pH = 5'5
T^a	No afecta entre 5-50°C
Tiempo de espera	15 min
Estabilidad	>6 h.
Orden de adición	Zr(IV) + EDTA + Tampón + RAS
[RAS]	3.10^{-5} M
[EDTA]	0'01 M

2.3. ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO ZR(IV)-EDTA-RAS

Para determinar la estequiometría del complejo ternario se aplicó el método de Yoe-Jones (**56**), investigando la relación estequiométrica de los componentes dos a dos, en presencia de un exceso del tercero de ellos.

A) Relación EDTA/Zr(IV)

Se introducen en matraces de 10 ml una cantidad constante de Zr(IV) de modo que su concentración final es de 10^{-5} M, cantidades crecientes de disolución de EDTA 10^{-4} M, 3'0 ml de tampón acético/acetatode pH 5'5 y 0'3 ml de disolución de RAS 10^{-5} M. De este modo se establecen una serie de relaciones molares EDTA/Zr(IV).

Se miden las señales fluorescentes despues de 15 min, a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 470 nm y λ_{em} = 605 nm y rendijas de excitación y emisión de 5 nm. La señal diferencia entre el complejo y su respectivo blanco se muestran en la Tabla VI.9 y se representan en la Figura VI.5.

Tabla VI.9

Estequiometría del complejo Zr(IV)-EDTA ([Zr(IV)] = 10^{-5}M, [RAS] = 3.10^{-5} M)

[EDTA]/[Zr(IV)]	IF
0'2	31'8
0'4	61'5
0'6	89'0
0'8	114'5
1'0	150'5
1'2	152'3
1'4	152'6
1'6	152'3
1'8	153'1
2'0	152'9

La relación estequiométrica encontrada en este caso entre EDTA:Zr(IV) es 1:1, la cual concuerda con la hallada potenciométricamente (1).

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2 MAR. 1995
COMISION DE

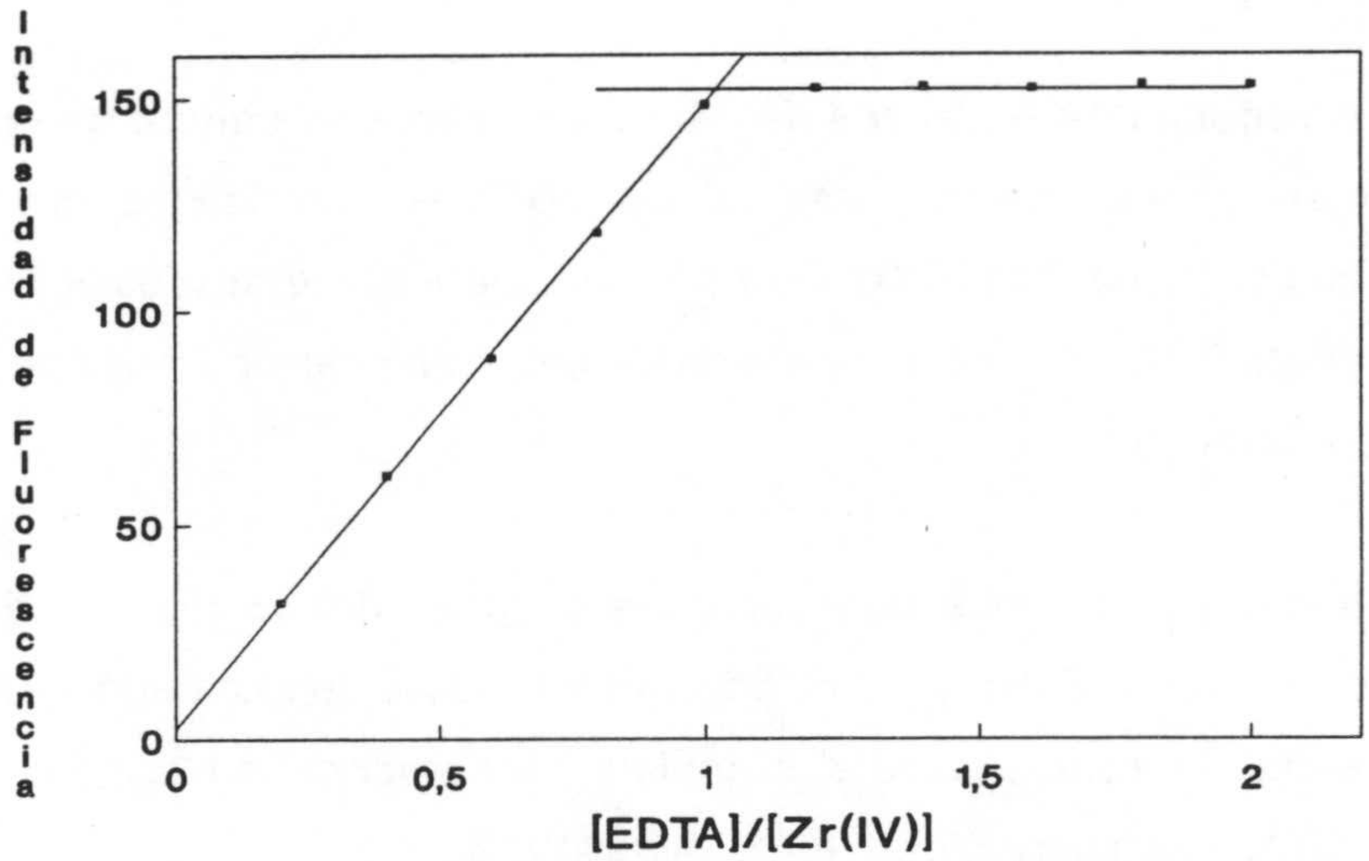


Figura VI.5. Método de Yoe y Jones. [Zr(IV)]= 10^{-5}M, [RAS]= 3.10^{-5} M, pH= 5'5

B) Relación RAS/EDTA

Se introducen en matraces de 10 ml una cantidad constante de Zr(IV) de modo que su concentración final es de 10^{-5} M, 1'0 ml de EDTA 10^{-4} M, 3'0 ml de tampón acético/acetatode pH 5'5 y volúmenes crecientes de disolución de RAS 10^{-4} M, se enrasan hasta el volumen final con agua destilada quedando establecidas una serie de relaciones molares RAS/EDTA.

Se miden las señales fluorescentes despues de 15 min, a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 470 nm y λ_{em} = 605 nm y rendijas de excitación y emisión de 5 nm. La señal diferencia entre el complejo y su respectivo blanco se muestran en la Tabla VI.10 y se representan en la Figura VI.5, comprobándose que la relación molar entre el ligando EDTA y el reactivo RAS es 1:1.

Tabla VI.10

Estequiometría del complejo RAS-EDTA ([Zr(IV)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 10^{-5} M)

[RAS]/[EDTA]	IF
0'2	19'1
0'4	48'6
0'6	78'4
0'8	103'9
1'0	125'1
1'2	137'8
1'5	142'0
1'8	145'3
2'0	148'4
2'2	150'5
2'4	154'8

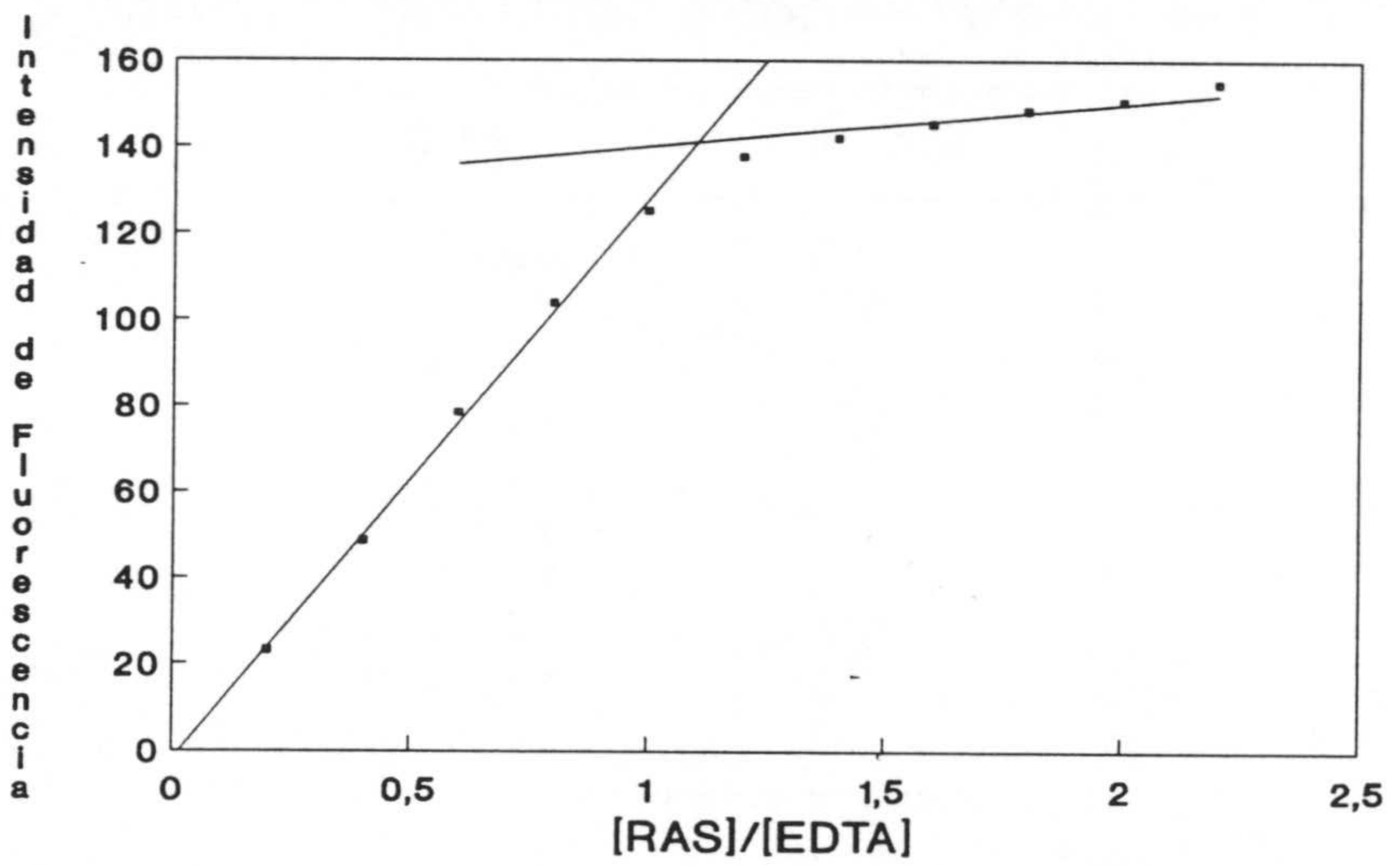


Figura VI.6. Método de Yoe y Jones. [Zr(IV)] = 10^{-5}M, [EDTA] = 10^{-5} M, pH = 5'5

C) Relación RAS/Zr(IV)

Se introducen en matraces de 10 ml una concentración de Zr(IV) de 10^{-5} M, 2'0 ml de EDTA 0'25 M, 3'0 ml de tampón acético/acetato de pH 5'5 y volúmenes crecientes de disolución de RAS 10^{-4} M, se enrasan hasta el volumen final con agua destilada quedando establecidas una serie de relaciones molares RAS/Zr(IV).

Se miden la fluorescencia a los 15 min. de la preparación a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 470 nm y λ_{em} = 605 nm y rendijas de excitación y emisión de 5 nm. La señal diferencia entre el complejo y su respectivo blanco se muestran en la Tabla VI.11 y se representan en la Figura VI.7.

Tabla VI.11

Estequiometría del complejo RAS-Zr(IV) ([Zr(IV)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 0'05 M)

[RAS]/[Zr(IV)]	IF
0'2	21'2
0'4	53'0
0'6	80'6
0'8	103'9
1'0	127'2
1'2	137'8
1'4	144'2
1'6	146'3
1'8	148'4
2'0	152'6

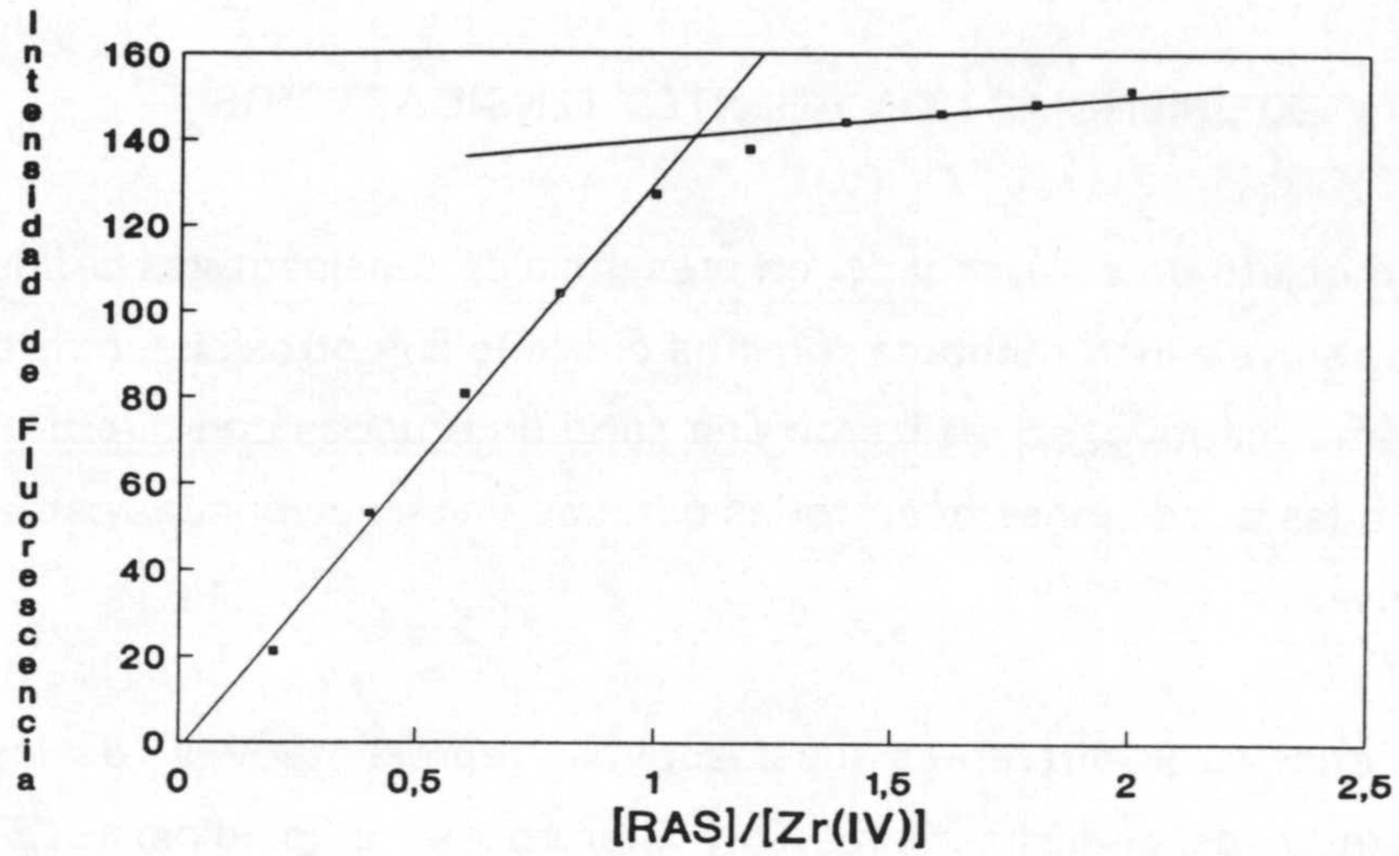


Figura VI.7. Método de Yoe y Jones. [Zr(IV)] = 10^{-5}M, [EDTA] = 0'05 M, pH = 5'5

Se pone de manifiesto que la relación molar entre Zr(IV) y el reactivo RAS en presencia de un exceso de EDTA es 1:1. La misma relación ha sido encontrada espectrofotometricamenteen ausencia de EDTA (**57**).

Una vez finalizada esta experiencia se concluye afirmando que la estequiometría encontrada para el complejo ternario es 1:1:1 (Zr(IV):EDTA:RAS).

3. ESTUDIO DEL COMPLEJO TERNARIO CIRCONIO(IV)-EDTA-ROJO DE ALIZARINA S EN MEDIO MICELAR

3.1. EXPERIENCIAS CON AGENTES TENSIOACTIVOS

Con objeto de comprobar si en presencia de tensioactivos la fluorescencia del sistema se veía incrementada como ha ocurrido con otros sistemas estudiados con el mismo reactivo, se realizaron una serie de pruebas con diferentes medios micelares a las condiciones operatorias óptimas ya seleccionadas para el sistema fluorescente.

Se ensayaron diferentes tensioactivos representativos de los diversos tipos: Bromuro de cetiltrimetilamonio y Cloruro de cetilpiridinio (BCTA y CCP, catiónicos), Dodecil sulfato sódico (DSS, aniónico) y Triton X-100 (TX-100, no iónico) a concentraciones muy superiores a su concentración crítica micelar (c.m.c).

Las disoluciones de los agentes tensioactivos fueron preparadas al 5 % (p/v) excepto para el TX-100 que se llevó a cabo al 10 % (v/v).

Para todos los surfactantes ensayados se llevó a cabo el mismo procedimiento operatorio: En matraces de 10 ml se añaden, 0'1 ml de disolución de Zr(IV) 10^{-3} M, 1 ml de disolución de EDTA 0'1 M, 3'0 ml de disolución tampón acético/acetato de pH 5'5, 1'0 ml de disolución de tensioactivo, 0'3 ml de disolución de RAS 10^{-3} M y agua destilada hasta completar el volumen final. También se preparó paralelamente un blanco para cada uno de los tensioactivos ensayados.

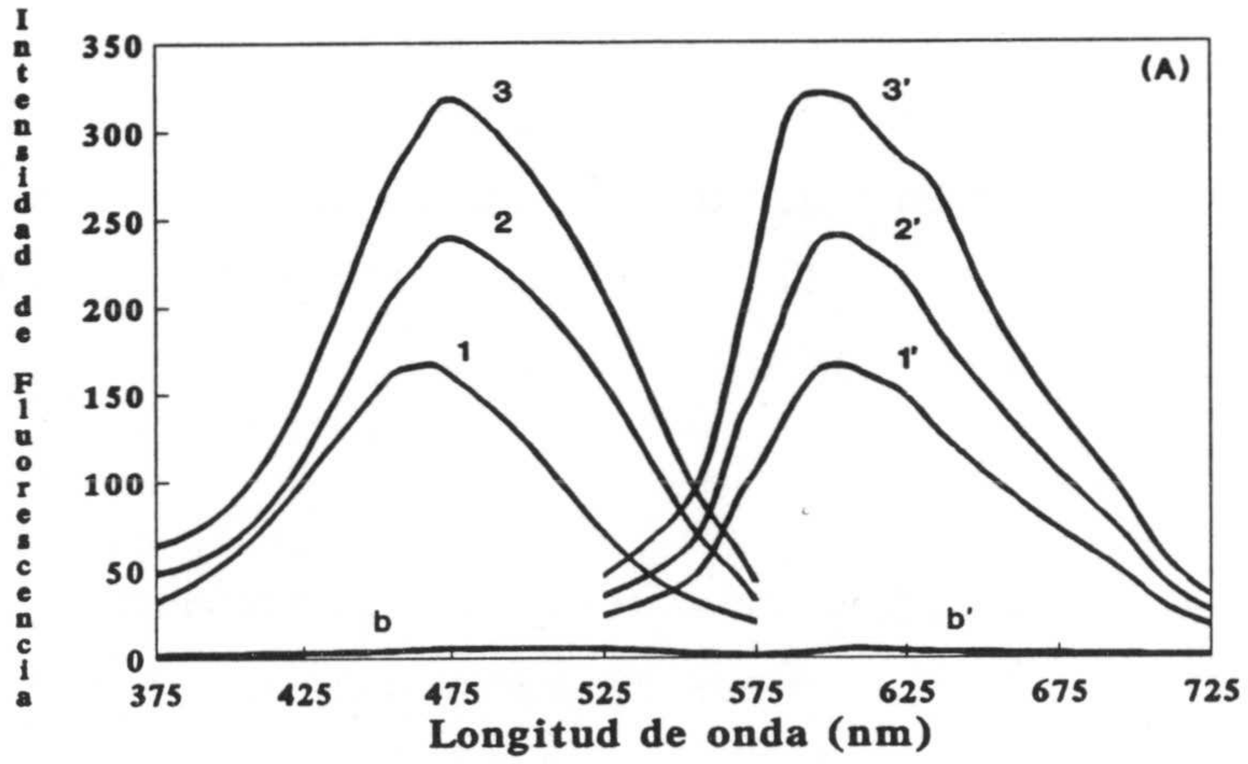
En todos los casos se usaron rendijas de excitación y de emisión de 5 nm, las medidas de fluorescencia se obtuvieron en modo no corregido y con una velocidad de registro de los espectros de 480 nm/min y respuesta de 0'5 s. La

temperatura de trabajo fue la ambiental y el registro se realizó pasados 15 min desde la preparación.

Los espectros de excitación y de emisión del complejo y su respectivo blanco en ausencia y en presencia de cada uno de los tensioactivos ensayados se muestran en la Figura VI.8. En ella se pone de manifiesto que el tensioactivo aniónico (DSS) no ejerce ningún tipo de interacción sobre la fluorescencia del sistema.

Como ya se explicó en anteriores sistemas estudiados, el ligero aumento que experimenta la señal en presencia de micelas no iónicas (TX-100) puede deberse a interacciones hidrofóbicas entre la cadena hidrocarbonada del tensioactivo y la parte menos polar de la molécula de reactivo, ya que el incremento de señal es del mismo orden en el complejo que en su correspondiente blanco, no produciéndose modificación en las longitudes de onda de los máximos.

En este caso, tambien las micelas catiónicas (BCTA, CCP), provocan un considerable aumento de la señal fluorescente debido a interacciones electrostáticas entre estas y el complejo aniónico, así como a otro tipo de interacciones provocadas por el microentorno micelar, siendo este incremento mayor cuando el tensioactivo utilizado es el BCTA. Se observa un ligero desplazamiento de las longitudes de onda de excitación y de emisión, de modo que en la excitación el desplazamiento es batocrómico a 478 nm, mientras que en la emisión se produce un ligero desplazamiento hipsocrómico, alcanzándose un máximo a 600 nm.



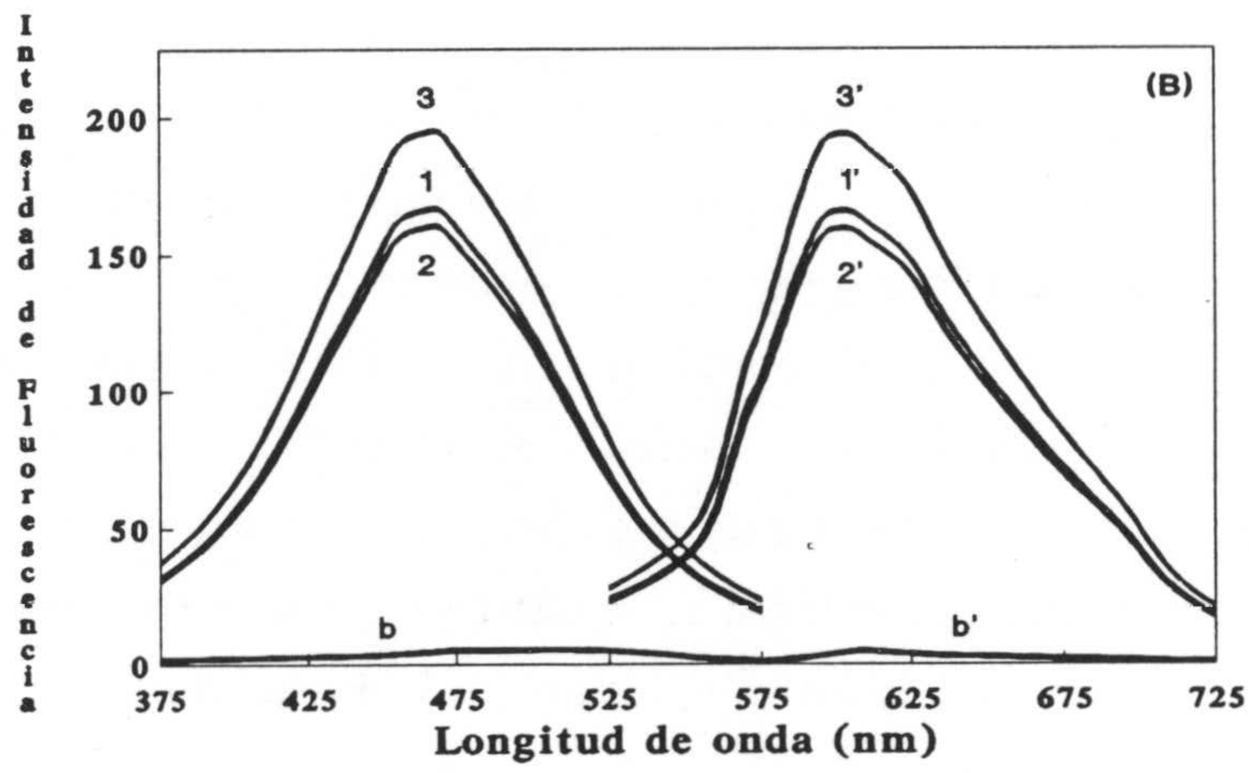


Figura VI.8. Espectros de excitación y de emisión del sistema Zr(IV)-EDTA- RAS: (A) (1,1′) sin tensioactivo, (2,2′) con CP, (3,3′) con BCTA; (B) (1,1′) sin tensioactivo, (2,2′) con DSS, (3,3′) con TX-100. [Zr(IV)] = 10^{-5} M, [RAS] = 3.10^{-5} M, [EDTA] = 0′01 M.

Posteriormente se procede a la optimización de las variables experimentales que influyen en la formación del complejo ternario fluorescente en presencia de micelas de BCTA.

3.2. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

* **Influencia del pH**

Para determinar el posible desplazamiento en la zona de pH donde la formación del complejo es total y la fluorescencia máxima, se prepararon 500 ml de una disolución de concentración 10^{-5} M en Zr(IV), 0'01 M en EDTA, 3.10^{-5} M en RAS y al 0'5 % en BCTA, modificando el pH mediante adición de cantidades variables de NaOH y HCl. Igualmente se preparó un blanco conteniendo todos los reactivos excepto Zr(IV).

Se midió la intensidad de fluorescencia a temperatura ambiente despues de 15 min., utilizando como λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm, siendo las rendijas de excitación y emisión de 3 nm.

Los resultados se recogen en la Tabla VI.12 y se representan en la Figura VI.9, donde tambien se muestra la curva diferencia entre las señales de fluorescencia del complejo y su blanco a los distintos pH ensayados.

El complejo en ausencia de BCTA muestra una intensidad de fluorescencia máxima y constante en la zona de pH comprendida entre 5'3 - 6'3. En presencia de una elevada concentración del surfactante catiónico se observa un desplazamiento del intervalo de pH óptimo para la formación del complejo hacía valores inferiores, seleccionándose un valor de pH comprendido entre 4'7 y 5'5, donde los valores de intensidad de fluorescencia son practicamente idénticos, decreciendo éstos para valores de pH superiores e inferiores.

Para posteriores experiencias se operó a pH 4'7, proporcionado por una disolución reguladora acético/acetato.

Tabla VI.12

Influencia del pH

pH	IFc	IFb
1'0	14'8	24'5
2'0	24'8	23'4
3'0	46'6	23'0
4'0	84'0	12'7
4'5	115'9	8'9
4'7	134'5	6'9
5'0	133'9	7'6
5'3	131'2	6'6
5'5	130'4	6'3
6'0	94'8	7'1
7'0	71'4	6'4
8'0	57'0	7'4
9'0	52'2	7'0

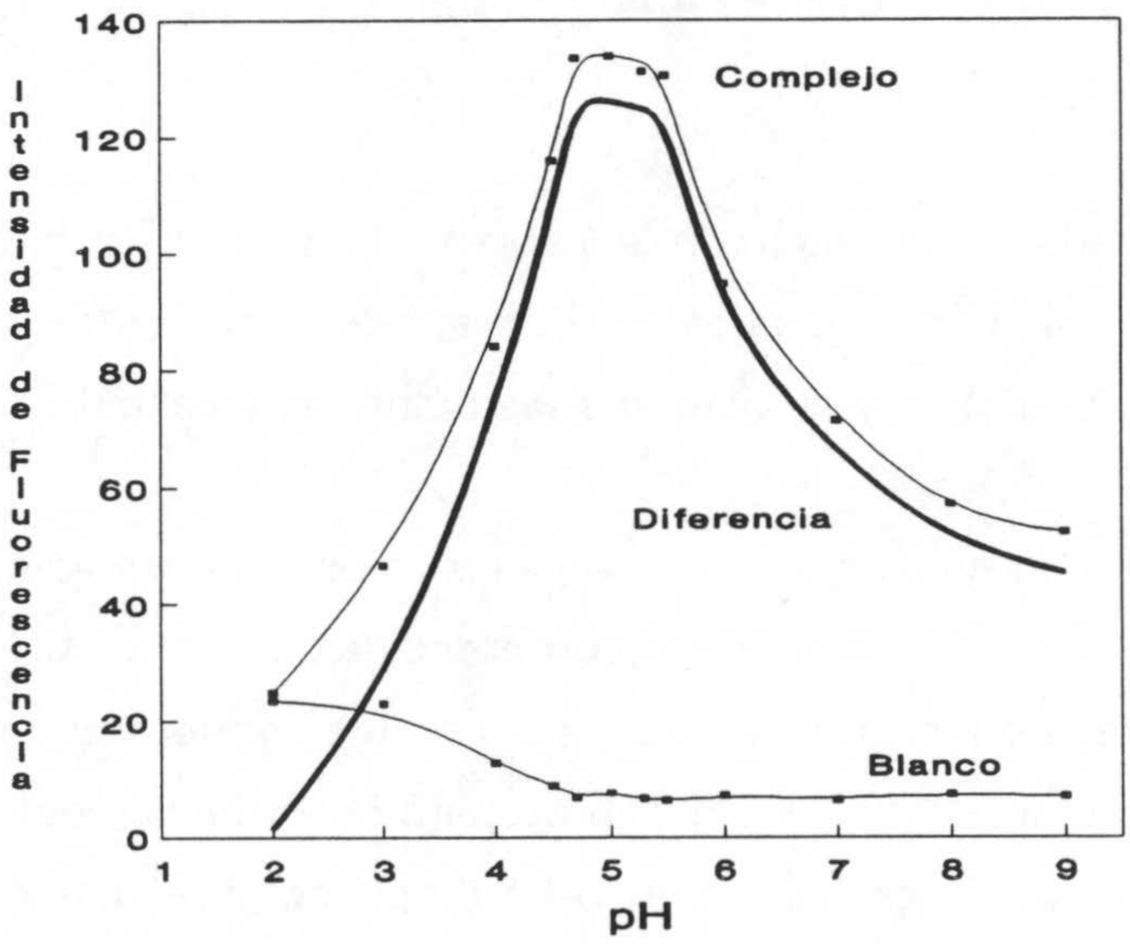


Figura VI.9. Influencia del pH. [Zr(IV)] = [RAS] = 10^{-5} M; [BCTA] = 0'5 %.

* **Influencia de la concentración de disolución Reguladora**

Se prepararon una serie de matraces de 10 ml en los que se adicionó 0'1 ml de Zr(VI) 10^{-3} M, 1'0 ml de disolución de EDTA 0'1 M, volúmenes crecientes de disolución reguladora acético/acetato 1 M de pH 4'7, 1'0 ml de disolución de BCTA al 5%, 0'3 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, completando hasta el volumen final con agua destilada. Se midió la fluorescencia a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 3 nm.

Los resultados se recogen en la Tabla VI.13.

Tabla VI.13

Influencia de la concentración de tampón

V(ml) Tampón	IFc	IFb
0'5	128'8	3'4
1'0	126'3	5'4
2'0	125'6	6'1
3'0	113'9	6'6
4'0	94'5	5'0

De esta experiencia se seleccionó como concentración óptima de disolución reguladora la correspondiente a la adición de 2'0 ml, no provocando alteración en la señal fluorescente.

* **Influencia del Orden de Adición**

Una vez comprobado que el orden de adición afecta significativamente a la rapidez con la que se desarrolla la fluorescencia del complejo ternario, corroboramos si este efecto se observa tambien en presencia del tensioactivo catiónico. Para ello se prepararon una serie de matraces de 10 ml que contenían una concentración de Zr(IV) de 10^{-5} M, 0'01 M en EDTA, 3'0 ml de disolución reguladora de pH 4'7 y en los que se modificó el orden de adición de la forma indicada en la Tabla VI.14.

Las medidas se realizaron a temperatura ambiente despues de 15 min con λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 3 nm.

Tabla VI.14

Influencia del orden de adición de los reactivos

Orden de Adición	IFc	IFb	IF
1. Zr(IV) + EDTA + Tampón + BCTA + RAS	130'4	6'0	124'4
2. Zr(IV) + RAS + EDTA + Tampón + BCTA	96'6	5'9	90'7
3. Zr(IV) + Tampón + EDTA + RAS + BCTA	67'5	6'4	61'1
4. Zr(IV) + EDTA + BCTA + Tampón + RAS	130'1	6'3	123'8
5. Zr(IV) + BCTA + Tampón + EDTA + RAS	63'8	6'3	57'5
6. Zr(IV) + EDTA + Tampón + RAS + BCTA	125'6	5'9	119'7

En medio micelar catiónico tambien se poñe de manifiesto que el orden de adición es una variable crítica en la optimización, siendo igualmente necesaria la formación previa del complejo binario Zr(IV)-EDTA antes de la adición de los demás reactivos para que la formación del complejo ternario fluorescente sea lo más rápida posible. En el caso de los demás reactivos, parece que su adición no afecta

considerablemente, seleccionándose por consiguiente, para posteriores experiencias el orden de adición:

Zr(IV) + EDTA + Tampón + BCTA + RAS

* **Estabilidad del sistema Zr(IV)-EDTA-RAS en presencia de BCTA**

Se prepararon 50 ml de una disolución cuyas concentraciones finales fueron: 10^{-5} M en Zr(IV), 0'01 M en EDTA, 0'5% en BCTA y 3.10^{-5} M en RAS, adicionando 10'0 ml de disolución reguladora de pH 4'7 en el orden seleccionado anteriormente.

Se midió la fluorescencia a temperatura ambiente, cambiando en cada medida el contenido de la cubeta para evitar posibles efectos de fotodescomposición, utilizando una λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 3 nm. Los resultados se muestran en la Tabla VI.15 y se representan en la Figura VI.10.

La señal máxima de fluorescencia es alcazada a partir de un tiempo de espera mínimo de 20 min, a partir del cual se consigue la completa formación del complejo ternario fluorescente en presencia del tensioactivo catiónico, permaneciendo estable al menos durante 5 horas.

Tabla IV.5

Estabilidad del sistema Zr(IV)-EDTA-RAS en presencia de BCTA

Tiempo (min)	IFc	IFb
0	40'3	5'0
5	101'9	4'8
10	114'9	5'6
15	126'2	7'6
20	135'7	5'4
30	136'9	4'1
45	134'4	4'8
60	137'8	5'1
105	137'2	6'1
120	136'4	7'7
180	137'6	5'7
240	136'8	5'8
300	136'5	4'8

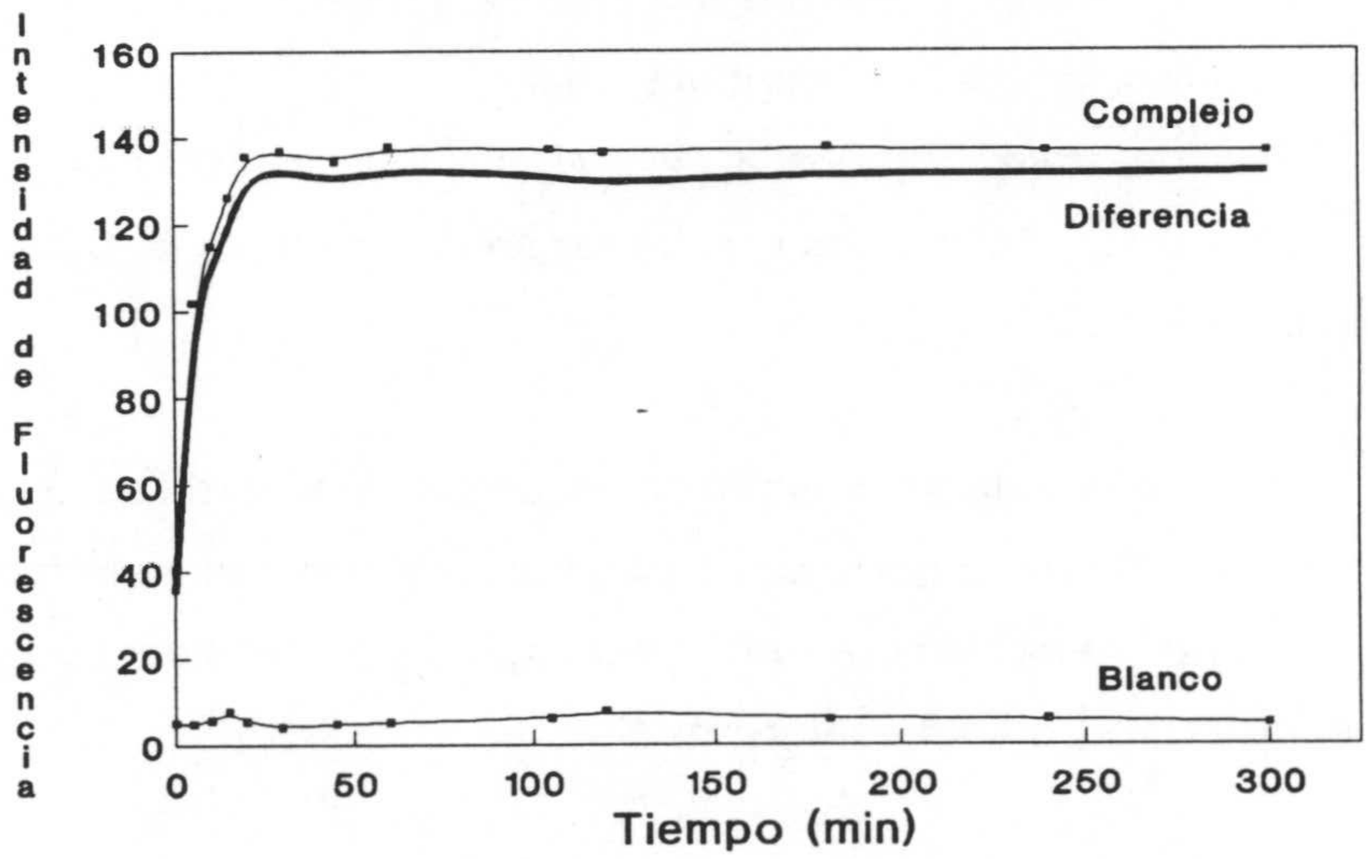


Figura VI.10. Estabilidad del sistema Zr(IV)-EDTA-RAS en medio micelar. [Zr(IV)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 0'01 M, [BCTA] = 0'5 %, pH = 4'7

* **Influencia de la Temperatura**

El estudio de la temperatura se determinó preparando una disolución que, en un volumen final de 50 ml contenía una concentración de Zr(IV) de 10^{-5} M y de EDTA 0'01 M, 10 ml de tampón acetato de pH 4'7, 5 ml de BCTA al 5 % y una concentración de RAS de 3.10^{-5} M. El matraz se introdujo en baño termostático y una vez alcanzada la temperatura deseada, se medía la fluorescencia del sistema desde 15 a 50°C, cambiando el contenido de la cubeta para cada medida.

En la Tabla VI.16 se reflejan los resultados, que quedan representados en la Figura VI.11. Se comprueba que a temperaturas superiores a 30°C, se produce una leve disminución de la señal flurescente del complejo, siendo por tanto conveniente termostatar el compartimento de muestra a 25'0 ± 0'5 °C, temperatura próxima a la ambiental.

Tabla VI.16

Influencia de la Temperatura

Tª (°C)	IFc	IFb
15	122'2	5'7
20	133'5	4'8
25	135'4	5'4
30	136'5	6'1
35	125'6	4'6
40	123'7	7'0
45	118'1	5'8
50	112'8	4'3

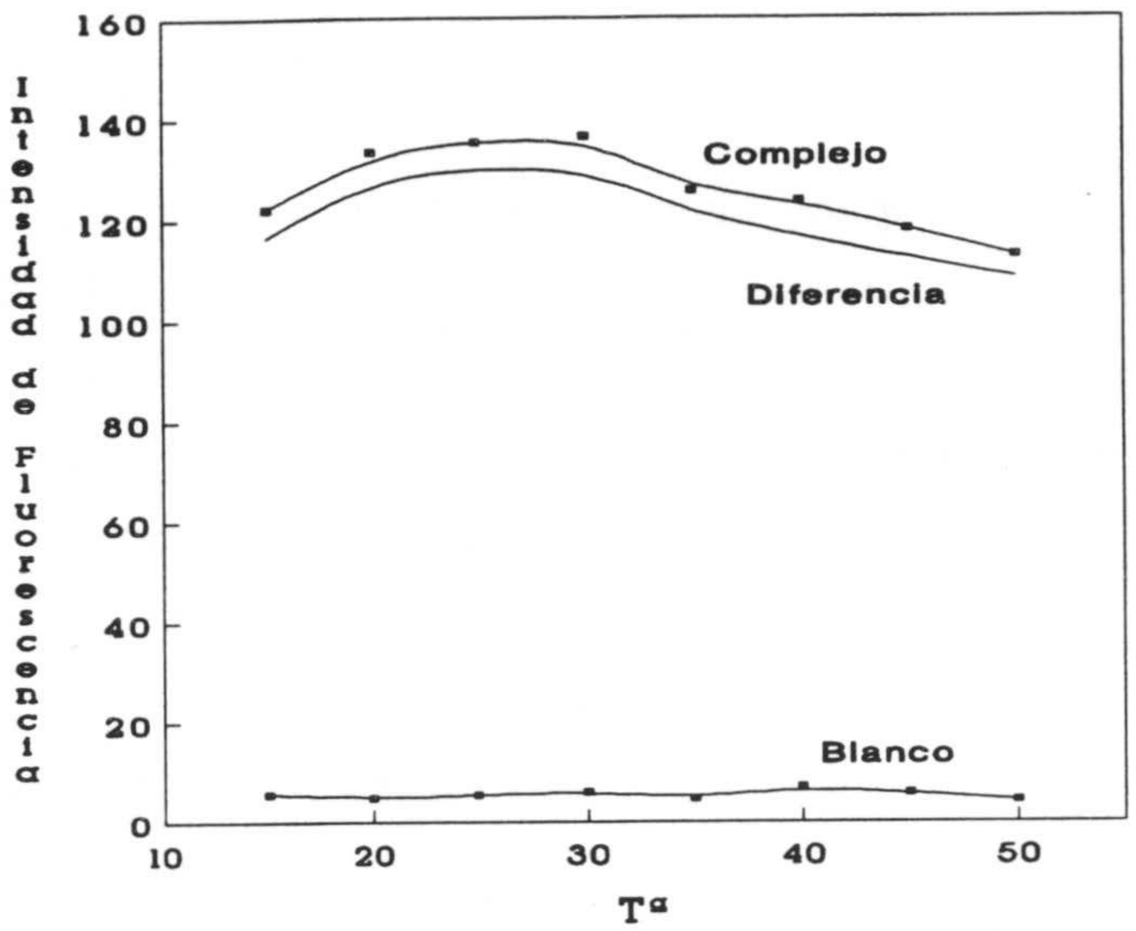


Figura VI.11. Influencia de la Temperatura. [Zr(IV)]= 10^{-5} M, [EDTA]= 0'01 M, [BCTA]= 0'5 %, pH= 4'7

* <u>Influencia de la concentración de BCTA</u>

La selección de la concentración del tensioactivo óptima para el establecimiento fluorimétrico se llevó a cabo adicionando, en matraces de 10 ml y en este orden: 0'1 ml de disolución de Zr(IV) de concentración 10^{-5} M, 0'1 ml de EDTA 0'1 M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetatode pH 4'7, V ml de BCTA al 5 % y 0'3 ml de disolución de RAS 10^{-3} M. Tras enrasar se midió la fluorescencia del complejo y su correspondiente blanco a 600 nm con excitación 478 nm y rendijas de excitación y emisión de 3 nm, esperando 20 min despues de la preparación de los matraces.

Los resultados se muestran en la Tabla VI.17 y se representan en la Figura VI.12 en la que tambien se muestra la curva diferencia obtenida por sustracción

del blanco a la señal del complejo.

Tabla VI.17

Influencia de la concentración de BCTA

[BCTA], %	IFc	IFb
0'00	55'3	3'4
0'03	77'1	5'4
0'05	106'4	3'6
0'10	121'1	4'1
0'20	127'3	4'9
0'30	129'1	5'7
0'40	134'0	5'3
0'50	137'1	5'8
0'60	139'9	5'3
0'70	138'1	5'0
1'00	139'2	5'4
1'30	135'9	5'8

De la experiencia se deduce que:

- El máximo aumento de la fluorescencia del sistema Zr(IV)-EDTA-Rojo de Alizarina S se produce una vez sobrepasada considerablemente la concentración crítica micelar (c.m.c), de modo que la sensibilización de la fluorescencia del sistema es debida a un proceso micelar y no a las interacciones electrostáticas con los monómeros catiónicos.

- La fluorescencia del blanco apenas sufre modificación con la concentración de BCTA.

- Una concentración de BCTA del 0'6 % se selecciona como adecuada para obtener una intensidad de fluorescencia máxima y constante.

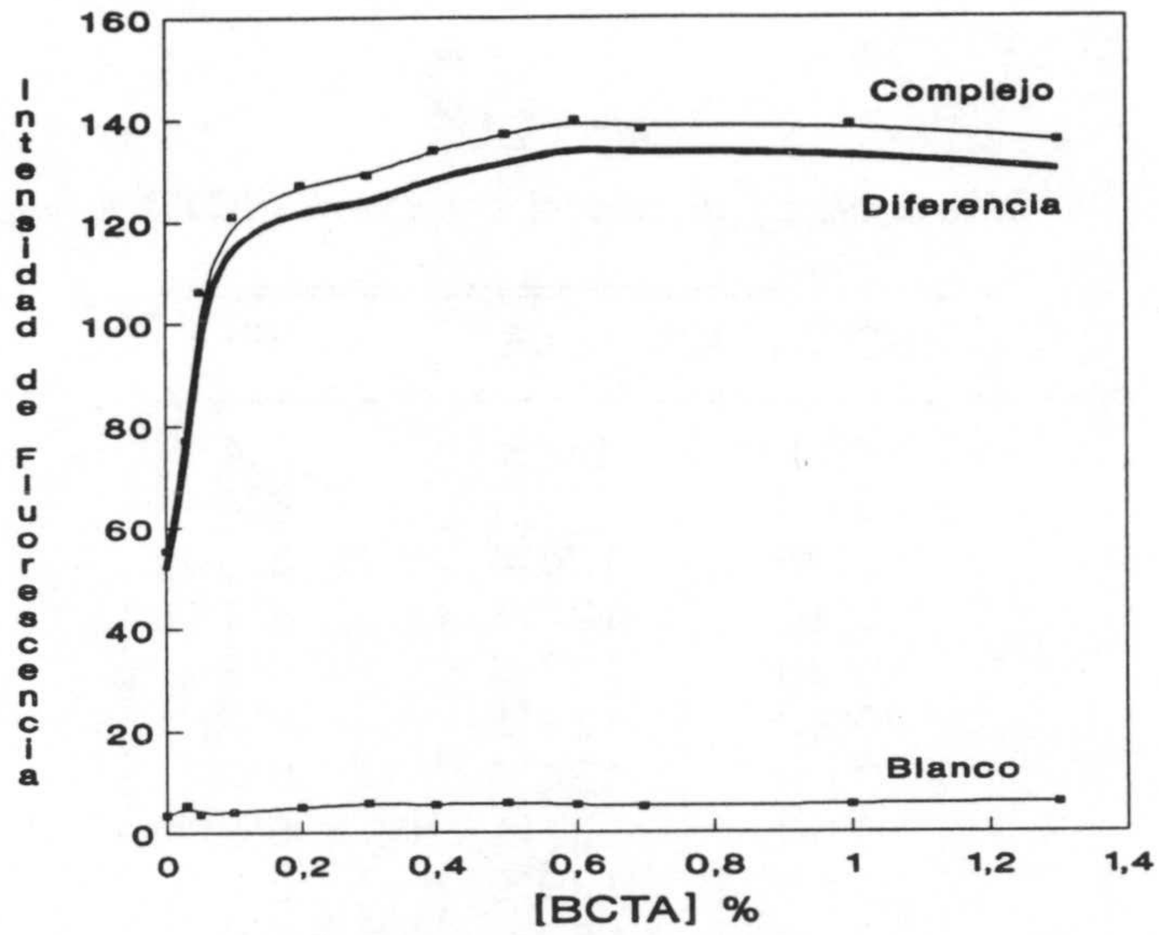


Figura VI.12. Influencia de la concentración de BCTA. [Zr(IV)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 0'01 M, pH = 4'7

* <u>Influencia de la concentración de EDTA en presencia de BCTA</u>

Para seleccionar la concentración óptima del ligando EDTA a la que el complejo ternario muestra su máxima formación en presencia del tensioactivo catiónico, se preparó una serie de matraces de 10 ml que contenían, en el orden de adición seleccionado: 0'1 ml de Zr(IV) de concentración 10^{-3} M, volúmenes crecientes de disolución de EDTA de diferentes concentraciones, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de BCTA al 5 % y volúmenes crecientes de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. Los correspondientes blancos se prepararon de igual forma pero en ausencia de Zr(IV).

Las medidas se registraron a los 20 min. de la preparación, a temperatura ambiente, con λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 3 nm. Los resultados se reflejan en la Tabla VI.18 y se representan en la Figura VI.13.

Tabla VI.18

Influencia de la concentración de EDTA

[EDTA], M	IFc	IFb
0	7'2	3'0
2.10^{-6}	32'3	4'3
6.10^{-6}	82'6	4'2
8.10^{-6}	111'9	4'4
1.10^{-5}	132'5	5'8
5.10^{-5}	141'1	5'4
1.10^{-4}	138'7	5'7
5.10^{-4}	139'1	3'7
1.10^{-3}	138'3	3'2
5.10^{-3}	136'1	- 2'6
1.10^{-2}	137'8	2'8
5.10^{-2}	135'2	3'0

Se comprueba que, al igual que sucedía en ausencia de medio micelar, una elevada concentración de EDTA no altera la señal fluorescente máxima que es conseguida a partir de una concentración de EDTA 5.10^{-5} M.

Por ello resulta ventajoso seleccionar una concentración del ligando en exceso con respecto a la formación del complejo ternario fluorescente ya que esto proporciona una mejora en la selectividad de la determinación al actuar no solo como ligando sino tambien como enmascarante.

La concentración de EDTA seleccionada para el establecimiento de la determinación de Zr(IV) fue de 0'01 M.

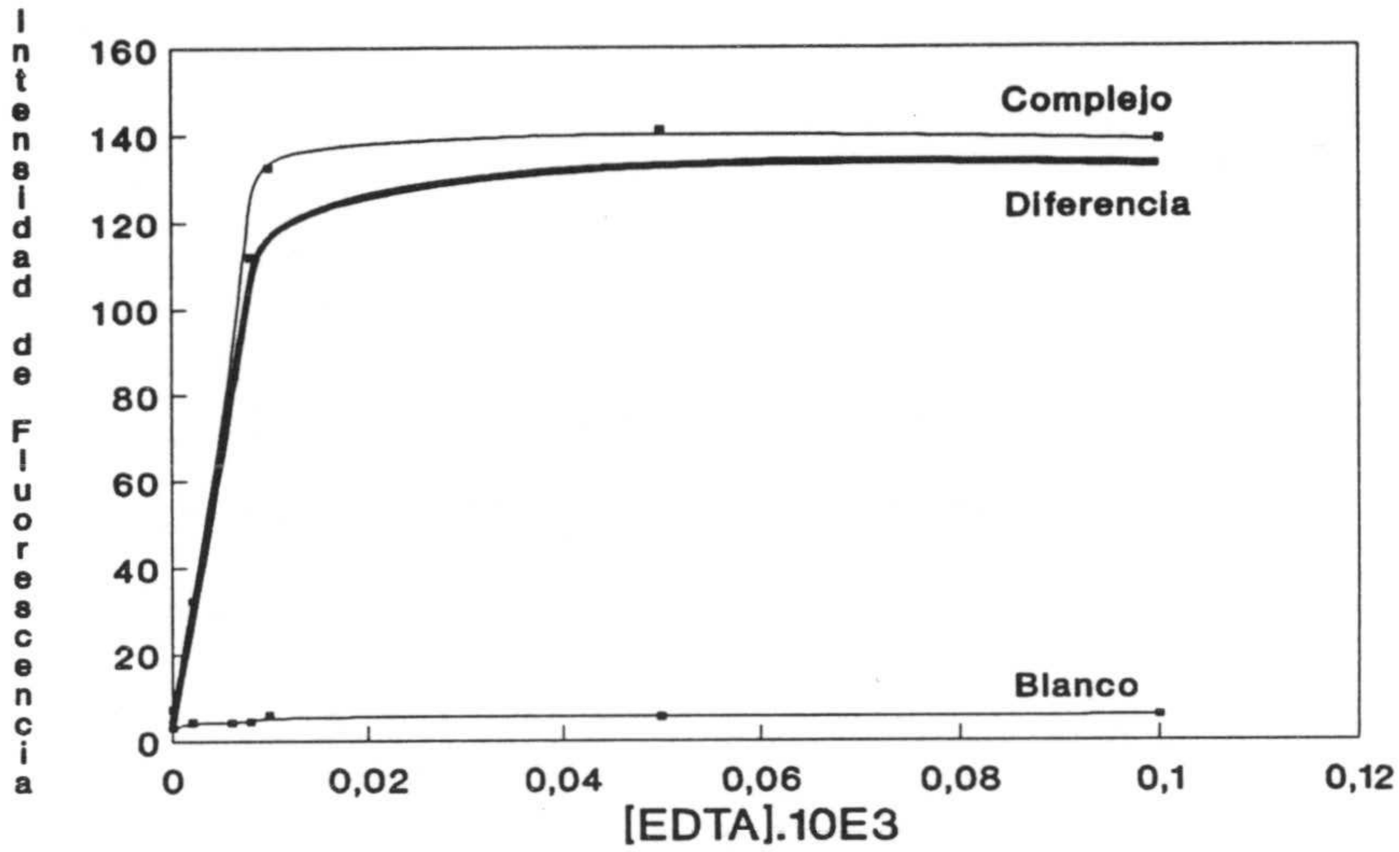


Figura VI.13. Influencia de la concentración del ligando EDTA. [Zr(IV)]= 10^{-5} M, [RAS]= 3.10^{-5} M, [BCTA]= 0'6%, pH= 4'7.

* <u>Influencia de la concentración del reactivo RAS</u>

El estudio de la concentración del reactivo sobre la fluorescencia del complejo ternario en medio catiónico micelar se efectuó midiendo la señal de una serie de matraces de 10 ml que contenían: 0'1 ml de Zr(IV) 10^{-3} M, 1'0 ml de disolución de EDTA 0'1 M, 2'0 ml de disolución reguladora de pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y cantidades crecientes de una disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. Igualmente se prepararon los correspondientes blancos.

Los resultados de las medidas de intensidad de fluorescencia a 25°C, transcurridos 20 min , a las correspondientes longitudes de onda y utilizando

rendijas de excitación y emisión de 3 nm, del complejo y su respectivo blanco se reflejan en la Tabla VI.19 y se representan en la Figura VI.14.

Tabla VI.19

Influencia de la concentración de RAS

[RAS].10^5 M	IFc	IFb
0'2	37'6	0'4
0'4	69'2	3'9
0'6	91'3	3'2
0'8	105'2	3'2
1'0	121'5	3'7
1'5	137'7	3'5
2'0	142'4	4'4
2'5	140'1	5'0
3'0	137'3	5'1
4'0	127'3	4'7

De los resultados se deduce que la intensidad de fluorescencia aumenta proporcionalmente a la concentración del reactivo Rojo de Alizarina S hasta una concentración de $1'5.10^{-5}$ M, valor a partir del cual la señal permanece máxima y constante, produciéndose una leve disminución sobrepasada una concentración de $4'0.10^{-5}$ M.

Se selcciona por lo tanto una concentración de reactivo comprendida en el tramo anteriormente mencionado e igual a $2'0.10^{-5}$ M, de modo que cuando la determinación se realiza en presencia de BCTA, la concentración de reactivo requerida para el desarrollo de la máxima fluorescencia es menor que la necesitada en ausencia del medio micelar.

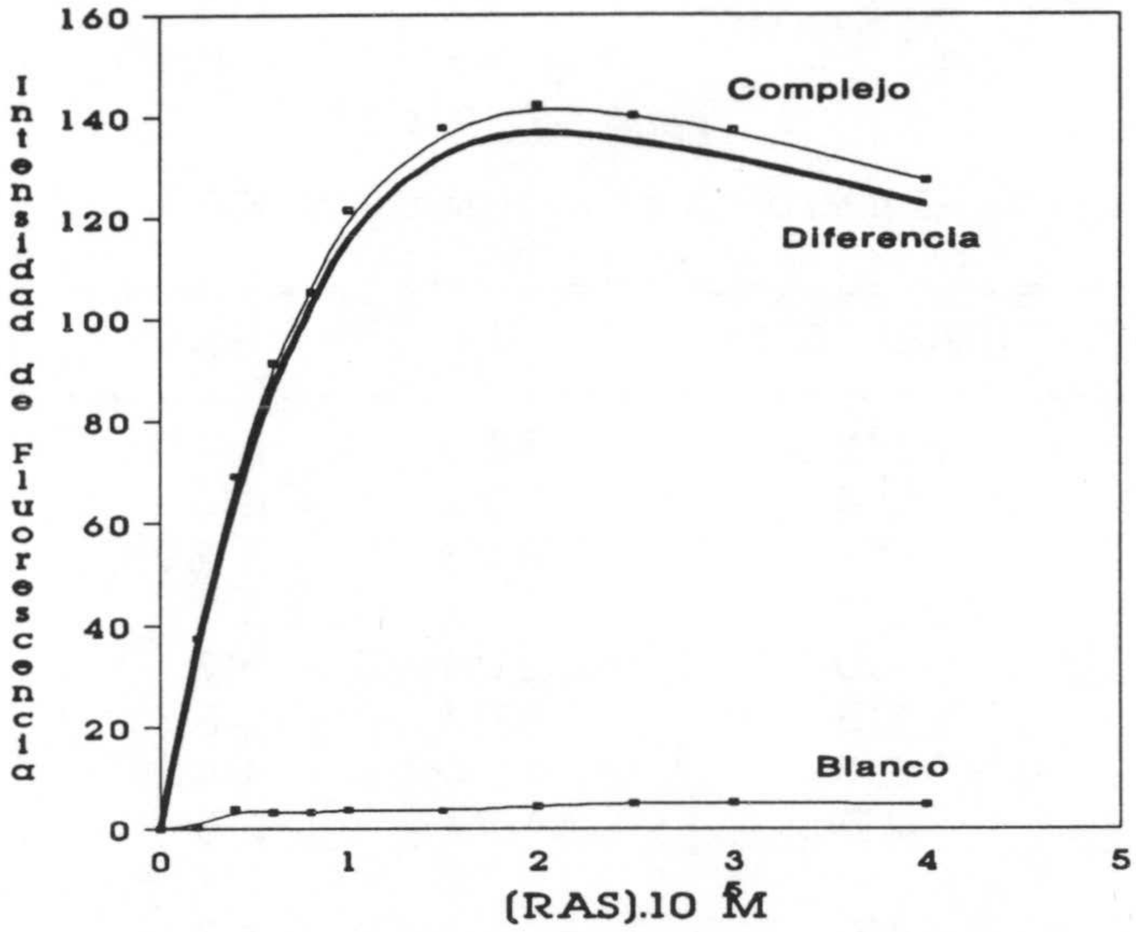


Figura VI.14. Influencia de la concentración de RAS. [Zr(IV)] = 1.10^{-5} M. [EDTA] = 0'01 M, [BCTA] = 0'6 %, pH = 4'7.

* <u>Resumen de la optimización de variables experimentales</u>

En la Tabla VI.20 se resumen los valores óptimos de las variables que influyen en la formación del complejo ternario fluorescente Zr(IV)-EDTA-RAS en presencia de BCTA.

Tabla VI.20

Optimización de variables para el sistema Zr(IV)-EDTA-RAS

Variable	Valor óptimo
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	478/600 nm
pH	4'7
[Dis. reguladora]	AcH/AcNa 0'2 M, pH 4'7
Tª	No afecta entre 15-30°C
Tiempo de espera	20 min
Estabilidad	>5 h.
Orden de adición	Zr(IV) + EDTA + Tampón + BCTA + RAS
[RAS]	$2'0.10^{-5}$ M
[BCTA]	0'6 %
[EDTA]	0'01 M

3.3. ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO Zr(IV)-EDTA-RAS EN MEDIO CATIÓNICO MICELAR

Con objeto de comprobar si se produce alguna modificación en la estequiometría del complejo ternario cuando la determinación se realiza en presencia de micelas de BCTA, se aplicó el método de Yoe-Jones (**56**), estudiando la relación molar de los componentes dos a dos, en presencia de un exceso del tercero de ellos.

A) Relación EDTA/Zr(IV)

Se introducen en matraces de 10 ml una cantidad constante de Zr(IV) de modo que su concentración final es de 10^{-5} M, cantidades crecientes de disolución de EDTA 10^{-3} M, 2'0 ml de tampón acético/acetatode pH 4'7, 1'2 ml de BCTA al 5 % y 0'2 ml de disolución de RAS 10^{-3} M. De este modo se establecen una serie de relaciones molares EDTA/Zr(IV).

Se miden las señales fluorescentes despues de 20 min, a 25°C, con λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 3 nm. La señal diferencia entre el complejo y su respectivo blanco se muestran en la Tabla VI.21 y se representan en la Figura VI.15.

Tabla VI.21

Estequiometría del complejo EDTA-Zr(IV)

([Zr(IV)] = 10^{-5}M, [RAS] = 2.10^{-5} M, [BCTA] = 0'6%)

[EDTA]/[Zr(IV)]	IF
0'2	31'0
0'4	54'3
0'6	78'9
0'8	107'5
1'0	124'8
1'5	135'4
2'0	133'4
2'5	136'0
3'0	137'0

La relación estequiométrica encontrada para EDTA:Zr(IV) es 1:1.

B) Relación RAS/EDTA

Se introducen en matraces de 10 ml una cantidad constante de Zr(IV) de modo que su concentración final es de 10^{-5} M, 1'0 ml de EDTA 10^{-4} M, 2'0 ml de tampón acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de BCTA al 5% y volúmenes crecientes de disolución de RAS 10^{-4} M, enrasando con agua destilada. Se establecen así una serie de relaciones molares RAS/EDTA.

Se miden las señales fluorescentes despues de 20 min, a 25°C, con λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 3 nm. La señal

diferencia entre el complejo y su respectivo blanco se muestran en la Tabla VI.22 y se representan en la Figura VI.16, comprobándose que la relación molar entre el ligando EDTA y el reactivo RAS es 1:1.

Tabla VI.22

Estequiometría del complejo RAS-EDTA

([Zr(IV)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 10^{-5} M, [BCTA] = 0'6%)

[RAS]/[EDTA]	IF
0'2	28'1
0'4	50'0
0'6	77'4
0'8	105'2
1'0	127'3
1'2	139'0
1'5	142'3
1'8	146'3
2'0	150'2
2'2	151'9
2'4	152'3

C) Relación RAS/Zr(IV)

Se introducen en matraces de 10 ml una concentración de Zr(IV) de 10^{-5} M, 1'0 ml de EDTA 0'1 M, 2'0 ml de tampón acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5% y volúmenes crecientes de disolución de RAS 10^{-4} M, se enrasan hasta el volumen final con agua destilada quedando establecidas una serie de relaciones molares RAS/Zr(IV).

Se miden la fluorescencia a los 20 min. de la preparación a 25°C, con λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 3 nm. Los resultados expresados como diferencia entre el complejo y su respectivo blanco

se muestran en la Tabla VI.23 y se representan en la Figura VI.17.

Tabla VI.23

Estequiometría del complejo RAS-Zr(IV)

([Zr(IV)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 0'01 M, [BCTA] = 0'6%)

[RAS]/[Zr(IV)]	IF
0'2	37'1
0'4	65'3
0'6	89'0
0'8	110'9
1'0	124'8
1'5	134'7
2'0	138'0
2'5	135'6
3'0	133'1

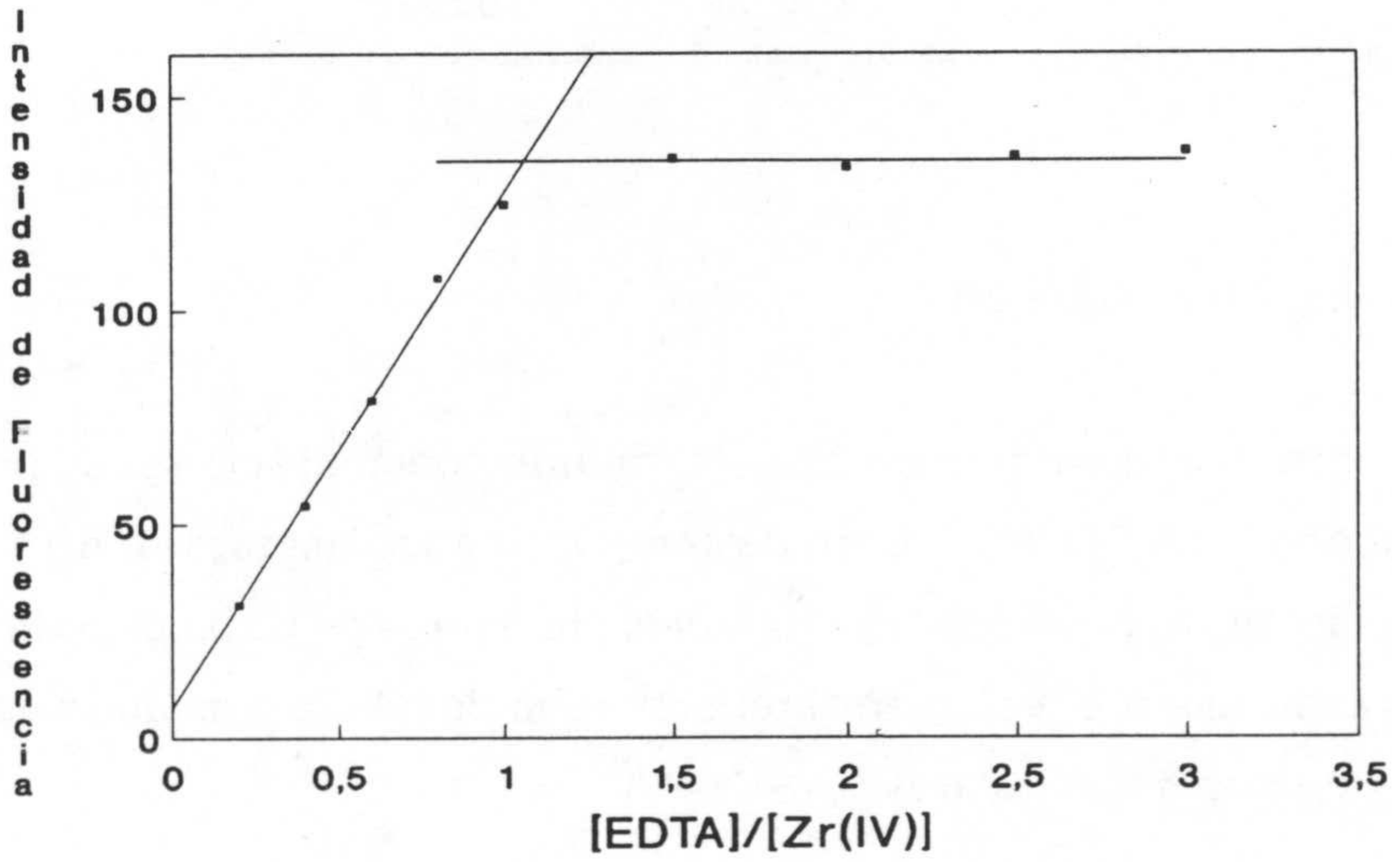


Figura VI.15. Método de Yoe y Jones. [Zr(IV)] = 10^{-5}M, [RAS] = 2.10^{-5} M, [BCTA] = 0'6%, pH = 4'7

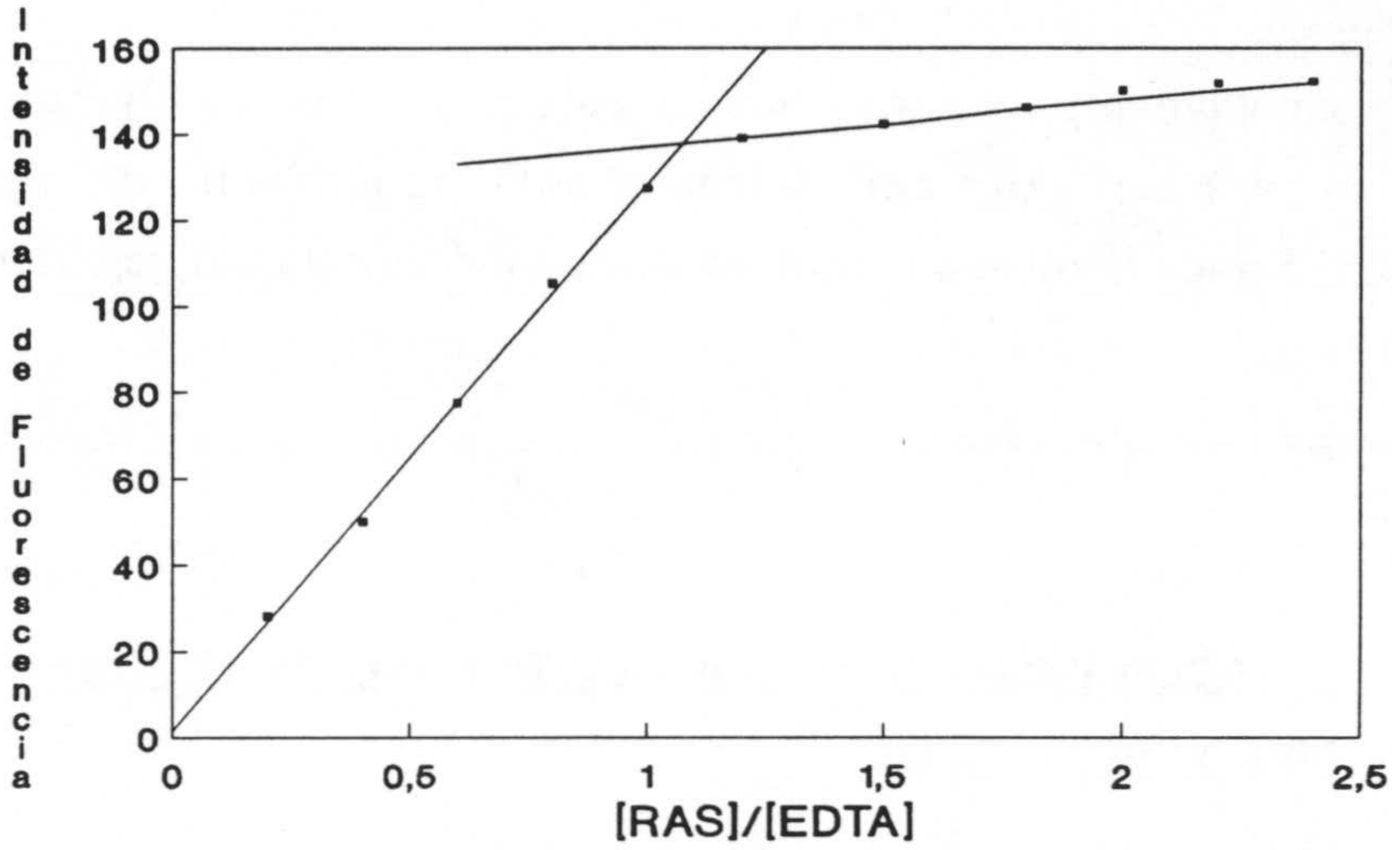


Figura VI.16. Método de Yoe y Jones. [Zr(IV)] = 10^{-5}M, [EDTA] = 10^{-5} M, [BCTA] = 0'6%, pH = 4'7

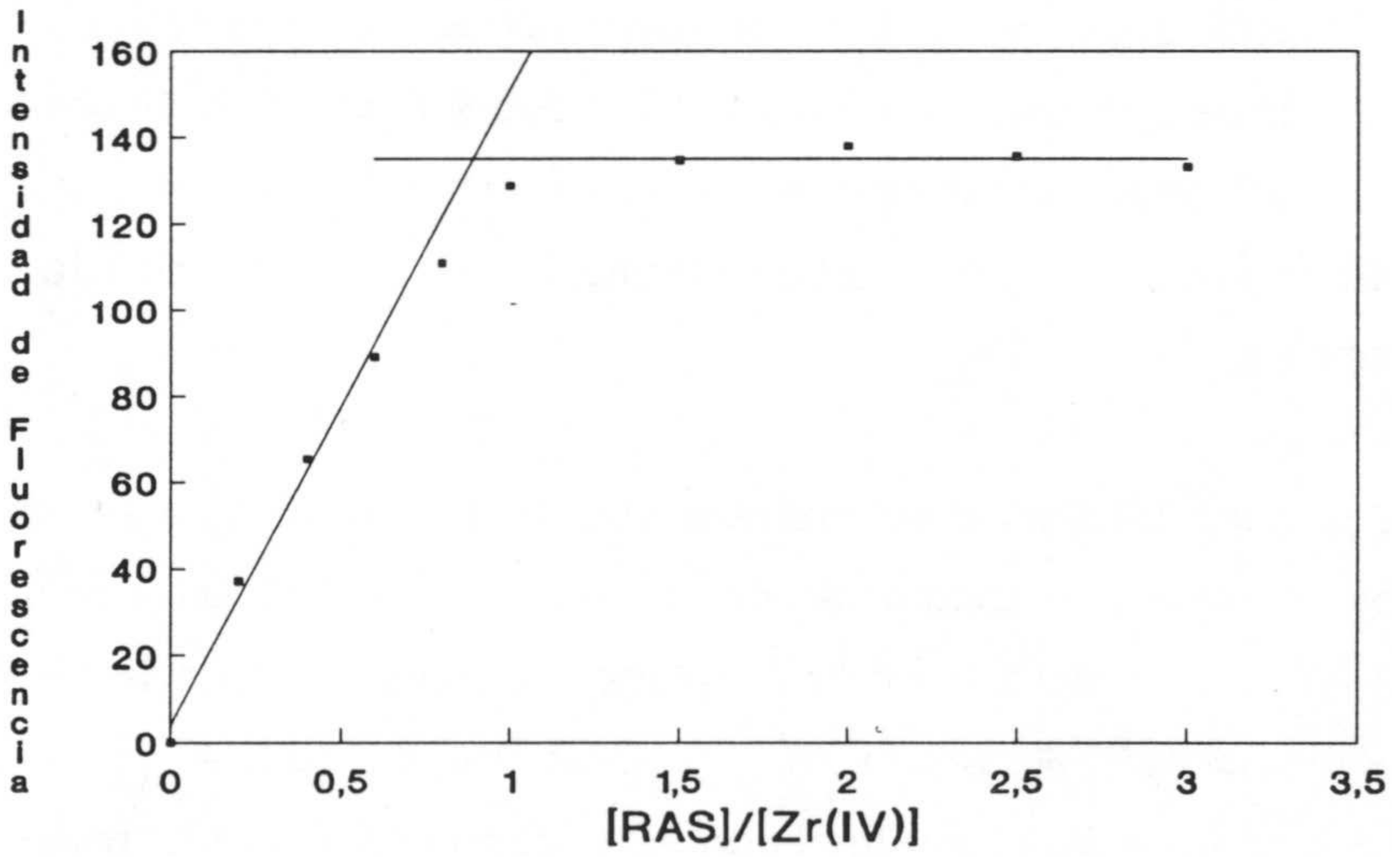


Figura VI.17. Método de Yoe y Jones. [Zr(IV)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 0'01 M, [BCTA] = 0'6%, pH = 4'7

Se pone de manifiesto que la relación molar entre Zr(IV) y el reactivo RAS en presencia de un exceso de EDTA es 1:1.

Se concluye por lo tanto que la estequiometría encontrada en medio catiónico micelar no varía con respecto a la determinada en ausencia del tensioactivo, siendo la relación entre los componentes del complejo ternario 1:1:1 (Zr(IV):EDTA:RAS).

4. ESTABLECIMIENTO DE LA DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE Zr(IV) EN PRESENCIA DE BCTA

4.1. INTERVALO LINEAL. RECTAS DE CALIBRADO

Con objeto de establecer un rango de concentraciones en el que la intensidad de fluorescencia varie de forma lineal, se procedió al establecimiento de del rango lineal de aplicación del método propuesto. Para ello se realizó un estudio de la influencia de la concentración de Zr(IV) sobre la señal de fluorescencia a las condiciones óptimas establecidas, observándo a partir de qué nivel de concentración parecía producirse curvatura en el ajuste de los datos experimentales.

Se prepara una serie de matraces de 10 ml en los que se introducen de volúmenes crecientes de disolución de Zr(IV) de 10 ppm, 1'0 ml de disolución de EDTA 0'1 M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 0'5 % y 2'0 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. De igual modo se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Se registraron las señales analíticas a 25°C, esperando 20 min desde la preparación de los matraces, siendo las condiciones instrumentales utilizadas: rendijas de excitación y de emisión de 3 nm, λ_{ex} = 478 nm y la λ_{em} = 600 nm. Los resultados se muestran en la Tabla VI.24 y se representan en la Figura VI.18.

Tabla VI.24

Comprobación del intervalo lineal

[Zr(IV)], ppm	IF
0'0	7'7
0'2	38'0
0'4	73'5
0'6	99'4
0'8	137'8
1'0	168'2
1'2	190'7
1'4	205'0

En la gráfica puede observarse un tramo lineal que se extiende hasta el intervalo comprendido entre 1'0 y 1'2 ppm. Una vez observada la desviación de la linealidad, se llevó a cabo el Análisis de la Varianza de la regresión con los datos del calibrado incluido el valor de 1'2 ppm, que es el primer punto experimental en el que existe duda de su pertenencia al tramo lineal. Se aplicó el *Test del Fallo de Ajuste* para evaluar la adecuación del modelo de regresión lineal a los puntos experimentales.

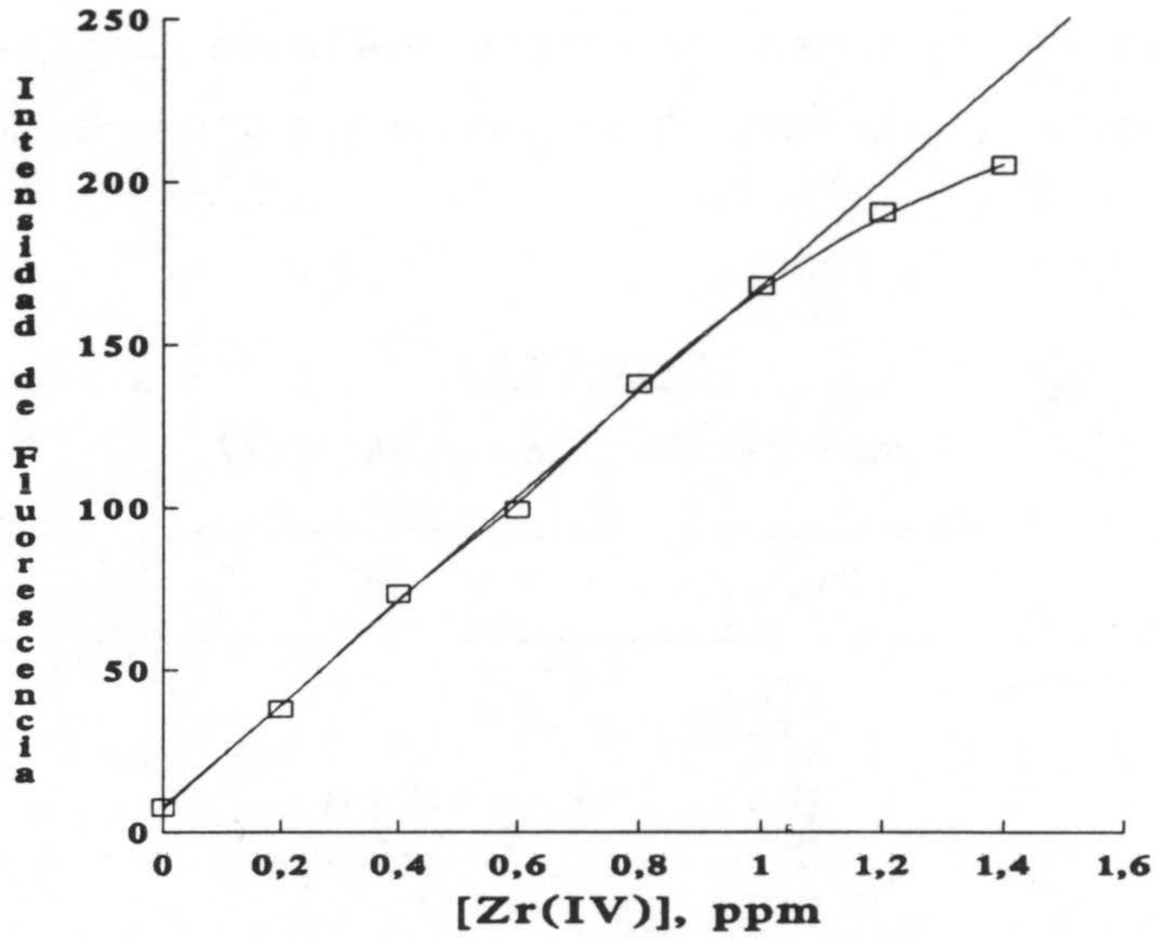


Figura VI.18. Establecimiento del intervalo lineal

Los resultados de la medida de las tres réplicas realizadas para cada valor de concentración se muestran en la Tabla VI.25.

Tabla VI.25

Datos para la evaluación del intervalo lineal mediante el ANOVA

[Zr(IV)], ppm	IF		
0'0	7'7	8'0	6'7
0'2	38'0	38'2	42'2
0'4	73'5	69'8	71'5
0'6	99'4	104'0	100'9
0'8	137'8	130'2	134'2
1'0	168'2	168'8	163'6
1'2	190'7	188'6	191'5

Mediante la aplicación del ANOVA se obtiene un valor del estadístico F_{cal} = 3'56. Para comprobar si existe curvatura se compara con el valor tabulado (F_{tab}(0'05, 5, 14) = 2'96). En este caso como $F_{cal} > F_{tab}$ (P= 2'76 %) se pone de manifiesto la desviación del los datos experimentales del modelo lineal.

Eliminando el valor de concentración de 1'2 ppm, se volvió a realizar el ANOVA. En este caso el *Test del Fallo de Ajuste* da como resultados: F_{cal} = 0'32, F_{tab}(0'05, 4, 12) = 3'26, de modo que la conclusión del test cambia, obteniéndose por tanto un buen ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal (P= 85'8 %).

Dado el amplio rango lineal, se establecen dos rectas de calibrado en distintas condiciones de sensibilidad instrumental.

A) ***Rango entre 0'2 y 1'0 ppm***

La recta de calibrado correspondiente a la parte superior del tramo lineal se obtiene preparando una serie de matraces de 10 ml que contienen: de 0'2 a 1'0 ml de disolución de Zr(IV) de 10 ppm, 1'0 ml de disolución de EDTA 0'1 M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y 2'0 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada.

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en las condiciones experimentales expuestas anteriormente y las correspondientes intensidades de fluorescencia incluido el blanco como un valor más, se han relacionado anteriormente en la Tabla VI.25 y se representan en la Figura VI.19.

El ajuste de esta recta por mínimos cuadrados considerando el blanco como un valor más proporciona los datos que se muestran en la Tabla VI.26.

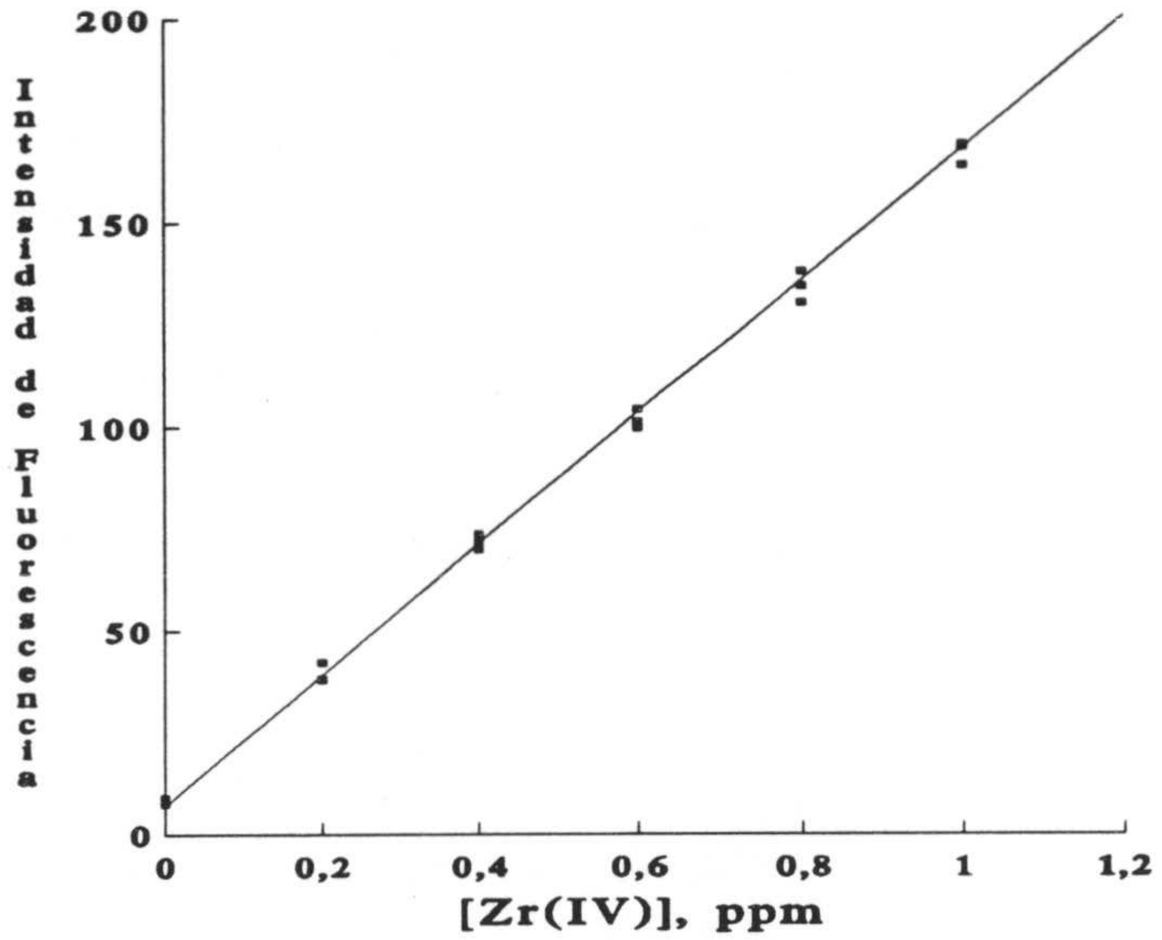


Figura VI.19. Recta de calibrado (0'2-1'0 ppm). Rendijas de excitación y emisión 3 nm.

Tabla VI.26

Datos estadísticos de la recta de calibrado

Ordenada en el origen (a) = 7'49

Desviación estándar (s_a) = 0'953 DER (a) = 12'7 %

Pendiente (b) = 158'66

Desviación estándar (s_b) = 1'573 DER (b) = 0'99 %

Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$) = 2'279

Coef. de correlación (r) = 0'9992

Coef. de determinación (r^2) = 99'84 %

g = $4'4.10^{-4}$

Fallo de Ajuste (P= 85'8 %)

B) ***Rango entre 5 y 50 ppb***

Se preparó una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron: de 0'05 a 0'5 ml de disolución de Zr(IV) de 1 ppm, 1'0 ml de disolución de EDTA 0'1 M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetatode pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y 2'0 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada.

Se realizaron tres réplicas para cada valor de concentración, así como del blanco. Las medidas fueron realizadas termostatando el compartimento de cubetas a 25 °C, a las mismas condiciones operatorias del apartado anterior, utilizando rendijas de excitación y de emisión de 10 nm.

Los resultados se expresan en la Tabla VI.27 y se representan en la Figura VI.20.

Tabla VI.27

Recta de calibrado

[Zr(IV)], ppb	IF		
0	27'2	26'1	26'4
5	33'3	35'2	34'2
10	41'0	40'3	41'1
20	56'0	56'6	57'5
30	69'0	70'5	70'9
40	84'8	86'2	85'0
50	101'2	100'6	99'0

El ajuste de la recta por mínimos cuadrados, incluyendo el blanco como un valor más, proporciona la información que se recoge en la Tabla VI.28.

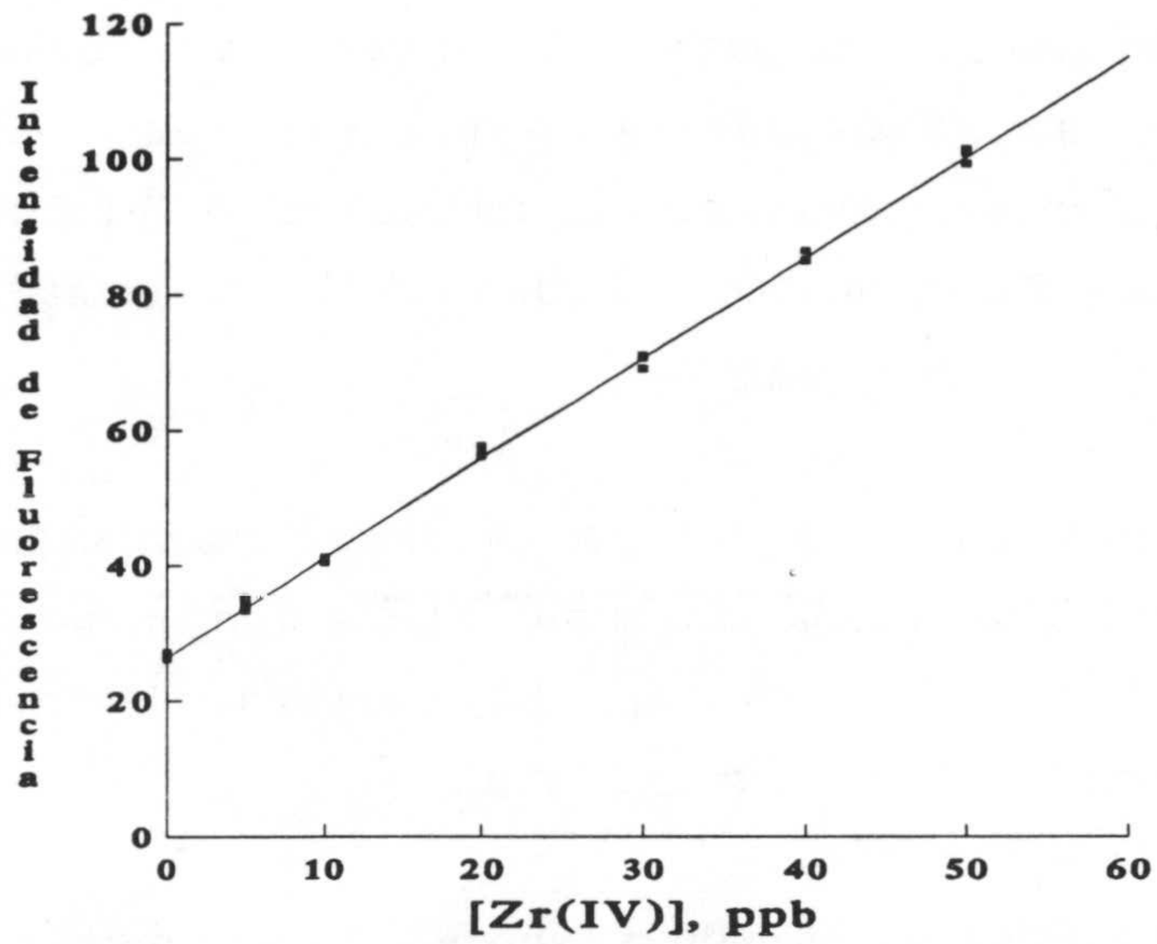


Figura VI.20. Recta de calibrado (5-50 ppb). Rendijas de excitación y emisión 10 nm.

Tabla VI.28

Datos estadísticos de la recta de calibrado

Ordenada en el origen (a) = 26'60

Desviación estándar (a) = 0'295 DER(a) = 1'11 %

Pendiente (b) = 1'470

Desviación estándar (b) = 0'011 DER (b) = 0'72 %

Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$) = 0'835

Coef. de correlación (r) = 0'9995

Coef. de determinación (r^2) = 99'90 %

g = $2'3.10^{-4}$

Fallo de Ajuste (P= 44'5 %)

En este caso tambien se ha realizado el test del fallo de ajuste, que justifica la adecuación del modelo de regresión lineal a los datos experimentales. Debido a que $F_{cal} = 1'02 < F_{tab}$ ($F_{tab}(0'05, 4, 12) = 3'26$), el ajuste por regresión lineal es correcto con una valor P= 44'5 %.

4.2. PARÁMETROS DE FIABILIDAD

Al igual que en los Capítulos anteriores, estos parámetros han sido evaluados mediante los criterios recomendados por la IUPAC y utilizando los datos del calibrado, mediante el modelo de regresión lineal.

A) *Según la IUPAC*

Límites de detección y cuantificación

Para el cálculo de los límites de detección y determinación, se preparan 10 muestras de blanco, siguiendo las condiciones operatorias ya optimizadas, para cada uno de los rangos de concentración. Los resultados obtenidos así como su tratamiento estadístico (valor medio y desviación estándar, s) se muestran en la Tabla VI.29 para ambas rectas de calibrado.

Precisión

Con objeto de calcular la repetitividad de las medidas experimentales para un valor concreto de concentración, se preparan dos series de 10 matraces, cada una de las cuales con un contenido en Zr(IV) perteneciente a cada rango de concentración y a las que se les ha aplicado el procedimiento operatorio correspondiente. Los valores ensayados son:

Tabla VI.29

Repetitividad del blanco.

Rango 0'2-1'0 ppm		***Rango 5-50 ppb***	
BLANCO	IF	BLANCO	IF
1	7'7	1	27'2
2	8'0	2	26'1
3	6'7	3	26'4
4	7'8	4	27'3
5	7'3	5	27'7
6	7'6	6	26'7
7	7'1	7	27'5
8	8'1	8	27'0
9	6'8	9	26'3
10	7'2	10	27'0
IFm	7'43	IFm	26'92
s	0'485	s	0'533

Tabla VI.30

Datos de repetitividad

Rango 0'2-1'0 ppm		***Rango 5-50 ppb***	
IF	[Zr(IV)],ppm	IF	[Zr(IV)],ppb
73'5	0'416	70'2	29'7
69'8	0'392	69'4	29'1
71'5	0'403	71'8	30'7
70'2	0'395	70'8	30'1
71'4	0'403	72'0	30'8
72'0	0'407	69'9	29'5
69'7	0'392	71'3	30'4
71'2	0'402	72'2	31'0
70'7	0'398	69'7	29'3
71'0	0'400	70'9	30'1
$[\overline{Zr}]$	0'401	$[\overline{Zr}]$	30'07
s	0'007	s	0'658

Rango 0'2-1'0 ppm: 0'4 ppm

Rango 5-50 ppb: 30 ppb

Los resultados obtenidos, se muestran en la Tabla VI.30, en la que se encuentran los valores de intensidad de fluorescencia correspondientes a cada matraz, frente a las concentraciones halladas mediante la correspondiente recta de calibrado.

La estimación de todos los parámetros utilizando las expresiones sugeridas por la IUPAC se recoge en la Tabla VI.31.

Tabla VI.31

Parámetros de Fiabilidad según criterios IUPAC

	Rango 0'2-1'0 ppm	*Rango 5 -50 ppb*
Linealidad (r^2 %)	99'84	99'90
Sensibilidad de calibrado (IF/[Zr])	158'66	1'47
Límite de detección	0'009 ppm	1'08 ppb
Límite de cuantificación	0'030 ppm	3'63 ppb
Precisión, DER %	(0'4 ppm) 1'75 %	(30 ppb) 2'19 %
Rango dinámico lineal	11'1	9'3

B) ***Según el análisis de la regresión***

La sensibilidad analítica y la linealidad se establecen a partir de los datos derivados del calibrado, reflejados en las Tablas VI.26 y VI.28.

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar de los blancos, así como de cada uno de los patrones usados para el

establecimiento de las rectas de calibrado, respectivamente. Estos valores se muestran en la Tabla VI.32.

Tabla VI.32

Desviaciones estándar en función del calibrado

Rango 0'2-1'0 ppm		***Rango 5-50 ppb***	
[Zr(IV)],ppm	$s/10^{-3}$	[Zr(IV)],ppb	s
0'0	10'2	0	0'384
0'2	9'4	5	0'371
0'4	9'0	10	0'362
0'6	9'0	20	0'351
0'8	9'4	30	0'355
1'0	16'3	40	0'373
		50	0'404

La estimación de todos los parámetros característicos del método, calculados a partir de este modelo aparece en la Tabla VI.33.

Tabla VI.33

Parámetros de Fiabilidad según el modelo de Regresión lineal

	Rango 0'2-1'0 ppm		***Rango 5-50 ppb***	
Linealidad (1-DER(b)%)	99'01		99'28	
Sensibilidad analítica	0'014 ppm		0'568 ppb	
Límite de detección	0'031 ppm		1'15 ppb	
Límite de cuantificación	0'102 ppm		3'85 ppb	
Rango dinámico lineal	3'2		4'3	
Precisión (DER %)	0'2 ppm	4'68	5 ppb	7'15
	0'4 ppm	2'23	10 ppb	3'75
	0'6 ppm	1'52	20 ppb	1'71
	0'8 ppm	1'18	30 ppb	1'20
	1'0 ppm	1'02	40 ppb	0'93
			50 ppb	0'81

Una vez calculados los valores de la desviación estándar para cada uno de los valores de concentración utilizados en el establecimiento de los calibrados, se pueden representar graficamente con objeto de poder determinar por extrapolación la precisión de cualquier valor de concentración dentro del rango lineal.

La representación aparece en la Figura VI.21, donde se han incluido los límites de cuantificación para ambos calibrados, a los que por definición le corresponde un 10 % de error.

C) ***Límite de detección de Clayton***

Utilizando la desviación estándar de los blancos, obtenida mediante la aplicación del modelo de regresión lineal (Tabla VI.32), se calcula el límite de detección de la forma propuesta por Clayton, considerando los errores α y β. Los resultados para ambos calibrados son:

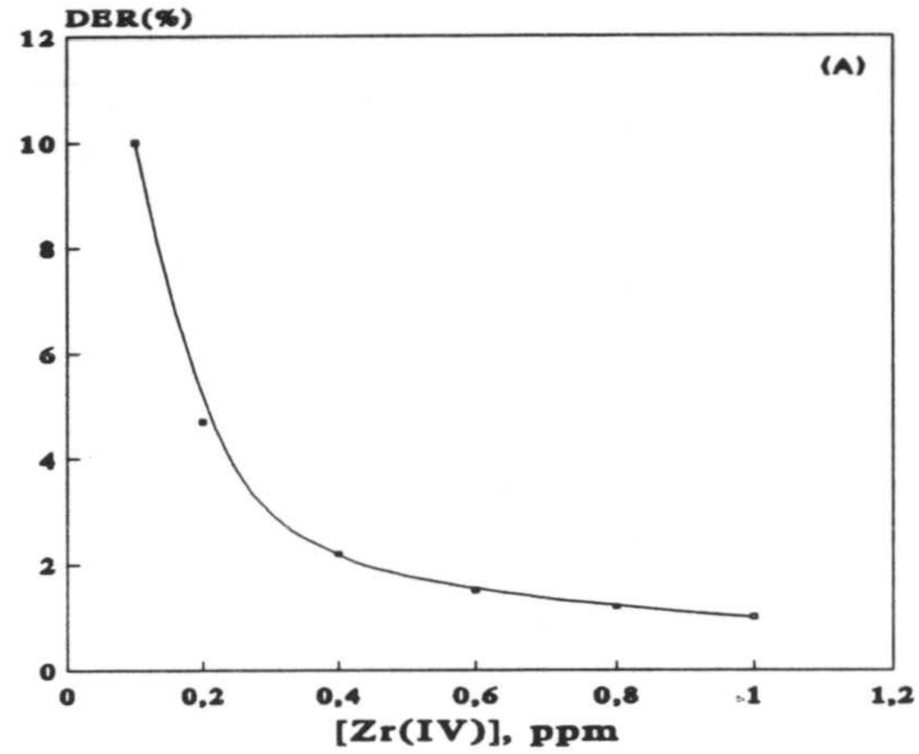
$$LD = s_{blanco} \cdot \Delta(\alpha = 0'5, \beta = 0'5)$$

* Rango 0'2-1'0 ppm

  n = 18; Δ(n-2) = 3'44; LD = 0'035 ppm

* Rango 5-50 ppb

  n = 21; Δ(n-2) = 3'41; LD = 1'31 ppb



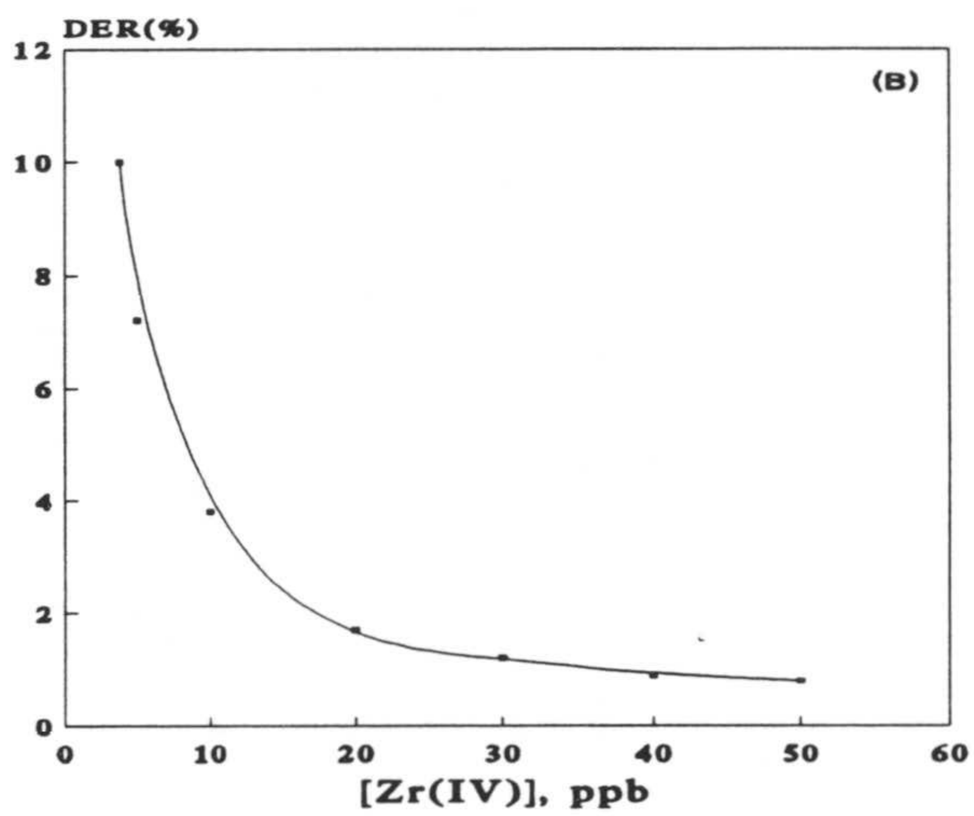


Figura VI.21. Estimación de la precisión. (A) Rango 0'1-1'0 ppm; (B) Rango 3'9-50'0 ppb.

SELECTIVIDAD

Se realizó un estudio detallado del efecto que la presencia de iones extraños ejerce en la determinación fluorescente de Zr(IV) mediante la formación del complejo ternario en medio catiónico micelar.

Para decidir si la sustancia interfiere, se obtiene el correspondiente intervalo de confianza sobre la señal de fluorescencia, del valor de concentración de analito sobre el que se realiza el estudio de selectividad.

Se han calculado las desviaciones estándar de las señales analíticas para cada una de las concentraciones de la recta de calibrado inferior, así como el correspondiente intervalo de confianza sobre la señal (ICR):

$$ICR = R \pm s_R.t$$

siendo R, la señal analítica predicha a partir del calibrado; s_R, desviación estándar de la señal e ΔR el intervalo de confianza al 95 % t(α=0'10,n-2 grados de libertad).

Los resultados se muestran en la Tabla VI.34.

Tabla IV.34

Desviaciones estándar e intervalos de confianza sobre la señal predicha

[Zr(IV)], ppb	R	s_R	ΔR (±)	ICR
5	33'95	0'873	1'51	32'4 - 35'5
10	41'30	0'864	1'49	39'8 - 42'8
20	56'00	0'855	1'48	54'5 - 57'5
30	70'70	0'858	1'48	69'2 - 72'2
40	85'40	0'875	1'51	83'9 - 86'9
50	100'10	0'903	1'56	98'5 - 101'6

t(α=0'10,16 gl) = 1'729

La concentración sobre la que se ha realizado el estudio de la selectividad es de 40 ppb. La experiencia que se llevó a cabo para este estudio fue la siguiente:

En matraces de 10 ml se introdujo una cantidad de Zr(IV) constante e igual a 40 ppb y cantidades decrecientes de cada uno de los iones ensayados como posibles interferentes, comenzando por 40 ppm y disminuyendo esta concentración hasta alcanzar un valor de intensidad de fluorescencia comprendido dentro del intervalo de confianza. Posteriormente se aplicó el procedimiento operatorio ya descrito y se procedió a la lectura de la intensidad de fluorescencia a 25°C, a los 20 min de la preparación de los matraces, con rendijas de excitación y de emisión de 10 nm, siendo la λ_{ex} = 478 nm y la λ_{em} = 605 nm.

Todos los valores de señal que no estén incluidos dentro de ese intervalo, deducido a partir de los datos del calibrado, implican que la sustancia es interferente al nivel de concentración ensayado.

Los valores de intensidad de fluorescencia para cada interferente ensayado así como el logaritmo de la concentración y la relación de concentraciones interferente/Zr(IV) ensayadas se muestran en la Tabla VI.35.

A partir de estos se deduce la función polinómica (señal vs. log Cx) que mejor se ajusta a la respuesta de cada interferente, mediante el método interpolación de Lagrange. El punto de corte de este polinómio con la banda superior o inferior del intervalo de confianza obtenido sobre la predicción de la señal correspondiente a 40 ppb, indicará la concentración tolerada de sustancia interferente en todo el rango de aplicación del método.

Para la concentración de Zr(IV) (40 ppb), el intervalo de confianza sobre la señal de fluorescencia, obtenido a partir de los datos del calibrado es:

$$IF \epsilon 85'40 \pm 1'51$$

Según esto, todos los valores de concentración de ión extraño cuya intensidad de fluorescencia no esté comprendida en el intervalo {83'9 - 86'9}, al cúal le corresponde un error relativo sobre la concentración (calculado como $\Delta c/c.100$; $\Delta c = \Delta R/b$) de ± 2'6 %, serán considerados como interferentes.

En la Tabla VI.36 se encuentran las concentraciones toleradas por la determinación analítica para cada uno de los iones ensayados, así como la relación de tolerancia máxima permitida.

De los 41 iones extraños ensañados, 28 son tolerados en concentraciones superiores a 40 ppm en matraz, lo que supone un exceso de 1000 veces con respecto al Zr(IV) analizado. La mayoria restante es tolerada en relaciones entre 1000 y 100 veces y sólo interfieren en relaciones inferiores a 100 Be(II) y Sn(II).

Se observa que la única interferencia importante es producida por el Hf(IV), permitiendose un exceso de 5 veces con respecto al contenido de Zr(IV), lo cual no es de gran importancia debido a la abundancia del Zr con respecto a este elemento.

Esto pone de manifiesto la elevada selectividad del método espectrofuorimétrico propuesto para la determinación de Zr(IV), debido a la posibilidad de trabajar en un considerable exceso de la sal disódica del EDTA que no solo actúa como ligando en la formación del complejo ternario sino también como enmascarante de numerosos iones metálicos.

Tabla VI.35. Estudio de Interferencias

Ión extraño	Cx/C_{Zr}	Cx(ppb)	Log Cx	R
Li(I)	1000	40000	4'60	84'2
Na(I)	1000	40000	4'60	84'1
K(I)	1000	40000	4'60	83'7
Rb(I)	1000	40000	4'60	83'6
Cs(I)	1000	40000	4'60	84'0
Be(II)	1000	40000	4'60	398'0
	500	20000	4'30	299'9
	100	4000	3'60	139'2
	50	2000	3'30	110'2
	25	1000	3'00	83'8
Mg(II)	1000	40000	4'60	84'1
Ca(II)	1000	40000	4'60	85'0
Sr(II)	1000	40000	4'60	84'5
Y(III)	1000	40000	4'60	91'7
	500	20000	4'30	84'0
La(III)	1000	40000	4'60	90'3
	500	20000	4'30	84'8
Ti(IV)*	1000	40000	4'60	93'3
	500	20000	4'30	85'0
Hf(IV)**	50	2000	3'30	320'3
	10	400	2'60	185'0
	5	200	2'30	86'6
V(V)	1000	40000	4'60	ppta
	500	20000	4'30	139'2
	100	4000	3'60	84'7
Mo(VI)	1000	40000	4'60	220'3
	100	4000	3'60	86'5

Tabla VI.35. (continuación)

Ión extraño	Cx/C_z	Cx(ppb)	Log Cx	R
W(VI)	1000	40000	4'60	400'0
	100	4000	3'60	122'3
	50	2000	3'30	85'9
Mn(II)	1000	40000	4'60	84'8
Fe(III)	1000	40000	4'60	83'6
Co(II)	1000	40000	4'60	83'8
Ni(II)	1000	40000	4'60	84'1
Cu(II)	1000	40000	4'60	84'5
Zn(II)	1000	40000	4'60	101'7
	500	20000	4'30	84'1
Cd(II)	1000	40000	4'60	84'4
B(III)	500	20000	4'30	118'5
	250	10000	4'00	94'2
	100	4000	3'60	85'0
Al(III)	1000	40000	4'60	117'7
	500	20000	4'30	101'1
	100	4000	3'60	86'1
Sn(II)	1000	40000	4'60	406'7
	100	4000	3'60	102'0
	50	2000	3'30	86'0
Pb(II)	1000	40000	4'60	85'0
NO_3^-	1000	40000	4'60	83'9
NO_2^-	1000	40000	4'60	84'3
PO_4^{3-}	1000	40000	4'60	84'0
As(V)	1000	40000	4'60	84'2

Tabla VI.35. (continuación)

Ión extraño	Cx/C_{Zr}	Cx(ppb)	Log Cx	R
Sb(III)	1000	40000	4'60	118'9
	500	20000	4'30	101'1
	100	4000	3'60	84'3
Bi(III)	1000	40000	4'60	84'5
SO_4^{2-}	1000	40000	4'60	83'9
SCN^-	1000	40000	4'60	85'7
Se(IV)	1000	40000	4'60	85'0
F^-	1000	40000	4'60	93'9
	100	4000	3'60	84'7
Cl^-	1000	40000	4'60	85'3
Br^-	1000	40000	4'60	83'7
I^-	1000	40000	4'60	83'9
H_2O_2	1000	40000	4'60	84'6

* Enmascarante: 40 ppm de H_2O_2
** Enmascarante: 40 ppm de F^-

Tabla VI.36. Niveles de tolerancia

Ión extraño	Cx/C_{Zr}	c_t (ppb)
Li(I)	1000	40000
Na(I)	1000	40000
K(I)	1000	40000
Rb(I)	1000	40000
Cs(I)	1000	40000
Be(II)	26	1047
Mg(II)	1000	40000
Ca(II)	1000	40000
Sr(II)	1000	40000
Y(III)	628	25119
La(III)	628	25119
Ti(IV)	573	22909
Hf(IV)	5	200
V(V)	104	4169
Mo(VI)	100	3981
W(VI)	50	1996
Mn(II)	1000	40000
Fe(III)	1000	40000
Co(II)	1000	40000
Ni(II)	1000	40000
Cu(II)	1000	40000
Zn(II)	1000	40000
Cd(II)	1000	40000
B(III)	161	6457
Al(III)	144	5754

Tabla VI.36. (Continuación)

Ión extraño	Cx/C_{Zr}	c_t (ppb)
Sn(II)	57	2290
Pb(II)	1000	40000
NO_3^-	1000	40000
NO_2^-	1000	40000
PO_4^{3-}	1000	40000
As(V)	1000	40000
Sb(III)	185	7413
Bi(III)	1000	40000
SO_4^{2-}	1000	40000
Se(IV)	1000	40000
SCN^-	1000	40000
F^-	165	6607
Cl^-	1000	40000
Br^-	1000	40000
I^-	1000	40000
H_2O_2	1000	40000

Cx/C_{Zr}, Relación interferente/analito; C_t, concentración tolerada

4.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Se propone el siguiente método operatorio para la determinación fluorimétrica de Zr(IV) con Rojo de Alizarina S en medio micelar, utilizando diferentes condiciones instrumentales, dependiendo del contenido en la muestra a analizar:

A) *En matraces de 10 ml se introduce la disolución problema de forma que su contenido final esté comprendido entre 1'0-10'0 µg en Zr(IV), 1'0 ml de disolución de la sal disódica del EDTA 0'1 M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y 0'2 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. Se mide la fluorescencia de las muestras transcurridos 20 min, así como del correspondiente blanco a 600 nm, una vez excitadas a 478 nm, manteniendo una temperatura constante de 25 °C y utilizando rendijas de excitación y de emisión de 3 nm.*

B) *Se trabaja de igual forma que en el caso anterior, pero en este caso el contenido de Zr(IV) en los matraces de 10 ml debe estar comprendido en el intervalo entre 0'04-0'50 µg. Las rendijas ex/em utilizadas son 10/10 nm.*

La cantidad de Zr(IV) presente se determina a las condiciones instrumentales de la correspondiente recta de calibrado.

VI.B. DETERMINACIÓN DE EDTA EN MEDIO MICELAR

1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EDTA: INTERÉS ANALÍTICO Y MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

Las sales disódica y disódica cálcica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), son utilizadas como aditivo alimentario debido a su gran capacidad para formar complejos muy estables con los iones metálicos.

Se usan en conservas de productos marinos para evitar la formación de cristales de estruvita ($MgNH_4PO_4.6H_2O$). Los alimentos marinos contienen cantidades considerables de iones magnesio que a veces reaccionan con el fosfato amónico durante el almacenaje y forman cristales que pueden confundirse con trozos de vidrio. La adición adición de EDTA al acomplejar al Mg^{2+} , evita la formación de estos cristales, pudiendo acomplejar además a otros iones (como Fe^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}), que también existen en estos alimentos evitando que reaccionen con grupos sulfuro e impidiendo alteraciones en el color de estos productos.

Las sales de EDTA no son antioxidantes, sin embargo, muestran un carácter sinérgico cuando se utilizan conjuntamente con los antioxidantes, ya que eliminan los iones metálicos que catalizan la oxidación y por esto, se emplean como aditivos en aliños para ensaladas, mahonesa, margarina, bebidas, etc. Tambien se suele utilizar en verduras antes del blanqueo, ya que inhiben decoloraciones inducidas por metales y eliminan el calcio de las paredes celulares de las sustancias pécticas, fomentando la suavidad de las mismas.

La legislación de la C.E.E. no comtempla a las sales de EDTA en sus listas positivas de aditivos. En algunos países, como el Reino Unido, España y otros si están permitidas, al igual que en Japón y EEUU. Sin embargo, en Holanda y Francia están prohibidas como aditivo y en el país vecino está vedado su uso,

incluso como ayuda en el tratamiento indutrial de los alimentos. Cuando se emplea en el procesamiento de alimentos, estas sales son eliminadas en gran parte durante la manufacturación de los mismos y por esto es importante la determinación de EDTA, a bajos niveles de concentración, en los productos terminados.

El EDTA y sus sales también son utilizados en medicina: en el tratamiento de desórdenes metabólicos causados por acumulación de hierro y cobre en los tejidos, como anticoagulante y, sobre todo, como antídoto en envenenamiento por cianuro y metales pesados. Dado que es muy poco absorbido por el tracto gastrointestinal, suele ser suministrado por vía intravenosa o mediante inyección intramuscular, siendo rapidamente excretado a través de los riñones.

La técnica más utilizada para la determinación de EDTA en alimentos, medicamentos y aguas residuales, es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), mediante formación del complejo Fe-EDTA (**58**) o también utilizando HPLC de par iónico en fase inversa, donde el ión tetrabitilamonio es utilizado como contraión y el EDTA se separa acomplejado con Cu(II) (**59,60**) o con Fe(III) (**61,62**), ofreciendo esta última técnica mejores resultados.

La Cromatografía de gases ha sido usada para la determinación simultánea de EDTA, AID (ácido iminodiacético) y AHEID (ácido N-(2-hidroxietil) iminodiacético) (**63**). Sin embargo, este procedimiento requiere un tratamiento preliminar que consume mucho tiempo.

Existen varios métodos espectrofotométricos para la determinación de EDTA, generalmente basados en la reducción de color que produce este analito sobre un complejo coloreado (**64**) o en la adición en exceso de un ión metálico cromogénico en las condiciones adecuadas (**65**). A estos métodos se le suele imputar la falta de reproducibilidad o de selctividad cuando se aplican a alimentos. Recientemente T. Hamano y col., proponen un método espectrofotométrico para determinar EDTA en alimentos, basado en la adición en exceso de Fe(III), siendo

extraido el férrico libre en un disolvente orgánico y descartado. A la capa acuosa se le añade ácido ascórbico y ácido 4,7-difenil-1,10-fenantrolinadisulfónico y después de esperar 20 min. se mide la absorbancia a 535 nm. Tiene un rango de aplicación de 0'5-40 ppm de EDTA y se aplicó con éxito a varios alimentos (**66**).

Los métodos eléctricos también han sido empleados para la determinación de EDTA. Fogg y col. lo determinan por inyección de flujo con deteción amperométrica (**67**) y Fayyard y col. lo hacen por potenciometría indirecta (**68**). Estos métodos son muy sensibles, en el último, se determina EDTA a concentraciones inferiores a 4'5 ppb, sin embargo, no son aplicables a matrices complejas como los alimentos.

No hemos encontrado en bibliografía ningún método espectrofluorimétrico para determinar este analito. Una vez realizada la optimización experimental del complejo ternario Zr(IV)-EDTA-RAS, y al observar el aumento proporcional que experimentaba la señal fluorescente al incrementar la concentración de la sal disódica del ácido etilendiamino tetracético, decidimos aplicar tal estudio al establecimiento de un método fluorimétrico de determinación de EDTA que presente una elevada sensibilidad y sea aplicable a alimentos y otras matrices.

2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Aunque ya en la Tabla VI.20 se han resumido las condiciones experimentales óptimas para la formación del complejo ternario fluorescente, es necesario repetir el estudio de alguna de estas variables en las que pudiera existir variación al considerar ahora el EDTA como analito, dejando invariable el pH y la concentración del tensioactivo, una vez observada que la interacción es de tipo micelar y que debe ser superado el valor de la c.m.c.

* **Estabilidad del sistema**

Debido a que se observó que es preciso esperar al menos durante 20 min para la completa formación del complejo ternario trabajando en presencia de un exceso del ligando EDTA, se decidió estudiar la influencia del tiempo sobre el desarrollo de la fluorescencia con objeto de comprobar si el establecimiento del método a menores concentración de EDTA provocaba alguna modificación sobre la cinética de formación.

Para ello se prepararon 50 ml de una disolución cuyas concentraciones finales fueron: 3.10^{-6} M en EDTA, 10^{-5} M en Zr(IV), 0'6% en BCTA y 2.10^{-5} M en RAS, adicionando 10'0 ml de disolución reguladora acético/acetatode pH 4'7 en el siguiente orden ya seleccionado:

EDTA + Zr(IV) + Tampón + BCTA + RAS

Se midió la fluorescencia a 25°C, cambiando en cada medida el contenido de la cubeta para evitar posibles efectos de fotodescomposición, utilizando una λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 7 nm. Los resultados se muestran en la Tabla VI.37 y se representan en la Figura VI.22.

Se observa que al no ser tan elevada la concentración de EDTA, la máxima señal fluorescente se consigue con un mayor tiempo de espera, probablemente debido a que a estas concentraciones la formación del complejo ternario sea más lenta debido a la competencia con el complejo binario no fluorescente. A partir de los 50 minutos desde la preparación de los matraces, la intensidad de fluorescencia es máxima y permanece constante, de modo que trascurrida 1 hora, se consigue la completa formación del complejo ternario fluorescente en presencia del tensioactivo catiónico, permaneciendo estable al menos durante 5 horas.

Tabla VI.37
Estabilidad del sistema Zr(IV)-EDTA-RAS

Tiempo (min)	IFc	IFb
0	58'2	11'6
5	82'7	11'9
10	101'0	10'9
15	128'3	11'0
20	144'4	11'3
25	166'6	10'9
30	190'1	11'7
45	216'8	12'0
50	240'7	11'5
60	239'9	12'2
90	242'7	12'1
120	243'3	12'7
160	242'8	12'0
180	239'2	12'1
240	240'5	12'0
300	241'1	11'9

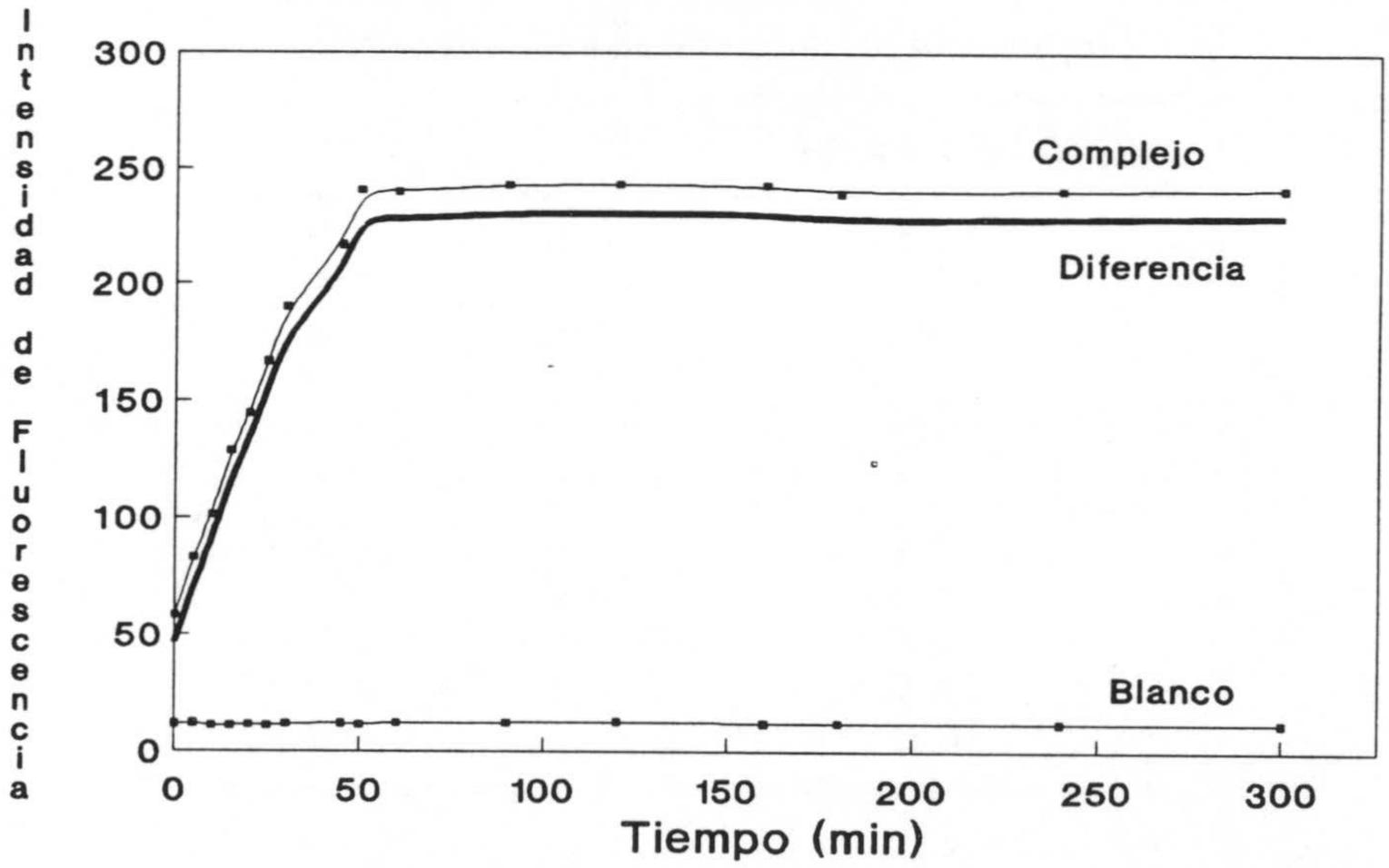


Figura VI.37. Estabilidad de Zr(IV)-EDTA-RAS. [EDTA] = 3.10^{-6} M, [Zr(IV)] = 10^{-5} M, [RAS] = 2.10^{-5} M, [BCTA] = 0'6%. pH = 4'7.

* **Influencia de la concentración de Zr(IV)**

Se preparó una serie de matraces de 10 ml en los que se adicionaron: 0'3 ml de disolución de EDTA 10^{-4} M, volúmenes crecientes de disolución de Zr(IV) para conseguir diferentes concentraciones, 2'0 ml de tampón acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de BCTA al 5% y 0'2 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando finalmente con agua destilada.

Se midió la fluorescencia a 25°C, transcurrida 1 hora desde las preparación de los matraces, utilizando una λ_{ex} = 478 nm y λ_{em} = 600 nm y rendijas de excitación y emisión de 7 nm. Los resultados se muestran en la Tabla VI.38 y se representan en la Figura VI.23.

Tabla VI.38

Influencia de la concentración de Zr(IV)

[Zr(IV)].10^6 M	IFc	IFb
0'2	24'5	11'3
0'4	38'5	0'5
0'6	53'0	0'4
0'8	67'1	1'0
1'0	88'8	1'2
2'0	148'8	1'3
3'0	213'3	1'8
4'0	245'0	2'0
6'0	240'4	2'1
8'0	238'1	3'2
10'0	241'1	4'0

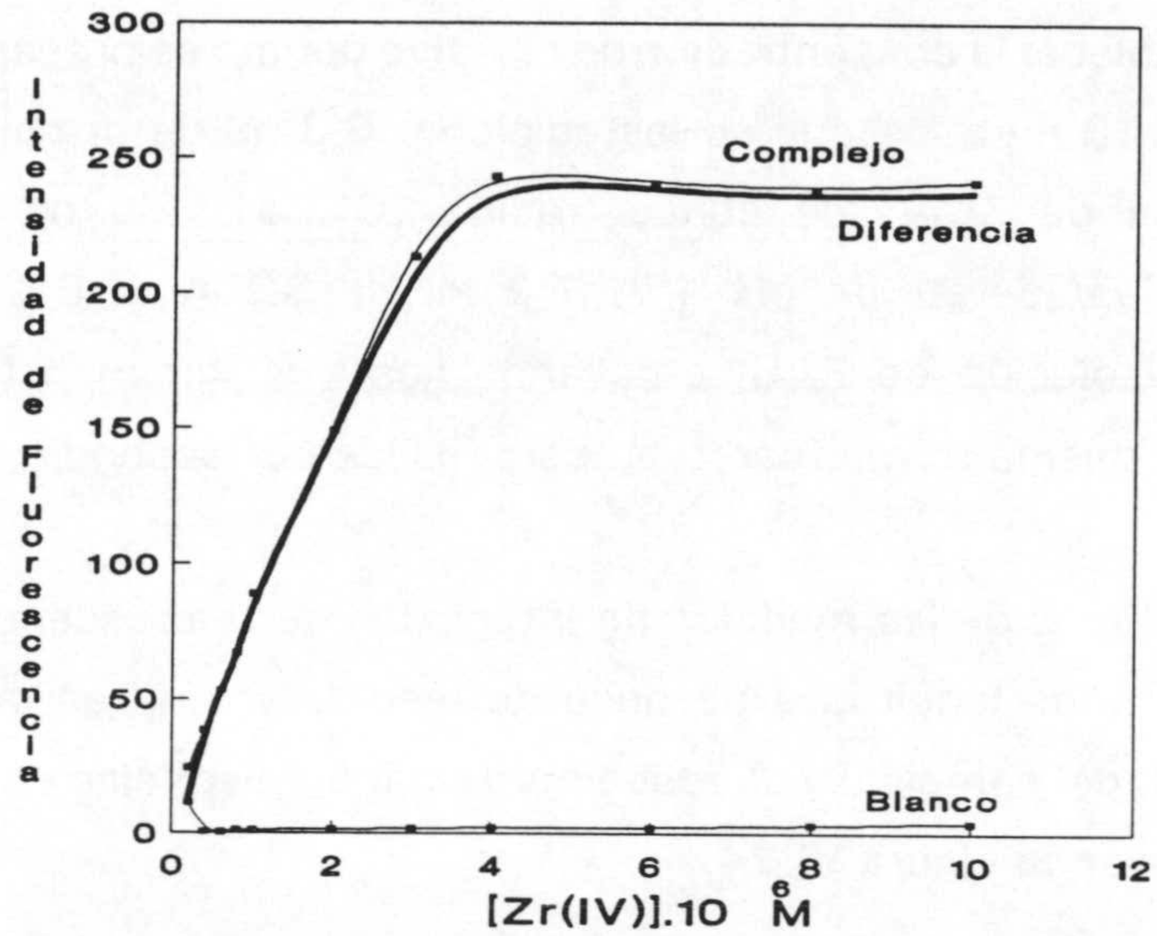


Figura VI.23. Influencia de la concentración de Zr(IV). [EDTA] = 3.10^{-6} M, [RAS] = 2.10^{-5} M, [BCTA] = 0'6%, pH = 4'7.

Se observa que desde el inicio de la experiencia hasta alcanzar una concentración de 4.10^{-6} M, la fluorescencia del sistema aumenta proporcionalmente con la concentración de Zr(IV), y es a partir de esta valor cuando se alcanza una señal fluorescente máxima y constante. Se decide por tanto , para posteriores estudios, seleccionar como concentración óptima un valor de 6.10^{-6} M, el cual supone un ligero exceso con especto a la relación estequiométrica del complejo EDTA:Zr(IV).

* **Influencia de la concentración de Rojo de Alizarina S**

Para establecer la concentración de reactivo óptima se prepararon una serie de matraces de 10 ml a los que se les adicionó: 0'3 ml de disolución de EDTA 10^{-4} M, 0'6 ml de Zr(IV) de concentración 10^{-4} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de BCTA al 5% y volúmenes crecientes de disolución de RAS, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. De la misma forma fueron preparados los correspondientes blancos.

Los resultados de las medidas de intensidad de fluorescencia despues de esperar 1 hora, a las longitudes de onda de medida y rendijas de excitación y emisión de 7 nm, del complejo y su respectivo blanco, se reflejan en la Tabla VI.39 y se representan en la Figura VI.24.

Tabla VI.39

Influencia de la concentración de RAS

[RAS].10^5 M	IFc	IFb
0'02	10'3	1'9
0'04	16'8	3'1
0'06	25'5	4'4
0'08	34'7	5'1
0'10	42'3	5'0
0'20	84'5	4'6
0'30	127'7	4'2
0'40	156'4	4'8
0'60	214'8	6'7
0'80	249'3	8'3
1'00	258'3	8'5
1'50	257'6	10'2
2'00	257'5	11'3
2'50	245'8	14'5
3'00	237'1	16'8
4'00	208'6	19'4

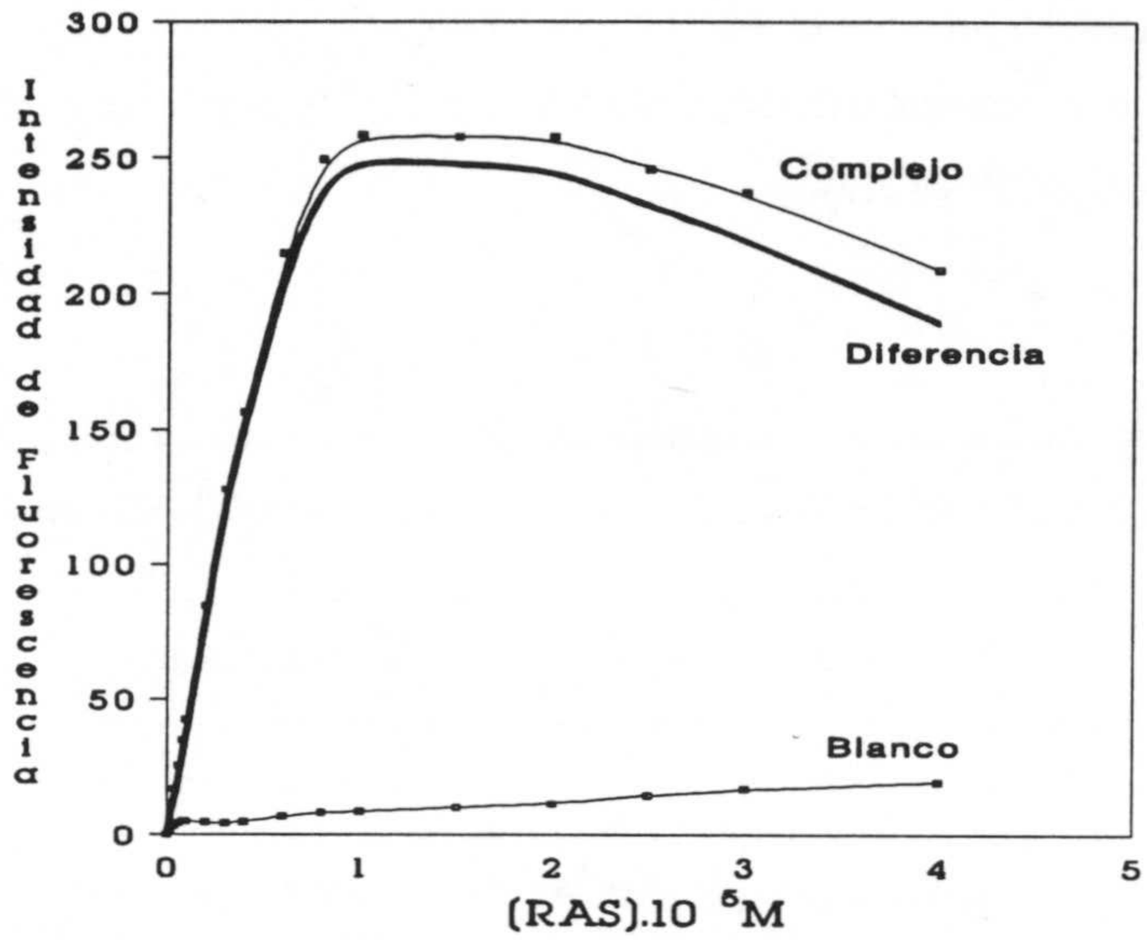


Figura VI.24. Influencia de la concentración de RAS. [EDTA]= 3.10^{-6} M, [Zr(IV)]= 6.10^{-6} M, [BCTA]= 0'6%, pH= 4'7

Existe un primer tramo lineal en el que la señal fluorescente aumenta proporcionalmente al aumentar la concentración del reactivo Rojo de Alizarina S, comprendido entre 2.10^{-7} M y 1.10^{-5} M, valor a partir de la cual la señal permanece constante hasta alcanzarse una concentración de $2'5.10^{-5}$ M, en el que se comienza a producir una disminución de la fluorescencia.

A la vista de estos resultados, se selecciona una concentración de reactivo RAS de $1,5.10^{-5}$ M, valor comprendido en la meseta donde la señal es máxima.

* **Resumen de la optimización de variables experimentales**

En la Tabla VI.40 se resumen los valores óptimos de las variables a controlar en la determinación fluororimétrica de EDTA por formación del complejo ternario en presencia de BCTA.

Tabla VI.40

Optimización de variables para el sistema Zr(IV)-EDTA-RAS

Variable	Valor óptimo
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	478/600 nm
pH	4'7
[Dis. reguladora]	AcH/AcNa 0'2 M, pH = 4'7
T^a	No afecta entre 15-30°C
Tiempo de espera	60 min
Estabilidad	>5 h.
Orden de adición	EDTA + Zr(IV) + Tampón + BCTA + RAS
[RAS]	$1'5.10^{-5}$ M
[BCTA]	0'6 %
[Zr(IV)]	6.10^{-6} M

3. ESTABLECIMIENTO DE LA DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA DE EDTA EN PRESENCIA DE BCTA

3.1. INTERVALO LINEAL. RECTAS DE CALIBRADO

Con objeto de establecer un rango de concentraciones en el que la intensidad de fluorescencia varie de forma lineal, se procedió al establecimiento del rango lineal de aplicación del método propuesto. Para ello se realizó un estudio de la variación de la señal fluorescente al modificar la concentración de EDTA a las condiciones óptimas establecidas.

Se preparó una serie de matraces de 10 ml en los que se introducen de volúmenes crecientes de disolución de EDTA de 10 ppm, 0'6 ml de disolución de Zr(IV) 10^{-4} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetatode pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y 1'5 ml de disolución de RAS 10^{-4} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. De igual modo se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Se registraron las señales analíticas a 25°C, esperando 1 hora desde la preparación de los matraces, siendo las condiciones instrumentales utilizadas: rendijas de excitación y de emisión de 7 nm, λ_{ex} = 478 nm y la λ_{em} = 600 nm. Los resultados se muestran en la Tabla VI.41 y se representan en la Figura VI.25.

El tramo lineal se extiende hasta un valor de concentración de 1'2 ppm, en el que se observa curvatura. Se realiza el Análisis de la Varianza de la regresión con los datos del calibrado incluido el valor de 1'1 ppm, con objeto de asegurar su pertenencia al intervalo lineal.

Tabla VI.41

Comprobación del intervalo lineal

[EDTA], ppm	IF
0'0	9'9
0'2	57'9
0'4	105'6
0'6	146'0
0'8	198'8
1'0	243'9
1'1	258'0
1'2	274'2

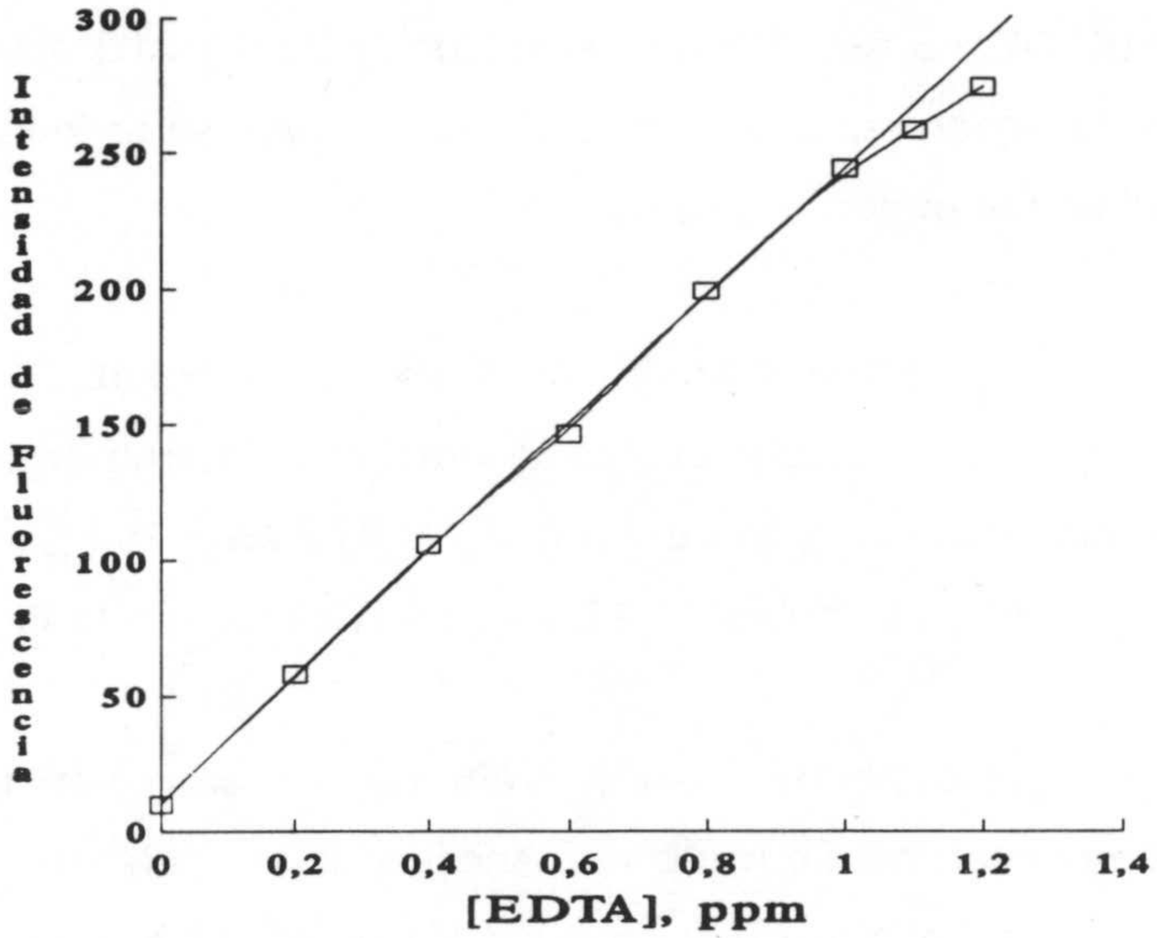


Figura VI.25. Establecimiento del intervalo lineal

Los resultados de la medida de las tres réplicas realizadas para cada valor de concentración se muestran en la Tabla VI.42.

Tabla VI.42

Datos para la evaluación del intervalo lineal mediante el ANOVA

[EDTA], ppm	IF		
0'0	9'9	10'2	9'0
0'2	57'9	55'7	58'8
0'4	105'6	104'2	104'5
0'6	146'0	152'3	148'5
0'8	198'8	197'2	196'8
1'0	243'9	240'9	241'4
1'1	258'0	254'1	257'0

Mediante la aplicación del ANOVA se obtiene un valor del estadístico F_{cal} = 7'64. Para comprobar si existe curvatura se compara con el valor tabulado (F_{tab}(0'05, 5, 14) = 2'96). En este caso como $F_{cal} > F_{tab}$ (P= 0'12 %) se observa que el último punto observado produce desviación del ajuste lineal.

Eliminando el valor de concentración de 1'1 ppm, se vuelve a realizar el ANOVA. En este caso el *Test del Fallo de Ajuste* da como resultado :F_{cal} = 0'98, (F_{tab}(0'05, 4, 12) = 3'26), de modo que la conclusión del test cambia, obteniéndose un buen ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal (P= 45'3 %).

Se han establecido dos rectas de calibrado en distintas condiciones de sensibilidad instrumental.

A) ***Rango entre 0'2 y 1'0 ppm***

La recta de calibrado correspondiente a la parte superior del tramo lineal se obtiene preparando una serie de matraces de 10 ml que contienen: de 0'2 a 1'0 ml de disolución de EDTA de 10 ppm, 0'6 ml de disolución de Zr(IV) 10^{-4} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y 1'5 ml de disolución de RAS 10^{-4} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada.

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en las condiciones experimentales expuestas anteriormente y las correspondientes intensidades de fluorescencia incluido el blanco como un valor más, se han relacionado anteriormente en la Tabla VI.42 y se representan en la Figura VI.26.

Al ajustar esta recta por mínimos cuadrados, considerando el blanco como un valor más, se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla VI.43.

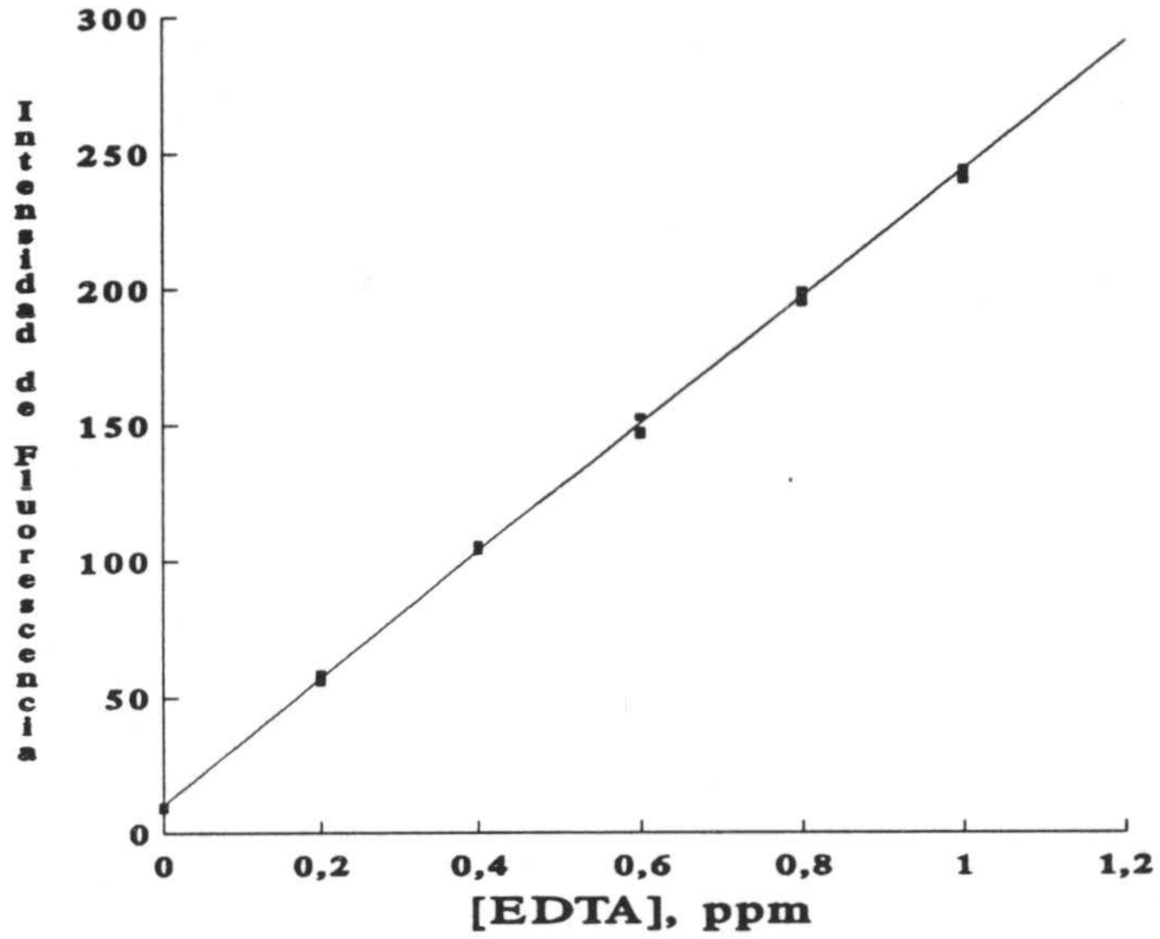


Figura VI.26. Recta de calibrado (0'2-1'0 ppm). Rendijas de excitación y emisión 7 nm.

Tabla VI.43

Datos estadísticos de la recta de calibrado

Ordenada en el origen (a) = 10'65

Desviación estándar (s_a) = 0'851 DER (a) = 8'0 %

Pendiente (b) = 231'50

Desviación estándar (s_b) = 1'405 DER (b) = 0'61 %

Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$) = 2'036

Coef. de correlación (r) = 0'9997

Coef. de determinación (r^2) = 99'94 %

g = $1'7.10^{-4}$

Fallo de Ajuste (P= 45'3 %)

B) ***Rango entre 20 y 100 ppb***

Se preparó una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron: de 0'2 a 1'0 ml de disolución de EDTA de 1 ppm, 0'6 ml de disolución de Zr(IV) 10^{-4} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetatode pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y 1'5 ml de disolución de RAS 10^{-4} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada.

Se realizaron tres réplicas para cada valor de concentración, así como del blanco. Las medidas fueron realizadas termostatando el compartimento de cubetas a 25 °C, a las mismas condiciones operatorias del apartado anterior, utilizando rendijas de excitación y de emisión de 15 nm.

Los resultados se expresan en la Tabla VI.44 y se representan en la Figura VI.27.

Tabla VI.44

Recta de calibrado

[EDTA], ppb	IF		
0	32'5	30'7	32'3
20	47'7	48'3	46'6
40	65'7	62'0	63'3
60	80'2	81'6	79'6
80	97'5	98'0	98'9
100	114'6	113'3	112'6

El ajuste de la recta por mínimos cuadrados, incluyendo el blanco como un valor más, proporciona la información que se recoge en la Tabla VI.45.

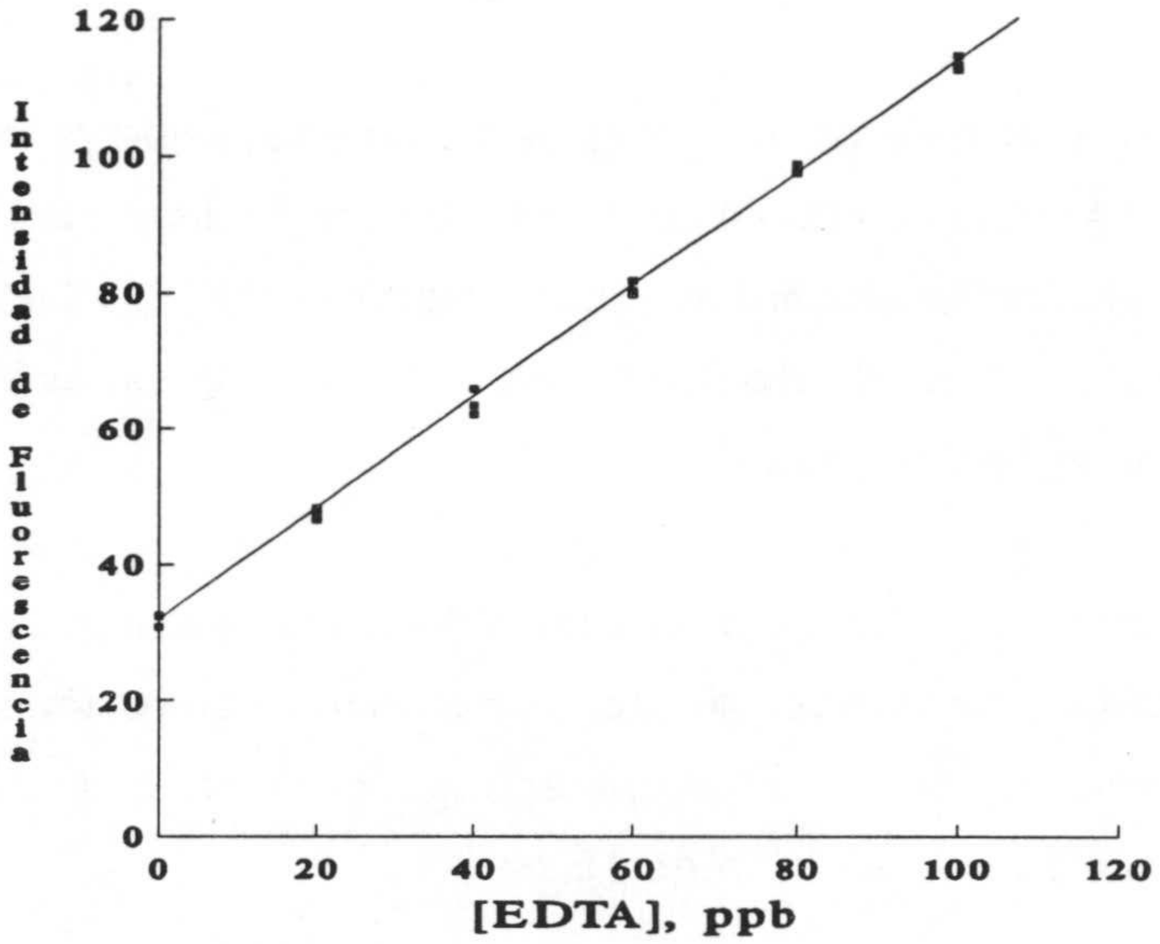


Figura VI.27. Recta de calibrado (20-100 ppb). Rendijas de excitación y emisión 15 nm.

Tabla VI.45

Datos estadísticos de la recta de calibrado

Ordenada en el origen (a) = 31'31

Desviación estándar (s_a) = 0'474 DER(a) = 1'51 %

Pendiente (b) = 0'824

Desviación estándar (s_b) = 0'008 DER (b) = 0'95 %

Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$) = 1'134

Coef. de correlación (r) = 0'9993

Coef. de determinación (r^2) = 99'86 %

g = $4'1.10^{-4}$

Fallo de Ajuste (P= 47'2 %)

En este caso tambien se ha realizado el test del fallo de ajuste, que justifica la adecuación del modelo de regresión lineal a los datos experimentales. Debido a que $F_{cal} = 0'94 < F_{tab}$ ($F_{tab}(0'05, 4, 12) = 3'26$), el ajuste por regresión lineal es correcto con un valor P= 47'2 %.

3.2. PARÁMETROS DE FIABILIDAD

A) *Según la IUPAC*

Límites de detección y cuantificación

Se prepararon 10 muestras de blanco, siguiendo las condiciones operatorias ya optimizadas, para cada uno de los rangos de concentración. Los resultados obtenidos así como su tratamiento estadístico (valor medio y desviación estándar, s) se muestran en la Tabla VI.46 para ambas rectas de calibrado.

Tabla VI.46

Repetitividad del blanco.

Rango 0'2-1'0 ppm		***Rango 20-100 ppb***	
BLANCO	IF	BLANCO	IF
1	9'9	1	32'5
2	10'0	2	30'7
3	9'0	3	32'3
4	9'2	4	32'0
5	9'3	5	31'8
6	9'6	6	33'2
7	9'9	7	30'3
8	10'1	8	30'8
9	9'3	9	31'7
10	9'6	10	30'9
IFm	9'59	IFm	31'62
s	0'378	s	0'925

Precisión

El cálculo de la precisión, basado en la repetitividad de las medidas experimentales para un valor concreto de concentración, se realizó preparando dos series de 10 matraces, cada una de las cuales con un contenido en EDTA perteneciente a cada rango de concentración y a las que se les ha aplicado el procedimiento operatorio correspondiente. Los valores ensayados son:

Rango 0'2-1'0 ppm: 0'4 ppm

Rango 20-100 ppb: 60 ppb

Los resultados obtenidos, se muestran en la Tabla VI.47, en la que se muestran las señales fluorescentes correspondientes a cada matraz, frente a las concentraciones halladas mediante la correspondiente recta de calibrado.

Tabla VI.47

Datos de repetitividad

Rango 0'2-1'0 ppm		***Rango 20-100 ppb***	
IF	[EDTA],ppm	IF	[EDTA],ppb
105'6	0'410	80'2	59'3
104'2	0'404	81'6	61'0
103'7	0'401	79'6	58'6
102'8	0'398	80'8	60'1
103'9	0'403	79'7	58'7
103'2	0'399	81'0	60'3
102'5	0'397	81'8	61'3
105'0	0'407	80'5	59'7
103'0	0'398	80'0	59'1
101'8	0'394	81'2	60'5
[EDTA]	0'401	[EDTA]	59'86
s	0'005	s	0'936

La estimación de todos los parámetros utilizando las expresiones sugeridas por la IUPAC se recoge en la Tabla VI.48.

Tabla VI.48

Parámetros de Fiabilidad según los criterios IUPAC

	Rango 0'2-1'0 ppm	***Rango 20-100 ppb***
Linealidad (r^2 %)	99'94	99'86
Sensibilidad de calibrado (IF/[EDTA])	231'50	0'824
Límite de detección	0'005 ppm	3'38 ppb
Límite de cuantificación	0'016 ppm	11'29 ppb
Precisión, DER %	(0'4 ppm) 1'24 %	(60 ppb) 1'56 %
Rango dinámico lineal	20'0	3'0

B) ***Según el análisis de la regresión***

La sensibilidad analítica y la linealidad se establecen a partir de los datos derivados del calibrado, reflejados en las Tablas VI.43 y VI.45.

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar de los blancos, así como de cada uno de los patrones usados para el establecimiento de las rectas de calibrado, respectivamente. Estos valores se muestran en la Tabla VI.49.

La estimación de todos los parámetros característicos del método, calculados a partir de este modelo aparece en la Tabla VI.50.

Tabla VI.49

Desviaciones estándar en función del calibrado

Rango 0'2-1'0 ppm		***Rango 20-100 ppb***	
[EDTA],ppm	$s/10^{-3}$	[EDTA],ppb	s
0'0	6'3	0	0'978
0'2	5'8	20	0'905
0'4	5'5	40	0'864
0'6	5'5	60	0'863
0'8	5'8	80	0'907
1'0	6'3	100	0'979

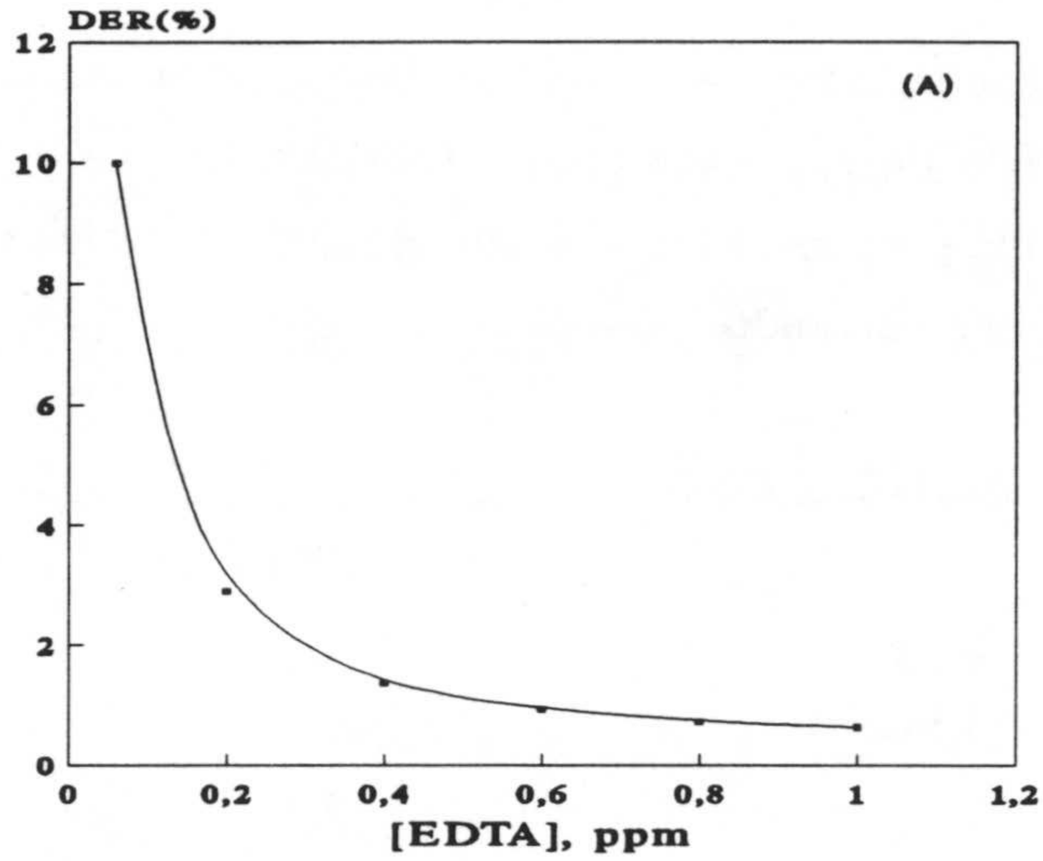
Tabla VI.50

Parámetros de Fiabilidad obtenidos por el modelo de Regresión lineal

	Rango 0'2-1'0 ppm	***Rango 20-100 ppb***
Linealidad (1-DER(b)%)	99'39	99'05
Sensibilidad analítica	0'009 ppm	1'38 ppb
Límite de detección	0'019 ppm	2'93 ppb
Límite de cuantificación	0'063 ppm	9'78 ppb
Rango dinámico lineal	5'2	3'4

Precisión (DER %)				
	0'2 ppm	2'86	20 ppb	4'60
	0'4 ppm	1'36	40 ppb	2'20
	0'6 ppm	0'93	60 ppb	1'45
	0'8 ppm	0'72	80 ppb	1'12
	1'0 ppm	0'63	100 ppb	0'98

La representación gráfica de los valores de DER obtenidos para cada valor de concentración utilizados en el establecimiento de los calibrados se muestra en la Figura VI.51, donde se han incluido los límites de cuantificación para ambos calibrados, a los que por definición le corresponde un 10 % de error.



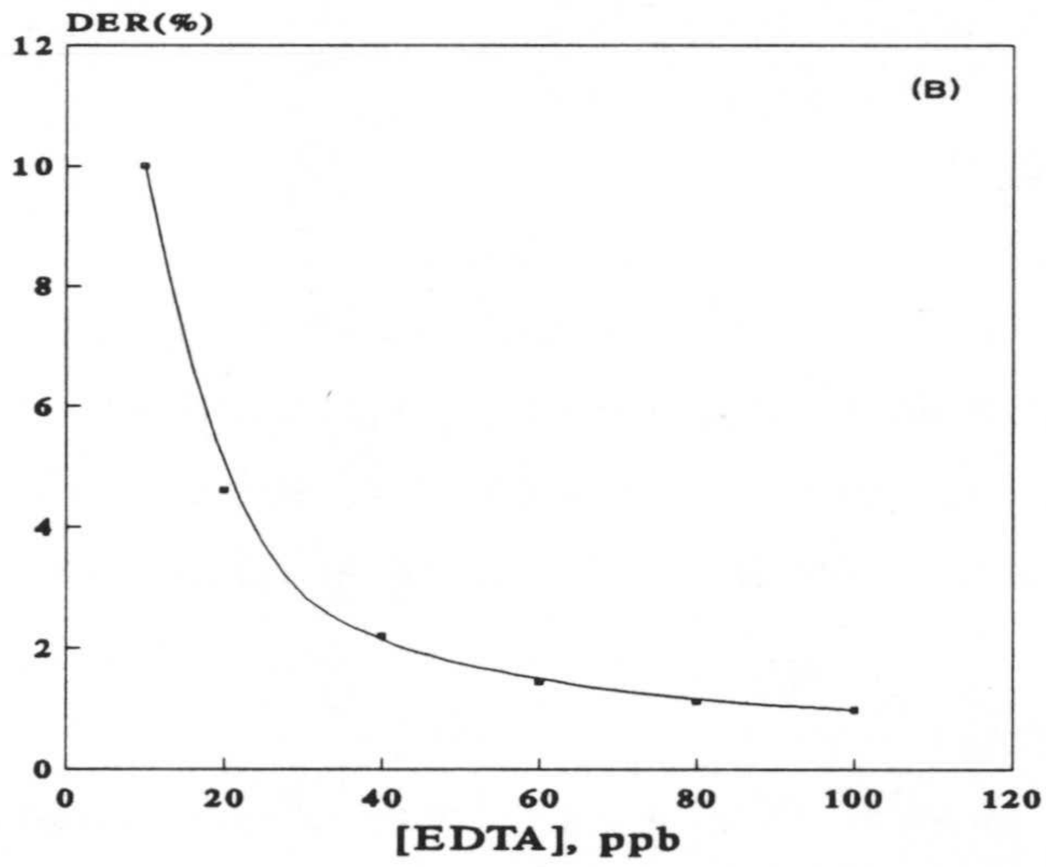


Figura VI.30. Estimación de la precisión. (A) Rango 0'06-1'00 ppm; (B) Rango 10-100 ppb.

C) *Límite de detección de Clayton*

Utilizando la desviación estándar de los blancos, obtenida mediante la aplicación del modelo de regresión lineal (Tabla VI.49), se calcula el límite de detección de la forma propuesta por Clayton, considerando los errores α y β. Los resultados para ambos calibrados son:

$$LD = s_{blanco} \cdot \Delta(\alpha = 0'5, \beta = 0'5)$$

* Rango 0'2-1'0 ppm

  n = 18; Δ(n-2) = 3'44; LD = 0'021 ppm

* Rango 20-100 ppb

  n = 18; Δ(n-2) = 3'44; LD = 3'36 ppb

SELECTIVIDAD

Para llevar a cabo el estudio de posibles interferentes en la determinación fluorimétrica de EDTA por formación del complejo ternario Zr(IV)-EDTA-RAS, se ha obtenido el correspondiente intervalo de confianza sobre la señal de fluorescencia, del valor de concentración de analito sobre el que se realiza el estudio de selectividad.

Las desviaciones estándar y los correspondientes intervalos de confianza para cada señal predicha del rango en el que se lleva a cabo el estudio de interferencias se muestran en la Tabla VI.51.

Tabla VI.51

Desviaciones estándar e intervalos de confianza sobre la señal predicha

[EDTA], ppm	R	s_R	ΔR (±)	ICR
0'2	56'95	2'134	3'73	24'6 - 89'4
0'4	103'25	2'097	3'66	99'6 - 106'9
0'6	149'55	2'097	3'66	145'9 - 153'2
0'8	195'85	2'134	3'73	192'1 - 199'6
1'0	242'15	2'207	3'85	238'3 - 246'0

t(α = 0'10,16 gl) = 1'729

La concentración sobre la que se ha realizado el estudio de la selectividad es de 0'4 ppm, siendo el intervalo de confianza sobre la señal de fluorescencia predicha a partir de los datos del calibrado:

$$IF \epsilon\ 103'25 \pm 3'66$$

Según esto, todos los valores de concentración de ión extraño cuya intensidad de fluorescencia no esté comprendida en el intervalo {99'6 - 106'9}, al cual le corresponde un error relativo sobre la concentración (calculado como $\Delta c/c.100$; $\Delta c = \Delta R/b$) de ± 4'0 %, serán considerados como interferentes.

Considerando la extensa utilización de las sales de EDTA en alimentos en conserva, debido a su efecto secuestrante sobre iones metálicos contaminantes y dado que la aplicación del método propuesto se llevará a cabo en este tipo de matrices, el estudio de posibles interferentes se realizó comprobando el efecto que ejercían sobre la determinación una serie de ingredientes usualmente encontrados en este tipo de alimentos comerciales como son algunos ácidos orgánicos y aminoácidos, a niveles superiores a las dosis permitidas.

La experiencia que se llevó a cabo para este estudio fue la siguiente:

En matraces de 10 ml se introdujo una cantidad de EDTA constante e igual a 0'4 ppm y cantidades decrecientes de cada uno de los iones ensayados como posibles interferentes, disminuyendo la concentración hasta alcanzar un valor de intensidad de fluorescencia comprendido dentro del intervalo de confianza. Posteriormente se aplicó el procedimiento operatorio y se procede a la lectura de la intensidad de fluorescencia a 25°C, despues de 1 hora desde la preparación de los matraces, con rendijas de excitación y de emisión de 7 nm, siendo la λ_{ex} = 478 nm y la λ_{em} = 600 nm.

Todos los valores de señal que no estén incluidos dentro de ese intervalo, deducido a partir de los datos del calibrado, implican que la sustancia es interferente al nivel de concentración ensayado.

Los valores de intensidad de fluorescencia para cada interferente ensayado así como el logaritmo de la concentración y la relación de concentraciones interferente/EDTA ensayadas se muestran en la Tabla VI.52.

A partir de estos se deduce la función polinómica (señal vs. log Cx) que mejor se ajusta a la respuesta de cada interferente, mediante el método interpolación de Lagrange. El punto de corte de este polinómio con la banda superior o inferior del intervalo de confianza obtenido sobre la predicción de la señal correspondiente a 0'4 ppm, indicará la concentración tolerada de sustancia interferente en todo el rango de aplicación del método.

En la Tabla VI.53 se encuentran las concentraciones toleradas por la determinación analítica para cada uno de las sustancias ensayadas, así como la relación de tolerancia máxima permitida.

Tabla VI.52. Estudio de Interferencias

Sust. extraña	Cx/C_{EDTA}	Cx(ppm)	Log Cx	R
Citrato	1000	400	2'60	99'9
Tartrato	1000	400	2'60	59'0
	500	200	2'30	100'3
Oxalato	1000	400	2'60	13'7
	100	40	1'60	39'7
	50	20	1'30	53'3
	25	10	1'00	63'1
	10	4	0'60	99'7
A. Ascórbico	2500	1000	3'00	103'8
F^-	1000	400	2'60	49'7
	100	40	1'60	102'5
Ca(II)	1000	400	2'60	100'5
Aspártico	1000	400	2'60	100'6
Fenilalanina	1000	400	2'60	99'9
Glicina	1000	400	2'60	100'3
Glutámico	1000	400	2'60	102'3
Ca(II)	1000	400	2'60	100'5
Mg(II)	500	200	2'30	99'8
Mn(II)	500	200	2'30	104'3
Fe(III)*	1	0'4	-0'40	53'2
	0'5	0'2	-0'70	99'9
PO_4^{3-}	1000	400	2'60	31'5
	500	200	2'30	100'1

* [L-ascórbico] = 800 ppm

Tabla VI.53. Niveles de tolerancia

Sust. extraña	Cx/C_{EDTA}	c_t (ppm)
Citrato	1000	400
Tartrato	505	202
Oxalato	4	10
Ac. Ascórbico	2500	1000
F^-	113	45
Ca(II)	1000	400
Aspártico	1000	400
Fenilalanina	1000	400
Glicina	1000	400
Glutámico	1000	400
Ca(II)	1000	400
Mg(II)	500	200
Mn(II)	500	200
Fe(III)*	0'5	0'2
PO_4^{3-}	875	350

*** Formación del complejo ternario Zr(IV)-EDTA-RAS a partir de diferentes quelatos metálicos con EDTA**

Con objeto de establecer la posible interferencia de una serie de iones metálicos posiblemente encontrados en alimentos envasados, donde es importante el control del contenido en EDTA adicionado como agente secuestrante, se procedió a estudiar el porcentaje de formación del complejo fluorescente Zr(IV)-EDTA-RAS, a partir de disoluciones sintéticas en las que previamente se habían formado los correspondientes quelatos metálicos con EDTA. De este modo se realiza el estudio de estos posibles interferentes a una concentración esperada en este tipo de alimentos.

Para ello se adicionaron cantidades equimolares de disoluciones de EDTA y de los diferentes iones metálicos para formar los quelatos en relación 1:1 (EDTA:ión), y a concentraciones de EDTA.Na_2 y de metal iguales a 10^{-4} M.

Posteriormente y en matraces de 10 ml se tomó una alícuota de 138 μl de las diferentes disoluciones de modo que el contenido en EDTA a determinar estuviese comprendido dentro del rango lineal ([EDTA]= $1'4.10^{-6}$ M = 0'404 ppm) y se aplicó el procedimiento operatorio, adicionando: 0'6 ml de disolución de Zr(IV) 10^{-4} M, 2'0 ml de disolución reguladora de pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y 0'15 ml de disolución de RAS 10^{-4} M.

Se midió la intensidad de fluorescencia a 25°C, despues de 1 hora desde la preparación de los matraces, con rendijas de excitación y de emisión de 7 nm, siendo la λ_{ex} = 478 nm y la λ_{em} = 600 nm.

Los resultados de este estudio se reflejan en la Tabla VI.54, en la que se reflejan las señales de fluorescencia obtenidas así como la concentración de EDTA determinada fluorimetricamente y el porcentaje de formación del complejo ternario fluorescente Zr(IV)-EDTA-RAS.

En todos los casos se pone de manifiesto que las señales de fluorescencia obtenidas se encuentran dentro del intervalo de confianza calculado anteriormente sobre la señal predicha correspondiente a la concentración de EDTA ensayada (99'6-107'0). Por tanto, esto supone que las desviaciones del 100 % en la formación del complejo fluorescente son debidas al propio error aleatorio y todas las recuperaciones obtenidas son satisfactorias.

En el caso del ión Fe(III), fue necesaria la adición del ácido L-ascórbico que actúa reduciendo el Fe(III) a Fe(II), el cual forma un complejo más débil con EDTA. La interferencia de Sn y Al fue eliminada mediante la adición de Fluoruros debido a que los complejos de estos metales con este ligando son más robustos al pH de trabajo que los formados con EDTA (**69**).

Tabla VI.54

Porcentajes de formación del complejo Zr(IV)-EDTA-RAS en presencia de otros quelatos metálicos ([metal] = 10^{-4} M)

quelato metal-EDTA	R	[EDTA] encont., ppm	Recuperación (%) Zr(IV)-EDTA-RAS
EDTA-Mg	100'9	0'389	97'3
EDTA-Ca	101'9	0'394	98'5
EDTA-Zn	102'8	0'398	99'5
EDTA-Cu	100'5	0'388	97'0
EDTA-Pb	102'8	0,398	99'5
EDTA-Mn	101'4	0'392	98'0
EDTA-Sn*	100'1	0'386	96'5
EDTA-Al*	100'9	0'390	97'5
EDTA-Fe**	102'3	0'396	99'0

* con 40 ppm de F^-
** con 800 ppm de ácido L-ascórbico

3.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Se propone el siguiente método operatorio para la determinación fluorimétrica de EDTA con Zr(IV) y Rojo de Alizarina S en medio catiónico micelar, utilizando diferentes condiciones instrumentales, dependiendo del contenido en la muestra a analizar:

A) *En matraces de 10 ml se introduce la disolución problema de forma que su contenido final esté comprendido entre 0'6-10'0 µg en EDTA, 0'6 ml de disolución de Zr(IV), 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'7, 1'2 ml de disolución de BCTA al 5 % y 1'5 ml de disolución de RAS 10^{-4} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. Se mide la fluorescencia de las muestras transcurrida 1 hora, así como del correspondiente blanco a 600 nm,*

una vez excitadas a 478 nm, manteniendo una temperatura constante de 25 °C y utilizando rendijas de excitación y de emisión de 7 nm.

B) *Se trabaja de igual forma que en el caso anterior, pero en este caso el contenido de EDTA en los matraces de 10 ml debe estar comprendido en el intervalo entre 0'1-1'0 µg. Las rendijas ex/em utilizadas son 15/15 nm.*

La cantidad de EDTA presente se determina a las condiciones instrumentales de la correspondiente recta de calibrado.

4. APLICACIONES ANALÍTICAS

Para comprobar la validez de la determinación fluorimétrica propuesta, se ha realizado el análisis de una serie de alimentos comerciales envasados en los cuales se adiciona el EDTA en forma de sal disódica cálcica (código de aditivo, E-385) o sal disódica (H3247) (**70**).

Estos alimentos son fundamentalmente verduras y legumbres cocidas, así como salsas.

Las muestras seleccionadas para su estudio han sido las siguientes:

- Salsa mahonesa
- Lentejas cocidas
- Garbanzos cocidos

4.1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE EDTA EN SALSA MAHONESA

Tratamiento de la muestra

Se pesan aproximadamente 3 g de muesta que se homogeneizan con agua destilada llevando hasta un volumen final de 50 ml. Con objeto de separar la grasa existente, se toman 2'5 ml del homogenado y se les adiciona 5'0 ml de Cloruro de metileno en un tubo de vidrio provisto de tapón de rosca de 1'5 x 10 cm (con capacidad aproximada de 12 ml). El tubo es sometido a agitación mecánica durante 20 min y a continuación se centrifuga durante 1 min (**58**).

El líquido sobrenadante se separa cuidadosamente con una pipeta descartando la fase orgánica y esta fase acuosa es lavada con 5 ml de eter etílico.

Procedimiento

El contenido en EDTA se determina siguiendo el procedimiento operatorio A, introduciendo, en matraces de 10 ml, alícuotas de disolución de fase acuosa de entre 0'2-1'0 ml, 2'0 ml de ácido L-ascórbico de 5000 ppm, 0'6 ml de disolución de Zr(IV) 10^{-4} M, 2'0 ml de tampón acético/acetato 0'1 M de pH 4'7, 1'2 ml de BCTA al 5% y 1'5 ml de disolución de RAS 10^{-4} M. Se mide la fluorescencia trascurrida 1 hora desde la preparación de los matraces a las condiciones instrumentales ya establecidas.

Determinación del contenido en EDTA en mahonesa

Para comprobar la exactitud de la determinación fluorimétrica propuesta, se ha aplicado la metodología de adición de patrón, llevando a cabo el protocolo estadístico propuesto.

Validación del método mediante la adición de patrón

* *Establecimiento de los Calibrados*

La aplicación de la metodología propuesta requiere el establecimiento de tres calibrados distintos:

- *Calibrado con patrones: CP* (Rango entre 0'2-1'0 ppm, Tabla VI.43)

- *Calibrado con adición de patrón a una cantidad constante de muestra: CA*

Se obtiene mediante adición, de concentraciones crecientes de EDTA a un volumen constante de disolución de muestra tratada igual a 0'5 ml, procedente del tratamiento de 3 g de muestra, una vez eliminada la materia grasa mediante extracción con cloruro de metileno. Las adiciones se realizaron antes de llevar a cabo la extracción de la grasa con objeto de evaluar las pérdidas del analito en este proceso, aplicando posteriormente el procedimiento operatorio.

- *Calibrado de Youden: CY*

Se lleva a cabo introduciendo, en matraces de 10 ml, volúmenes crecientes (0'2, 0'3, 0'5 y 1'0 ml) de la disolución procedente del tratamiento de la muestra (concentración de muestra en la disolución = 0'003 $g.ml^{-1}$), sin adición alguna y aplicando el procedimiento operatorio..

Las señales analíticas correspondientes a los tres calibrados, registradas a las longitudes de onda de 478 y 600 nm, excitación y emisión respectivamente y utilizando rendijas de 7 nm, se muestran en las Tabla VI.54 y quedan representados en la Figura VI.31.

Tabla VI.54

Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA Y CY

	[EDTA] adic. ($\mu g.ml^{-1}$)	[Muestra] ($g.ml^{-1}$)	IF
CA	0'00	0'0030	70'2
	0'24		124'8
	0'48		175'8
	0'72		233'9
CY	0	0'0012	34'9
		0'0018	48'2
		0'0030	73'5
		0'0060	126'0

CA: Calibrado con adición de patrón a la muestra; CY: Calibrado de Youden con porciones de muestra

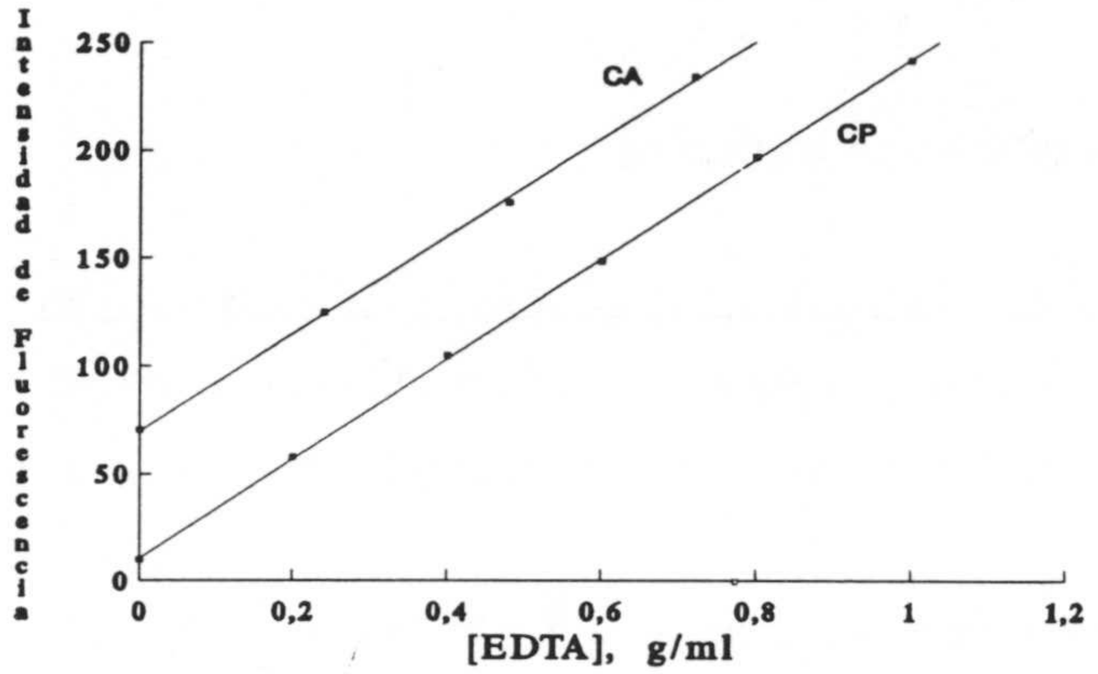
Los parámetros característicos de los tres calibrados se reflejan en la Tabla VI.55.

Tabla VI.55

Valores numéricos de los parámetros correspondiente a las rectas CA, CP Y CY

	CA	CP	CY
n	4	18	4
a	69'86	10'65(±1'80)	14'22
b	225'88	231'50	18811'4
$s_{R,c}$	2'096	2'036	2'538
r	0'9997	0'9997	0'9987

CP: Calibrado con patrones; CA: calibrado con adición de patrón; CY: Calibrado de Youden; n = Puntos del calibrado; a = ordenada en el origen; b = Pendiente; $s_{R,c}$ = Desviación estándar de regresión; r = coefieciente de correlación



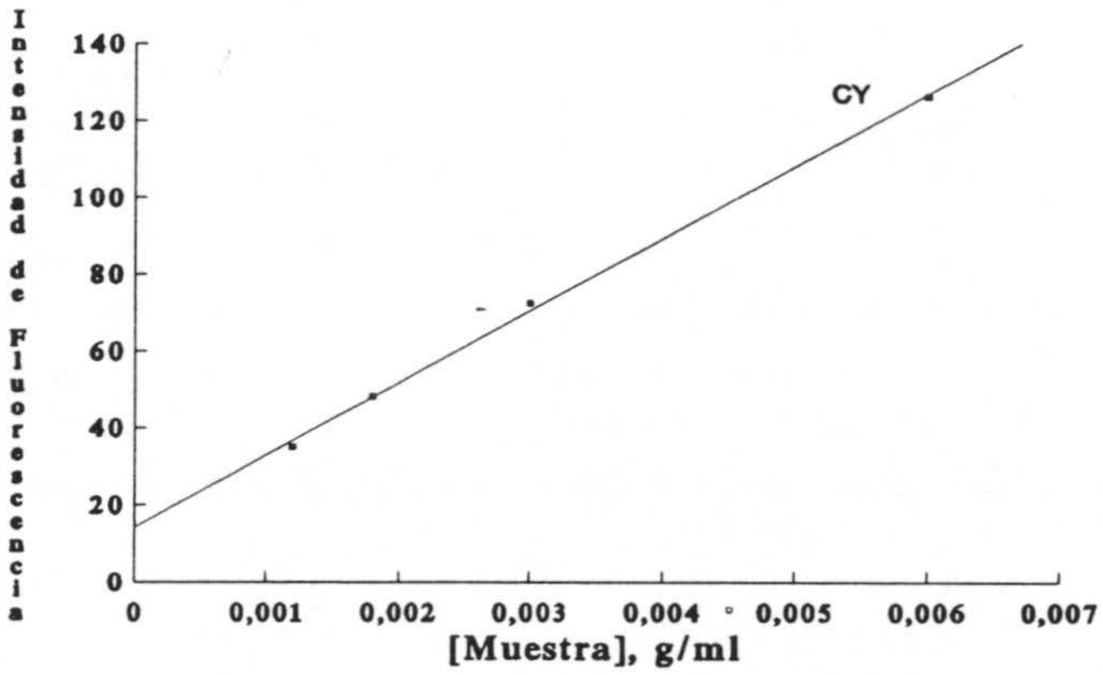


Figura VI.31. Representación de los calibrados: (A) CP: con patrones (0'2-1'0 μg.ml^{-1}); CA: con adición de patrón a 0'0030 g .ml^{-1} de muestra. (B) CY: Calibrado de Youden con 0'0012, 0'0018, 0'0030 y 0'0060 g.ml^{-1} de muestra

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico descrito en el Capítulo I para llevar a cabo la validación del método analítico propuesto.

Los pasos a seguir son:

* *Comparación de Pendientes*

Para comprobar la igualdad de pendientes entre ambos calibrados se calcula un estadístico t(b) en cuya expresión interviene la desviación estándar de regresión promedio, s_p estimada a partir de las correspondientes a los calibrados CP y CA.

Los resultados del test aparecen en la Tabla VI.56.

Tabla VI.56

Resultados de la comparación de pendientes de los calibrados CP y CA

s_p	2'0428
t(b)	1'385* (P= 18'6%)
b_p	230'8174

* t_{tab}(0'01, 18 g.l)= 2'878; P, Porcentaje de la Distribución t de Student; s_p= Desviación estándar de regresión promedio de CP y CA; t(b)= Estadístico t para la comparación de pendientes de CP y CA; b_p= Pendiente promedio de CP y CA.

El valor del estadístico t(b) calculado es menor que el valor t tabulado con un nivel de significación al 1 % para ($n_{CP}+n_{CA}$-4) grados de libertad, por tanto, las pendientes no son significativamente distintas, estimándose un valor promedio b_p entre las pendientes de ambos calibrados y siendo posible la validación.

* *Cálculo de las alturas en el origen. Blanco de Youden*

Utilizando el valor de la pendiente promedio, se calculan los nuevos valores de las ordenadas en el origen para los calibrados con patrones (CP) y con adición (CA).

Debido a que la ordenada del calibrado de Youden no está incluida en el intervalo de confianza de la ordenada del calibrado con patrones, es necesario calcular el "blanco" de la muestra o Blanco de Youden, el cual debe ser restado a todas las medidas fluorimétricas para evitar la contribución de la matriz a la señal analítica.

Estos resultados se muestran en la Tabla VI.57.

Tabla VI.57

Nuevas ordenadas en el origen y Blanco de Youden

		CA	CP	CY
(II)	a'	68'08	10'99	
	BY			3'22

a' = Nuevas ordenadas en el origen de CA y CP calculadas a partir de b_P;
BY = Blanco de Youden.

* *Comprobación de la exactitud*

Se ha llevado a cabo comparando los contenidos de EDTA en la disolución a medir obtenidos utilizando directamente la recta de calibrado y mediante el calibrado con adición de patrón y también calculando la recuperación media obtenida en las sucesivas adiciones y comprobando que no difiere significativamente del 100 %.

A) Comparación de los contenidos de EDTA mediante CP y CA

La comparación del contenido en EDTA en la disolución de medida, obtenido a partir de los dos calibrados CP y CA, se realiza mediante el cálculo del estadístico t(c). Los resultados aparecen en la Tabla VI.58.

Mediante la comparación se comprueba que no existe diferencia significativa entre los contenidos calculados ya que el valor del estadístico t(c) es menor que el valor tabulado para ($n_{CP}+n_{CA}$-3) grados de libertad al nivel de significación seleccionado, aceptándose que el método es exacto con un valor P mayor del 5 %.

En la misma Tabla aparecen los contenidos de EDTA en muestra utilizando ambos calibrados, obtenidos al considerar el factor de dilución correspondiente.

De modo aproximado y mediante el cociente de la pendiente promedio entre CP y CA y la pendiente del calibrado de Youden, CY, es posible la estimación del contenido en EDTA en muestra. El resultado aparece en la última columna de la Tabla VI.58.

Tabla VI.58

Comprobación de la exactitud: contenido en EDTA por CA y CP

	CP	CA	CY
c_{EDTA} ($\mu g.ml^{-1}$)	0'243	0'233	
t(c) =	1'862 (P = 7'8%)		
Valor crítico	2'093 (5%)		
$c_{muestra}$ ($\mu g.g^{-1}$)	80'85	77'79	81'49

c_{EDTA}: Contenido de EDTA en la disolución de medida (10 ml); t(c) = Estadístico calculado para la comparación de contenidos obtenidos por CP y CA; $c_{muestra}$ = Contenido de EDTA en muestra.

B) Ensayos de Recuperación

También hemos comprobado la exactitud del método mediante el cálculo de la recuperación al adicionar a una determinada cantidad de muestra, concentraciones conocidas del analito a determinar, siempre antes de llevar a cabo el proceso de extracción de la materia grasa. De este modo, no sólo se consigue la evaluación de la exactitud, sino también la comprobación de que no existen pérdidas del analito en este proceso.

Considerando las tres adiciones de patrón a un volumen contante de muestra en matraces de 10 ml, se obtiene una recuperación media, cuyo valor es contrastado frente a la unidad, mediante el test de la t de Student, de la forma ya descrita en el Capítulo I.

Se comrueba que el estadístico $t(\Re)$ calculado es menor que el valor tabulado con $(n_{CA}- 2)$ grados de libertad y un nivel de significación del 5 %, lo que implica que la recuperación obtenida del método no es significativamente distinta de 1 (o del 100%) y, por tanto que el método es exacto y no existen pérdidas considerables en el proceso de extracción. Los resultados se muestran en la Tabla VI.59.

Tabla VI.59

Comprobación de la exactitud: Ensayos de Recuperación

[EDTA]adic. ($\mu g.ml^{-1}$)	[Muestra] ($g.ml^{-1}$)	Recuperación $\Re$
0'24	0'003	0'986
0'48		0'954
0'72		0'985

Cálculo aproximado: $\overline{\Re}$ = 0'975; $s_{\Re}$ = 0'0182; $t(\Re)$ = 1'894 (P = 19'8%);Valor crítico 4'303 (5%)

$s_{\Re}$ = Desviación estándar de los valores de recuperación obtenidos;

$t(\Re)$ = Estadístico calculado para comparar la recuperación media frente a la unidad

* *Análisis de la muestra*

Se han llevado a cabo tres análisis de diferentes porciones de muestra, siendo determinado el contenido de EDTA mediante el uso directo de la recta de calibrado una vez eliminado el "Blanco de Youden" o blanco de la muestra, calculado en la experiencia anterior.

Los resultados se muestran en la Tabla VI.60.

Tabla VI.60

Determinación de EDTA en salsa mahonesa

Determinación	$[EDTA]_{muestra}$ ($\mu g.g^{-1}$)
1	80'71
2	81'70
3	83'81

$[EDTA]_m = 82'07\ \mu g.g^{-1}$

$s_{EDTA} = 1'583$

DER = 1'93 % (n = 3)

4.2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN EDTA EN LÍQUIDO SOBRENADANTE DE LEGUMBRES COCIDAS

Tratamiento de la muestra

El único tratamiento requerido consiste en la separación del líquido sobrenadante de lentejas y garbanzos cocidos y envasados y filtración del mismo al vacio mediante un crisol de vidrio molido del nº 4.

Posteriormente se toman 10 ml del mismo y se diluyen con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.

Procedimiento

El contenido en EDTA se determina siguiendo el procedimiento operatorio A, introduciendo, en matraces de 10 ml, alícuotas de la disolución anterior de entre 0'5-2'0 ml, 2'0 ml de disolución de ácido L-ascórbico y 0'4 ml de disolución de F^- 1000 ppm, 0'6 ml de disolución de Zr(IV) 10^{-4} M, 2'0 ml de tampón acético/acetato 0'1 M de pH 4'7, 1'2 ml de BCTA al 5% y 1'5 ml de disolución de RAS 10^{-4} M. Se mide la fluorescencia trascurrida 1 hora desde la preparación de los matraces a las condiciones instrumentales ya establecidas.

Determinación del contenido en el jugo de lentejas cocidas

Dado que desconocemos el contenido de EDTA en este tipo de muestras y debido a que es necesaria la adición de F^- para evitar la interferencia debida a Sn o Al, posiblemente encontrados en este tipo de alimentos, se decidió llevar a cabo una primera determinación del contenido mediante la técnica de adición de patrón con objeto de asegurar la relación de tolerancia permitida para los iones F^-

(relación 1:100, EDTA:F^-). Previamente y con objeto de dar validez a este procedimiento hemos de comprobar que las pendientes del calibrado con patrones y del calibrado con adición de patrón a un volumen constante de muestra no difieren significativamente.

Posteriormente se ha establecido un calibrado de Youden con volúmenes crecientes de disolución de muestra al que se le ha aplicado el procedimiento operatorio A, con objeto de calcular si existe "blanco" de la matriz, que debe ser eliminado de todas la medidas fluorimétricas realizadas.

A todos los matraces se les aplica el procedimiento operatorio descrito anteriormente midiendo la fluorescencia trancurrida 1 hora desde su preparación a las condiciones instrumentales ya establecidas.

Las señales analíticas de cada calibrado se reflejan en la Tabla VI.61 y se representan en la Figura VI.32.

Tabla VI.61

Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA Y CY

	[EDTA] adic. ($\mu g.ml^{-1}$)	[Muestra] ($ml.ml^{-1}$)	IF
CA	0'4	0'002	125'7
	0'6		173'2
	0'8		212'0
CY	0	0'010	120'5
		0'015	181'3
		0'018	200'0

CA: Calibrado con adición de patrón a la muestra; CY: Calibrado de Youden con porciones de muestra

Los parámetros característicos de los tres calibrados se reflejan en la Tabla VI.62.

Tabla VI.62

Valores numéricos de los parámetros correspondiente a las rectas CA, CP Y CY

	CA	CP	CY
n	3	18	3
a	40'85	10'65(± 1'80)	21'58
b	215'75	231'50	10164'0
$s_{R,c}$	3'552	2'036	8'980
r	0'9983	0'9997	0'9983

CP: Calibrado con patrones; CA: calibrado con adición de patrón; CY: Calibrado de Youden; n = Puntos del calibrado; a = ordenada en el origen; b = Pendiente; $s_{R,c}$ = Desviación estándar de regresión; r = coefieciente de correlación

Tabla VI.63

Resultados de la comparación de pendientes de los calibrados CP y CA

s_p	2'1549
t(b)	2'028* (P = 6'0%)
b_p	230'917

* t_{tab}(0'01, 18 g.l) = 2'878; P, Porcentaje de la Distribución t de Student; s_p = Desviación estándar de regresión promedio de CP y CA; t(b) = Estadístico t para la comparación de pendientes de CP y CA; b_p = Pendiente promedio de CP y CA.

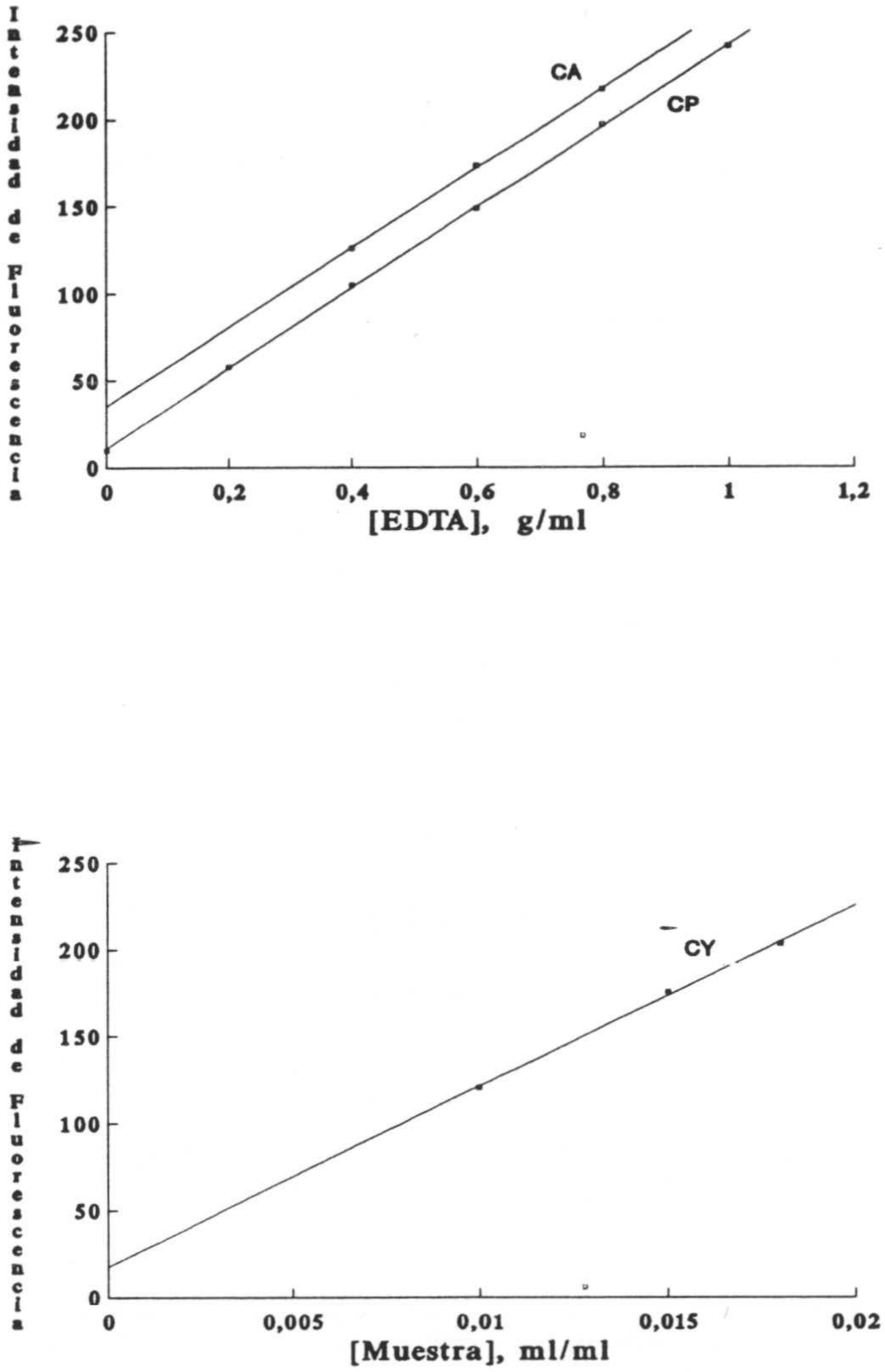


Figura VI.32. Representación de los calibrados: (A) CP: con patrones (0'2-1'0 μg.ml^{-1}); CA: con adición de patrón a 0'002 ml.ml^{-1} de muestra. (B) CY: Calibrado de Youden con 0'010, 0'015 y 0'018 ml.ml^{-1} de muestra

* *Comparación de Pendientes*

Los resultados del test aparecen en la Tabla VI.63, donde se muestra el estadístico t(b) en cuya expresión interviene la desviación estándar de regresión promedio, s_P estimada a partir de las correspondientes a los calibrados CP y CA.

Se observa que no existe diferencia significativa entre ambas pendientes y por tanto es posible el uso de la recta de adición de patrón para determinar el contenido de analito.

* *Cálculo del Blanco de Youden*

El cálculo se realiza restando a la ordenada en el origen obtenida en el calibrado con porciones de muestra, el valor de la ordenada en el origen del calibrado con patrones:

$$BY = a_{CY} - a_{CP} = 21'55 - 10'65 = 10'9$$

* *Comprobación de la exactitud*

La comprobación de la exactitud se ha realizado en este caso mediante ensayos de recuperación, calculando ésta al adicionar a una determinada cantidad de muestra, concentraciones conocidas de EDTA incluidas en el rango lineal.

Considerando las tres adiciones de patrón a un volumen contante de disolución de muestra e igual a 0'2 ml en matraces de 10 ml, se obtiene una recuperación media, cuyo valor es contrastado frente a la unidad, mediante el test de la t de Student.

Como el estadístico t($\Re$) calculado es menor que el valor tabulado con (n_{CA}-2) grados de libertad y un nivel de significación del 5 %, la recuperación obtenida del método no es significativamente distinta de 1 (o del 100%) y, por tanto que el método es exacto.

Los resultados se muestran en la Tabla VI.64.

Tabla VI.64

Comprobación de la exactitud: Ensayos de Recuperación

[EDTA]adic. ($\mu g.ml^{-1}$)	[EDTA]enc ($\mu g.ml^{-1}$)	Recuperación $\Re$
0'0	0'0893	----------
0'4	0'4510	0'922
0'6	0'6562	0'952
0'8	0'8540	0'960

Cálculo aproximado: $\overline{\Re}$ = 0'9447; $s_{\Re}$ = 0'0200; t($\Re$) = 3'694 (P=6'6%);Valor crítico 4'303 (5%), $s_{\Re}$ = Desviación estándar de los valores de recuperación obtenidos;
t($\Re$) = Estadístico calculado para comparar la recuperación media frente a la unidad

* *Análisis de la muestra*

Se han llevado a cabo tres análisis de diferentes porciones de la disolución de muestra, comprendidos entre 0'5 y 1'0 ml, siendo determinado el contenido de EDTA mediante el uso directo de la recta de calibrado una vez eliminado el "Blanco de Youden" o blanco de la muestra, calculado en la experiencia anterior.

Los resultados se muestran en la Tabla VI.65.

Tabla VI.65

Determinación de EDTA en líquido de lentejas cocidas

Determinación	$[EDTA]_{muestra}$ ($\mu g.ml^{-1}$)
1	44'61
2	45'85
3	42'86

$[EDTA]_m = 44'44\ \mu g.ml^{-1}$

$s_{EDTA} = 1'502$

DER = 3'38 % (n = 3)

La estimación aproximada del contenido de EDTA en muestra mediante el cociente de las pendientes de los calibrados de Youden y la obtenida como promedio de los calibrados CP-CA, da como resultado:

$$b_{CY}/b_p = 44'02\ \mu g.ml^{-1}$$

Determinación del contenido de EDTA en el jugo de garbanzos cocidos

En este caso operaremos de igual modo que en la muestra anterior, llevando a cabo una primera determinación del contenido mediante la técnica de adición de patrón con objeto de asegurar la relación de tolerancia permitida para los iones F^- utilizados como enmascarantes (relación 1:100, EDTA:F^-) una vez comprobada la igualdad de pendientes entre el calibrado con adición y el calibrado con patrones.

Tambien se establece un calibrado de Youden con volúmenes crecientes de disolución de muestra al que se le ha aplicado el procedimiento operatorio A, para calcular el "blanco" de la matriz.

A todos los matraces se les aplica el procedimiento operatorio descrito anteriormente midiendo la fluorescencia trancurrida 1 hora desde su preparación

a las condiciones instrumentales ya establecidas.

Las señales analíticas de cada calibrado se reflejan en la Tabla VI.66 y se representan en la Figura VI.33.

Tabla VI.66

Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA Y CY

	[EDTA] adic. (μg.ml^{-1})	[Muestra] (ml.ml^{-1})	IF
CA	0'2	0'002	124'0
	0'4		163'8
	0'6		210'0
CY	0	0'010	135'3
		0'015	202'0
		0'020	255'9

CA: Calibrado con adición de patrón a la muestra; CY: Calibrado de Youden con porciones de muestra

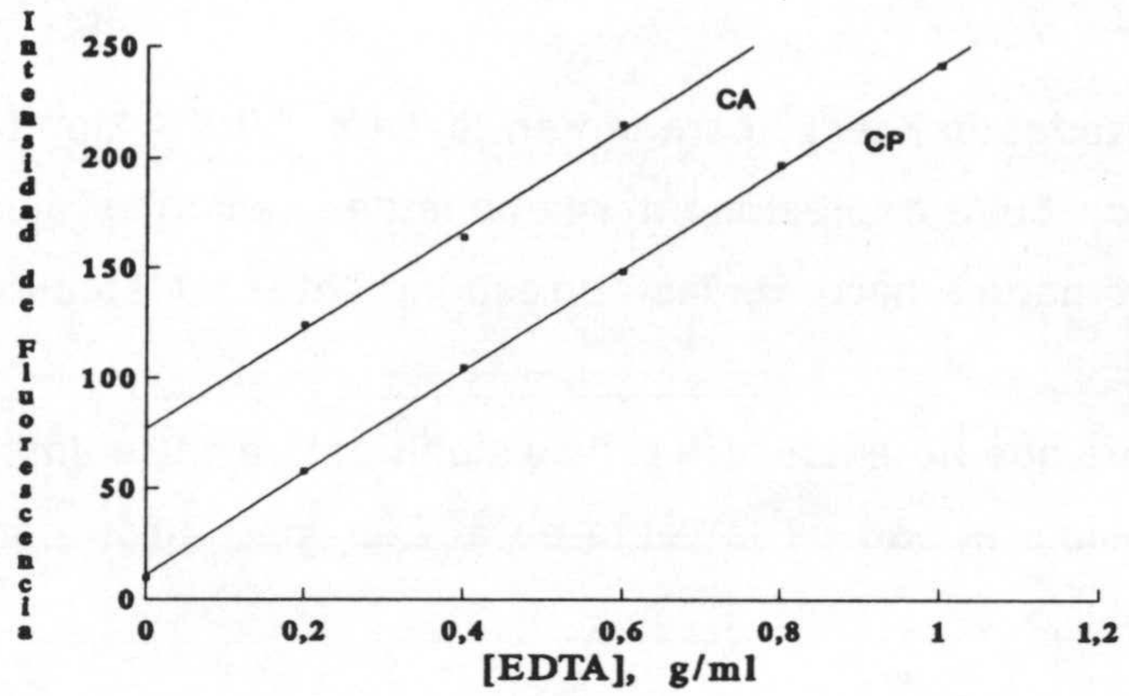
Los parámetros característicos de los tres calibrados se reflejan en la Tabla VI.67.

Tabla VI.67

Valores numéricos de los parámetros correspondiente a las rectas CA, CP Y CY

	CA	CP	CY
n	3	18	3
a	79'93	10'65(±1'80)	16'83
b	215'00	231'50	12060'0
$s_{R,c}$	2'613	2'036	5'23
r	0'9991	0'9997	0'9981

CP: Calibrado con patrones; CA: calibrado con adición de patrón; CY: Calibrado de Youden; n= Puntos del calibrado; a= ordenada en el origen; b= Pendiente; $s_{R,c}$= Desviación estándar de regresión; r= coefieciente de correlación



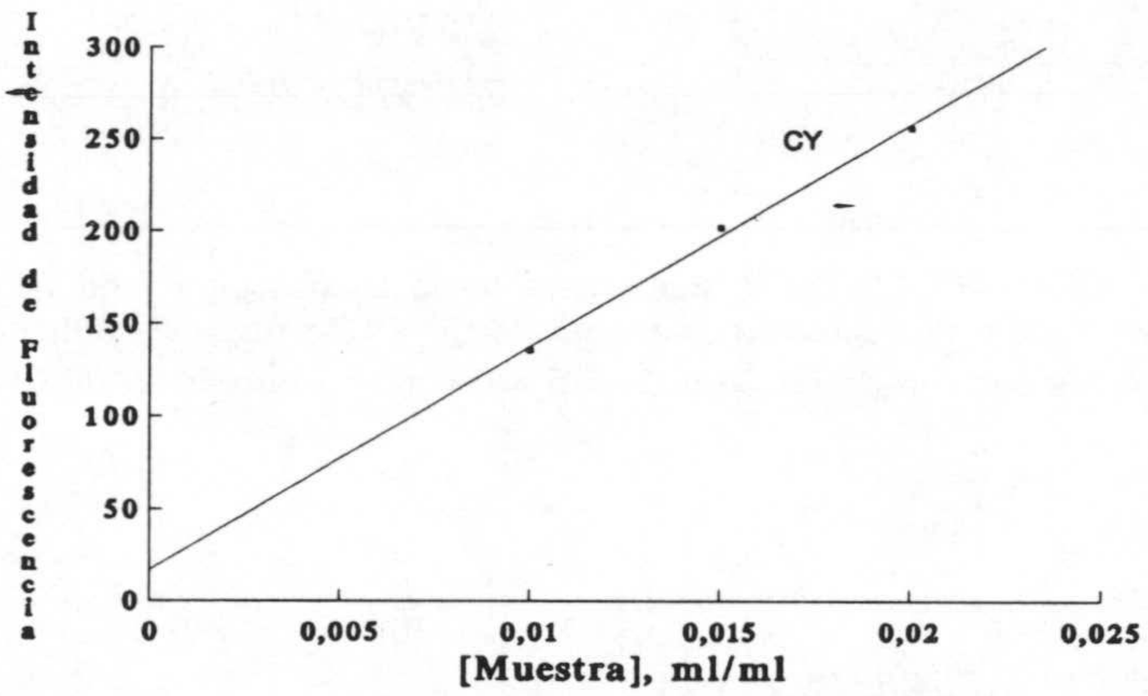


Figura VI.33. Representación de los calibrados: (A) CP: con patrones (0'2-1'0 $\mu g.ml^{-1}$); CA: con adición de patrón a 0'002 $ml.ml^{-1}$ de muestra. (B) CY: Calibrado de Youden con 0'010, 0'015 y 0'020 $ml.ml^{-1}$ de muestra

* *Comparación de Pendientes*

Los resultados del test aparecen en la Tabla VI.68, donde se muestra el estadístico t(b) en cuya expresión interviene la desviación estándar de regresión promedio, s_p estimada a partir de las correspondientes a los calibrados CP y CA.

Se observa que no existe diferencia significativa entre ambas pendientes y por tanto es posible el uso de la recta de adición de patrón para determinar el contenido de analito.

Tabla VI.68

Resultados de la comparación de pendientes de los calibrados CP y CA

s_p	2'0744
t(b)	2'2075* (P= 4'0%)
b_p	230'889

* t_{tab}(0'01, 18 g.l)= 2'878; P, Porcentaje de la Distribución t de Student; s_p= Desviación estándar de regresión promedio de CP y CA; t(b)= Estadístico t para la comparación de pendientes de CP y CA; b_p= Pendiente promedio de CP y CA.

* *Cálculo del Blanco de Youden*

Restando a la ordenada en el origen obtenida en el calibrado con porciones de muestra, el valor de la ordenada en el origen del calibrado con patrones se obtiene:

$$BY = a_{CY} - a_{CP} = 16'83 - 10'65 = 5'98$$

* *Comprobación de la exactitud*

Se lleva a cabo mediante ensayos de recuperación, calculando ésta al adicionar a una determinada cantidad de muestra, concentraciones conocidas de EDTA incluidas en el rango lineal.

Considerando las tres adiciones de patrón a un volumen contante de muestra e igual a 0'5 ml en matraces de 10 ml, se obtiene una recuperación media, cuyo valor es contrastado frente a la unidad, mediante el test de la t de Student.

Se observa que la recuperación media obtenida no es significativamente distinta de 1 (o del 100%) y, por tanto que el método es exacto.

Los resultados se muestran en la Tabla VI.69.

Tabla VI.69

Comprobación de la exactitud: Ensayos de Recuperación

[EDTA]adic. ($\mu g.ml^{-1}$)	[EDTA]enc ($\mu g.ml^{-1}$)	Recuperación $\Re$
0'0	0'2741	----------
0'2	0'4638	0'978
0'4	0'6358	0'943
0'6	0'8353	0'956

Cálculo aproximado: $\overline{\Re}$ = 0'959 ; $s_{\Re}$ = 0'0177; $t(\Re)$ = 3'142 (P=8'8%);Valor crítico 4'303 (5%)

$s_{\Re}$ = Desviación estándar de los valores de recuperación obtenidos;

$t(\Re)$ = Estadístico calculado para comparar la recuperación media frente a la unidad

* *Análisis de la muestra*

Se han llevado a cabo tres análisis de diferentes porciones de la disolución de muestra, comprendidos entre 0'5 y 2'0 ml, determinando el contenido de EDTA mediante el uso directo de la recta de calibrado una vez eliminado el "Blanco de Youden" o blanco de la muestra.

Los resultados se muestran en la Tabla VI.70.

Tabla VI.70

Determinación de EDTA en líquido de garbanzos cocidos

Determinación	$[EDTA]_{muestra}$ ($\mu g.ml^{-1}$)
1	54'82
2	55'69
3	51'70

$[EDTA]_m = 54'07\ \mu g.ml^{-1}$

$s_{EDTA} = 2'098$

DER = 3'88 % (n = 3)

El cálculo aproximado del contenido en muestra mediante el cociente de las pendientes da como resultado:

$$b_{CY}/b_p = 52'23\ \mu g.ml^{-1}$$

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

VI.1. L.O. Morgan y N.L. Justus, "Complex componds of Zirconium (IV) and Hafnium (IV) with EthylenediaminetetraceticAcid", *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 38 (1956).

VI.2. B.I. Intorre y A.F. Martell, "Zirconium complexes of aqueous solution. I. Reaction with Multidentate ligands", *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 338 (1960).

VI.3. B.I. Intorre y A.E. Martell, "Aqueous Zirconium complexes. II. Mixed chelates", *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3618 (1961).

VI.4. J.H. De Boer, *Rev. Trav. Chim. Pays-Bas*, **44**, 1070 (1925).

VI.5. G. Charlot y D. Bezier, "New procedure for the detection of cations", *Ann. Chim. Anal.*, **25**, 90 (1943).

VI.6. P. Wenger, R. Duckert y Y. Rusconi, "Critical Study of reagents for cations. XVIII. Test for Zirconium". *Helv. Chim. Acta*, **28**, 929 (1945).

VI.7. J.M. Yoe y L.G. Overholser, *Ind. Eng. Chem. Annal. Ed.*, **15**, 73 (1943).

VI.8. D.E. Green, "Colorimetric Determination of Zirconium", *Anal. Chem.*, **20**, 370 (1948).

VI.9. N.A. Tananaev y R.F. Khovyakova, "Detection and determination of small amounts of zirconium in platinum", *Zhns. Obshchei Khim. (J. Gen. Chem.)*, **21**, 808-12 (1951).

VI.10. A. Mayer y G. Bradshaw, "The adsorptionmetric determination of zirconium by means of Alizarin-S with special reference to magnesium alloys". *Analyst*, **77**, 476 (1952).

VI.11. R.E. Connick y W.W. Reas, "The hydrolisis and Polymerization of Zirconium in Perchloric Acid solution", *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1171 (1951).

VI.12. G.B. Wenger, "Photometric determination of Zirconium in magnesium alloys", *Anal. Chem.*, **24**, 1449 (1952).

VI.13. O. Gübeli y A. Jacob, "The colorimetric determination of Zirconium with Alizarin S", *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1026-32 (1955).

VI.14. V.I. Kuznesov, L.M. Budanova y T.V. Malforova, *Zavosdskaya Lab.* ,**22**, 406 (1956).

VI.15. V.G. Goryshina y V.M. Vladimitova, *Ibid*, **22**, 1171 (1956).

VI.16. E.C. Mills y S.E. Hermon, "The photometric Determination of Zirconium in Hiduminium RR 350 and similar alloys", *Metallurgia*, **51**, 157 (1955).

VI.17. H. Degenhardt, "Determination of small amounts of zirconium in rocks, minerals and waters", *Z. Anal. Chem.*, **153**, 327 (1956).

VI.18. H. Degenhardt, *Geochim. et Cosmochim. Acta*, **11**, 279 (1957).

VI.19. L. Silverman y D.W. Hawley, "Spectrophotometric Determination of Zirconium in chromium", *Anal. Chem.*, **28, 5**, 806 (1956).

VI.20. D.L. Manning y J.C. White, "Differential spectrophotometric determination of Zirconium", **27**, 1389 (1955).

VI.21. W. Freund y W.F. Holbrook, "Differential Spectrophotometric determination of Zirconium in presence of hafnium", *Anal. Chem.*, **30(4)**, 462 (1958).

VI.22. F. Capitán, F. Salinas y J. Cobo, "Determinación espectrofotométrica de Zr(IV) y de Fluoruros empleando Ácido Rufigálico como reactivo", *Rev. Soc. Venez. Quím.*, **8, nº 415**, 163 (1972).

VI.23. M. Román y E. Alvarez-Manzaneda, "Nuevos métodos de determinación espectrofotométrica de Zr(IV), Ni(II) y Co(II) mediante Purpurinsulfonato sódico", *Quím. Anal.*, **29**, 253 (1975).

VI.24. K.A. Idriss, M.M. Selerhn, M.S. Saleh, M.S. Aba-Baks y H. Sedaira, *Analyst*, **113**, 1643 (1988).

VI.25. F. Sánchez Rojas, *Afinidad*, **45**, 222 (1988).

VI.26. R. López Núñez, M. Callejón Monchón y A. Guiraum Pérez, "Spectrophotometric study of a ternary Zirconium /Fluoride/ Alizarin Complex with application to the determination of Zirconium", *Anal. Chim. Acta*, **192**, 119 (1987).

VI.27. W.C. Alford, L. Shapiro y Ch.E. White, "Fluorometric determination of zirconium in minerals", *Anal. Chem.*, **23**; 1149-1152 (1951).

VI.28. I.P. Alimarin, E.A. Bozhevolnov y L.B. Agasyan, "Dasticin: a new fluorimetric reagent for zirconium", *Zh. Analit. Khim.*, **17**, 591 (1962).

VI.29. T. Files, "Fluorimetric determination of submicrogram of quantities of zirconium", *Anal. Chem.*, **43**, 469 (1971).

VI.30. P. Ilo y A. Murata, *Bunseki Kagaku,* **23**, 274 (1974).

VI.31. Sh. P. Talipov, L.E. Zel'tser, L.A. Morozova y A.T. Tashkhodzhaev, "Luminiscent determination of zirconium and hafnium with myricetin", *Zavod.*

Lab., **44(9)**, 1052 (1978).

VI.32. R.A. Geiger y E.B. Sandell, "Fluorimetric determination of Zr with morin", *Anal. Chem. Acta*, **16**, 347 (1957).

VI.33. R.N. Plotnikova, D.V. Perminova y D.P. Scherbov, "Fluorescent reaction of Zr with morin in presence of Complexone III", *Prom. Khim. Reaktinov Osobo Chistylih Veshchstv*, **nº8**, 197 (1967).

VI.34. S. Gan, R. Huang y S. Zhang, "Spectrofluorimetric determination of traces of Zr in geological samples with isolation by cationic exchange", *Fenxi Huaxue*, **14(11)**, 864 (1986).

VI.35. A.T. Pilipenko, A.I. Volkova y Z. Vasil'chnk, *Zh. Anal. Khim.*, **41(9)**, 113 (1984).

VI.36. A.T. Pilipenko, A.I. Volkova y Z. Vasil'chnk, *Zh. Anal. Khim.*, **41(9)**, 1609 (1986).

VI.37. L.E. Zel'tser, N.G. Vereshchagina y A.V. Bychenko, "Application of inmobilized morin by adsorption to fluorimetric determination of Zr and Sn", *Zh. Anal. Khim.*, **46(10)**, 2041 (1991).

VI.38. D.M. Hércules, "Fluorimetric determination of Zirconium with quercetin", *Talanta*, **8**, 485 (1961).

VI.39. S.R. Desai y K. Sudhalatha, "Fluorimetric determination of micro amounts of zirconium with quercetin on filter paper", *Anal. Chim. Acta*, **55**, 395 (1971).

VI.40. L.A. Morozova, Sh.T. Talipov, L.E. Zel'tser, A.T. Tashikhodzhaev y Z.P. Pakadina, "Luminiscent method for determining Zr with quercetin-7-glucoside", *Dokl. Akad. Nank. Urb. SSR.*, **1**, 43 (1979).

VI.41. L.E. Zel'tser, L.A. Morozova, y Sh.T. Talipov, "Fluorimetric determination of Aluminium, Scandium, Zirconium and Hafnium in natural and waste waters by using polyhidroxiflavones", *Zh. Anal. Khim.*, **35(A)**, 97 (1980).

VI.42. L.E. Zel'tser, Sh.T. Talipov y L.A. Morozova, *Zh. Anal. Khim.*, **35(9)**, 1747 (1980).

VI.43. T. Ito, O. Suzuki, T. Suzuki, T y A. Murata, "Spectrofluorimetric determination of Hafnium and Zirconium with 5,7-Dihydroxyflavone", *Analyst*, **111**, 423 (1986).

VI.44. R.V. Hems, G.F. Kirkbrigh y T.S. West, "Spectrofluorimetric determination of submicrogram amounts of Zirconium with Calcein Blue", *Anal. Chem.*, **42**, 784 (1970).

VI.45. T.L. War y T.S. West, *Anal. Chem.*, **43**, 136 (1971).

VI.46. H.O. Schneider y M.E. Roselli, "The fluorimetric determination of Zirconium as 8-hydroxyquinolinate in the presence of Titanium, Tungsten and Molybdenum", *Analyst*, **96**, 330 (1971).

VI.47. Q. Zhuco, G. Cheng y N. Liw, *Fenxi Huaxue*, **18(9)**, 132 (1990).

VI.48. A.T. Tashkodzhaev, L.E. Zel'tser y Kh. Khikmatov, "Luminiscent reaction of the complexing of salicylidene-4-aminoantripyrine with Zr", *Uzb. Khim. Zh.*, **16(3)**, 22 (1972).

VI.49. Sh. Talipov, T.A. Tashkodzhaev, L.E. Zel'tser y Kh. Khikmatov, "Luminiscent method for determining Zr with 4-salicylidencaminoantipyrine", *Dokl. Akad. Nauk. Uzb. SSR.*, **29(5)**, 34 (1972).

VI.50. A.T. Tashkodzhaev, Sh.T. Talipov, L.E. Zel'tser y Kh. Khikmatov, "Luminiscent reaction of β-hydroxynaphtal-4-aminoantipyrinewith Zr", *Dokl. Akad. Uzb. SSR.*, **30(9)**, 26 (1973).

VI.51. T.V. Ramakrishna y M.S. Subramanian, *Bull. Soc. Japan*, **56(1)**, 321 (1983).

VI.52. M.A. Cejas, A. Gómez-Hens y M. Valcárcel, "Spectrofluorimetric determination of Titanium, Zirconium and Hafnium and their binary mixture with biacetylmonoxine nicotinylhydrazone", *Anal. Chem. Acta*, **158**, 287 (1984).

VI.53. S. Rubio, A. Gómez-Hens y M. Valcárcel, "Spectrofluorimetric determination of Titanium, Zirconium and Hafnium and their binary mixtures with biacetylmonoxine nicotinylhydrazone", *Anal. Chim. Acta*, **158**, 287 (1994).

VI.54. B.K. Pal y B. Choudhurry, "Triazen-N-oxides as fluorimetric reagents. Determination of Zr at nanogram levels", *Mikrochim. Acta*, **II(1-2)**, 121 (1984).

VI.55. B.K. Pal y B. Choudhurry, "Fluorimetric determination of Zirconium with 3-2-Carboxyphenyl-1-methyltriazen-N-oxide", *Indian J. Chem. Sect. A.*, **25A(5)**, 496 (1986).

VI.56. J.H. Yoe y A.L. Jones, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **16**, 111 (1944).

VI.57. E.M. Larsen y T. Hirozawa, *J. Inorg. Nuclear Chem.*, **3**, 198 (1956).

VI.58. C. Retho y L. Diep, "Low-level determination of Ethylenediaminetetraacetic Acid in complex matrices", *Z. Lebensm Unters Forsch*, **188**, 223, (1989).

VI.59. G.A. Perfetti y C.R. Warner, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 1092, (1979).

VI.60. J. de Jong, A. Van Polanen y J.M. Driessen, "Determination of Ethylenediaminetetraacetic acid and its salts in cannned mushrooms by reversed-phase ion-pair liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, **553**, 243, (1991).

VI.61. D.L. Venezky y W.E. Rudzinski, "Determination of Ethylenediaminetetraacetic Acid in boiler water by Liquid Chromatography", *Anal. Chem.*, **56**, 315, (1984).

VI.62. C. Retho, D. Maitre, F. Blanchard y L. Diep, "Dosage de L'EDTA dans les conserves de crustaces", *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **83**, 145, (1990).

VI.63. P.J. Sniegoski, D.L. Venezky, *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 359, (1974).

VI.64. *Ann. Book ASTM Stand.*, ASTM D3113-80 Parte 31 (Water), 727, (1982).

VI.65. T. Hamano, Y. Mitsuhashi, S. Yamamoto, Y. Matsuki, Y. Tonogai, K. Nakamura y Y. Ito, "Detemination of EDTA in food by colorimetric", *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **34**(9), 603, (1987).

VI.66. T. Hamano, Y. Mitsuhashi, N. Kojima,N. Aoki, M. Shibata, Y. Ito y Y. Oji, "Sensitive Spectrophotometric method for the determination of EthylenediaminetetraaceticAcid in Foods", *Analyst*, **118**, 909, (1993).

VI.67. A.G. Fogg, M.A. Fernández-Arciniega y R.M. Alonso, "Amperometric flow injection determination of EDTA at an electrōchemically pre-treated Glassy Carbon Electrode", *Analyst*, **110**, 1201 (1985).

VI.68. M. Fayyad, M. Tutunji, Z. Taha, "Indirect determination of EDTA in water by Potentiometric Stripping Analysis", *Anal. Lett.*, **21**(8), 1425 (1988).

VI.69. S. Kotrly y L. S. Sucha. *"Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry"*. Ellis Horwood limited. John Wiley & Sons. New York (1985). p.290.

VI.70. Ministerio de Sanidad y Consumo. *"Aditivos e impurezas de los alimentos"*. Vol. XXIII, (1991).

CAPÍTULO VII

DETERMINACIÓN CONJUNTA DE B(III) Y Mo(VI) CON ROJO DE ALIZARINA S POR ESPECTRO-FLUORIMETRÍA SINCRÓNICA-DERIVADA

1. INTRODUCCIÓN

Fluorescencia sincrónica

Esta técnica, introducida por Lloyd (**1**), consiste en el registro de un espectro manteniendo constante un intervalo de longitudes de onda, $\Delta\lambda$, entre las longitudes de onda de excitación y de emisión en las medidas, de modo que si el $\Delta\lambda$ seleccionado corresponde a la diferencia entre las longitudes de onda de los máximos de los espectros convencionales de excitación y emisión, el espectro se simplifica notablemente, sin perder sensibilidad, dando, con frecuencia un solo pico relativamente estrecho.

La intensidad de fluorescencia sincrónica , I_s, depende de las características de los espectros de excitación y emisión convencionales, así como de la diferencia entre las longitudes de onda de excitación y de emisión, $(\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{em})$, y teniendo en cuenta que esta diferencia se mantiene constante a lo largo del barrido que se efectúa, la intensidad puede expresarse:

$$I_s = K\ c\ d\ E_{ex}(\lambda_{ex})\ E_{em}\ (\lambda_{ex} + \Delta\lambda)$$

o alternativamente:

$$I_s = K\ c\ d\ E_{ex}(\lambda_{ex} - \Delta\lambda)\ E_{em}(\lambda_{em})$$

siendo E_{ex} la función de excitación a una longitud de onda dada, E_{em} es la intensidad de emisión a la correspondiente longitud de onda de emisión, c es la concentración de analito, d es la anchura de paso de luz y k es una constante que comprende el "factor de geometría instrumental" y parámetros relacionados (**2**).

De estas expresiones se deduce que la señal sincrónica depende tanto del espectro de excitación como del de emisión, por lo que la selectividad se incrementa notablemente en esta técnica. El espectros sincrónico presenta una mayor simplicidad que el espectro normal, obteniéndose bandas más estrechas y mejor definidas.

La principal dificultad en la aplicación de esta técnica consiste en la correcta selección del $\Delta\lambda$ utilizado en la realización del barrido sincrónico. La selección debe hacerse de forma empírica, siendo de gran utilidad la representación tridimensional λ_{ex}-λ_{em}-fluorescencia. Estos espectros , también conocidos como matrices excitación-emisión, espectros de contornos o espectros de luminiscencia total, permiten obtener las denominadas curvas de nivel, que son representaciones en las cuales la serie de espectros se orienta perpendicularmente a un plano y se unen puntos de igual intensidad de fluorescencia.

En este tipo de representación, la zona donde un compuesto fluoresce viene dada por una superficie; la diagonal a la representación corresponde a la reflexión Rayleigh ($\lambda_{ex}=\lambda_{em}$). La representación sincrónica correspondería a una línea parecida a la diagonal, o sea con ángulo de 45°, separada por una distancia $\Delta\lambda$ ($\lambda_{em}=\lambda_{ex}+\Delta\lambda$). Con esta representación es posible seleccionar un $\Delta\lambda$ que haga que la línea que representa el sincrónico no pase (o pase lo menos posible) por las zonas de solapamiento, donde se superponen las superficies correspondientes a diferentes componentes.

Espectrofluorimetría sincrónica-derivada

Para mejorar los resultados en el análisis multicomponente, se desarrolló la combinación de la fluorimetría sincrónica con las técnicas de derivación (**3**,**4**). De este modo las bandas agudas se intensifican y las bandas anchas desaparecen o disminuyen apreciablemente. El principal efecto que se consigue es un incremento de la selectividad con respecto al procedimiento sincrónico ordinario.

La combinación de fluorescencia sincrónica y derivadas origina además un incremento de los valores de la relación señal/ruido obtenidos, con respecto a los que se obtendrían si se derivara un espectro convencional, que es más ancho.

La técnica de derivadas, desarrollada inicialmente por Green y O'Haver (**5**) se aplica tanto en espectrofotometría como en espectrofluorimetría. La obtención de los espectros en derivadas tiene como consecuencia más significativa la mejor resolución de bandas solapadas, pudiéndose distinguir las bandas anchas de las estrechas en una extensión que aumenta al incrementarse el orden de la derivación. Esto es debido a que, para bandas de tipo Gaussiano o Lorentziano, la amplitud D_n de la señal obtenida en la derivada de orden es proporcional a la anchura de banda original, W, elevada a n:

$$D_n = \propto [1/W]^n$$

Por esta razón, si tenemos dos bandas de igual intensidad., pero de distinta anchura, la amplitud de la banda más estrecha (A) es mayor que la de la banda más ancha (B), según la expresión:

$$\frac{D_{n,A}}{D_{n,b}} = \left(\frac{W_B}{W_A}\right)^n$$

siendo W_A y W_B las anchuras correspondientes (**6**). Se ven favorecidas las bandas más estrechas.

La derivación en sí, no incrementa la información contenida en los datos espectroscópicos, sin embargo, es posible mediante esta técnica obtener una discriminación más satisfactoria, que permite, en muchos casos la eliminación de la señal correspondiente a las interferencias.

Por otra partre, al aumentar el orden de la derivada el ruido de fondo va incrementándose de forma apreciable, por lo que el límite de detección suele aumentar, perdiéndose sensibilidad (**7**). Debido a esto es necesario el filtrado de la señal con objeto de disminuir el ruido de "alta frecuencia", reducible mediante un proceso flitrado de "baja frecuencia". También es necesaria la correcta selección de los diversos parámetros que pueden influir sobre los espectros y el

ruido de fondo como son la velocidad de barrido, tiempo de respuesta, número de puntos utilizado en el proceso de filtrado del espectro sincrónico y anchura de rendijas, a fin de conseguir las condiciones óptimas de trabajo.

Aplicaciones de fluorescencia sincrónica derivada

Esta técnica se ha aplicado satisfactoriamente en el análisis de multicomponentes orgánicos siendo óptima la resolución de las mezclas debido a la disminución del solapamiento a causa del estrechamiento de las bandas. Así se han analizado mezclas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (**8,9,10, 11,12**), plaguicidas (**13,14,15**), alcaloides (**16,17**), productos farmaceúticos (**18,19**).

También se ha aplicado esta técnica, aunque en menor medida, a la determinación de trazas de iones inorgánicos tales como la deteminación de magnesio con salicilaldehido-2-piridilhidrazona (**20**), cadmio con benzil-2-piridilcetona-2-quinolilhidrazona (**21**), boro con ácido cromotrópico (**22**), así como al análisis de mezclas como la binaria y ternaria de titanio, circonio y hafnio con diacetilmonoxima nicotinoilhidrazona (**23**), aluminio y galio y cinc-galio mediante los reactivos sacicilaldehido tiocarbonohidrazona y di-2-piridilcetona-2-furoilhidrazona, respectivamente (**24**), alumino y berilio con Morina (**25**), aluminio y cinc con 8-hidroxiquinoleina-5-sulfónico (**26**), molibdeno y volframio con Ácido Carmínico (**27**) y la misma mezcla aplicando la espectrofluorimetría en fase sólida (**28**).

2. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

2.1. CARACTERISTICAS ESPECTRALES

En los capitulos anteriores han sido estudiados independientemente los complejos fluorescentes que el reactivo Rojo de Alizarina S forma,tanto con Molibdeno(VI) como con Boro(III).

Para observar la interferencia entre ambas especies, se han registrado los espectros de excitación y de emisión de ambos complejos a un pH 6'0, estando este valor en una zona intermedia entre los valores a los cuales se favorece la formación de ambos complejos. Las concentraciones utilizadas de Boro y Molibdeno han sido de 0'5 ppm y la concentración de reactivo empleada fue de 6.10^{-5} M, en ambos casos.

En la Figura VII.1 se muestran los espectros de excitación y emisión, observándose una emisión máxima del complejo B(III)-RAS a 610 nm, siendo la longitud de onda de excitación 435 nm y para el complejo Mo(VI)-RAS, la emisión es máxima a 620 nm, cuando la excitación es a 483 nm. En ambos casos, se utilizaron rendijas de excitación y emisión de 10 nm. El registro se realizó en modo no corregido, siendo la velocidad de barrido 480 nm/min y la respuesta 0'5 s.

Los espectros de emisión de ambos compuestos están muy solapados, existiendo una diferencia de sólo 10 nm en las longitudes de onda de máxima emisión de las mismas. En consecuencia una determinación simultánea de ambos iones mediante fluorescencia convencional no sería posible.

Para la determinación conjunta de ambos complejos por espectrofluorimetría sincrónica derivada, se estudiarán las variables experimentales que influyen en la formación de ambos, seleccionándose condiciones intermedias que favorezcan la coexistencia de ambas especies fluorescentes.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
2 MAR. 1995
COMISION DE DOCTORADO

Como longitudes de onda de medida de excitación se seleccionan 435 y 483 nm para B(III) y Mo(VI) respectivamente y la emisión es registrada a 615 nm en ambos casos debido al solapamiento espectral que presentan ambos compuestos en esta zona, donde su emisión sigue siendo máxima. Para el registro de los blancos es indiferentes el uso de 483 o 435 nm como longitud de onda de excitación, ya que la señal es constante en este intervalo de longitudes de onda, midiendo la emisión a 615 nm.

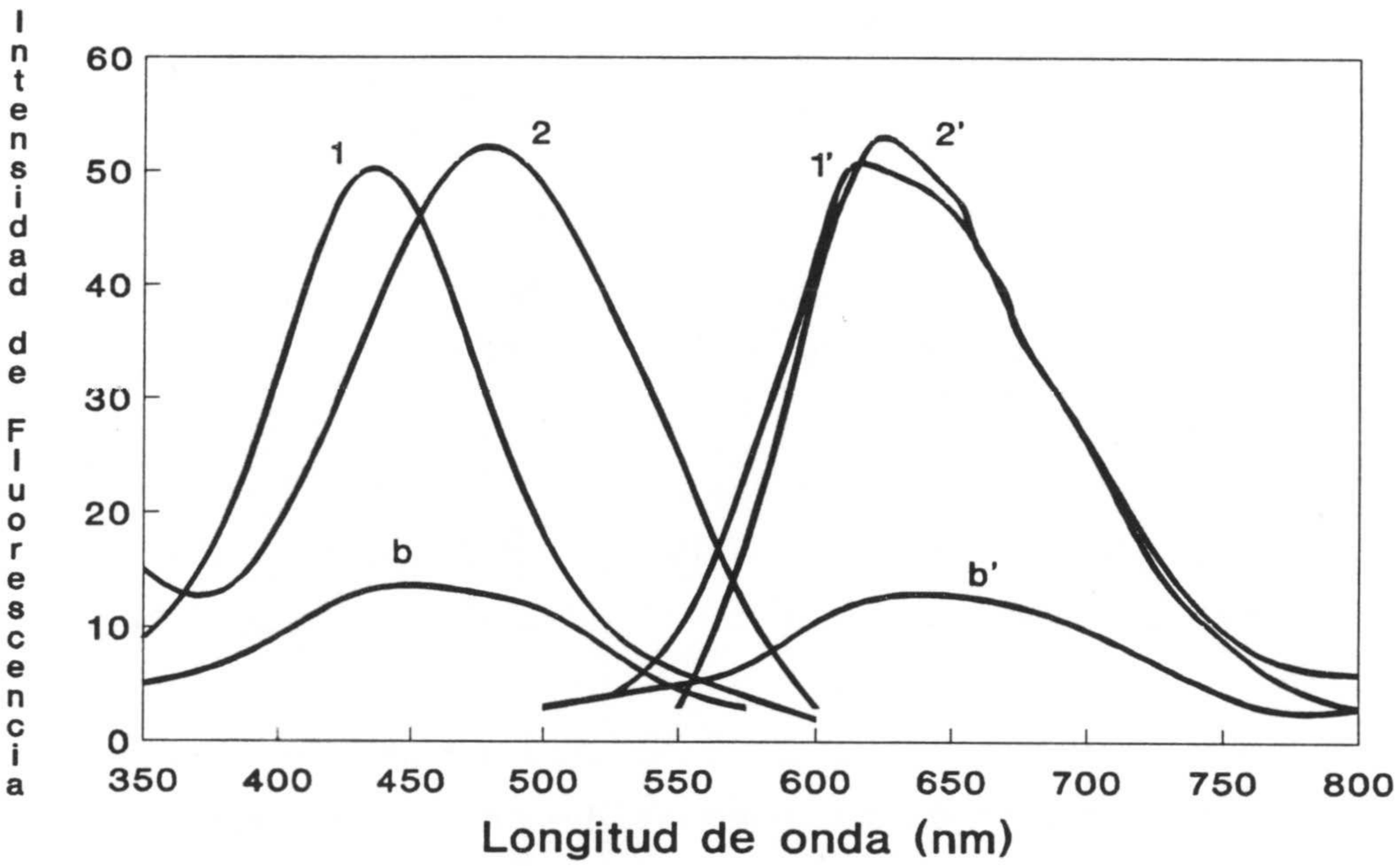


Figura VII.1. Espectros de excitación y emisión de los complejos B(III)-RAS (1,1'), Mo(VI)-RAS (2,2'), y blanco (b,b') a pH 6'0. [B(III)] = [Mo(VI)] = 0'5 ppm, [RAS] = 6.10^{-5} M

2.2. INFLUENCIA DEL PH

En capítulos anteriores donde se estudiaron las condiciones óptimas de formación de los complejos individualmente, fueron establecidos los intervalos de pH para los cuales la intensidad de fluorescencia de los sistemas Mo(VI)-RAS y B(III)-RAS es máxima y permanece constante.

En la Figura VII.2 se muestran las curvas de pH, obtenidas por diferencia entre las intensidades de fluorescencia de los complejos y de sus respectivos blancos. Las concentraciones de B(III) y Mo(VI) fueron, en ambos casos de 0'5 ppm, con una concentración de reactivo de 6.10^{-5} M. Las medidas de fluorescencia fueron realizadas a los máximos de excitación de 435 y 483 nm para los complejos de boro y molibdeno con Rojo de Alizarina S, respectivamente y a una longitud de onda de emisión de 615 nm, con rendijas de excitación y emisión de 10 nm.

Como puede observarse, existen para ambos iones, intervalos de pH en los cuales la intensidad de fluorescencia es máxima y se mantiene constante. Entre ambas curvas existe una zona de solapamiento en la cual coexisten ambas especies fluorescentes y que es tenida en cuenta para la determinación conjunta.

Como consecuencia de estos resultados se elige un valor de pH de 6'3 como apropiado para la obtención de un máximo de fluorescencia para ambos complejos simultaneamente.

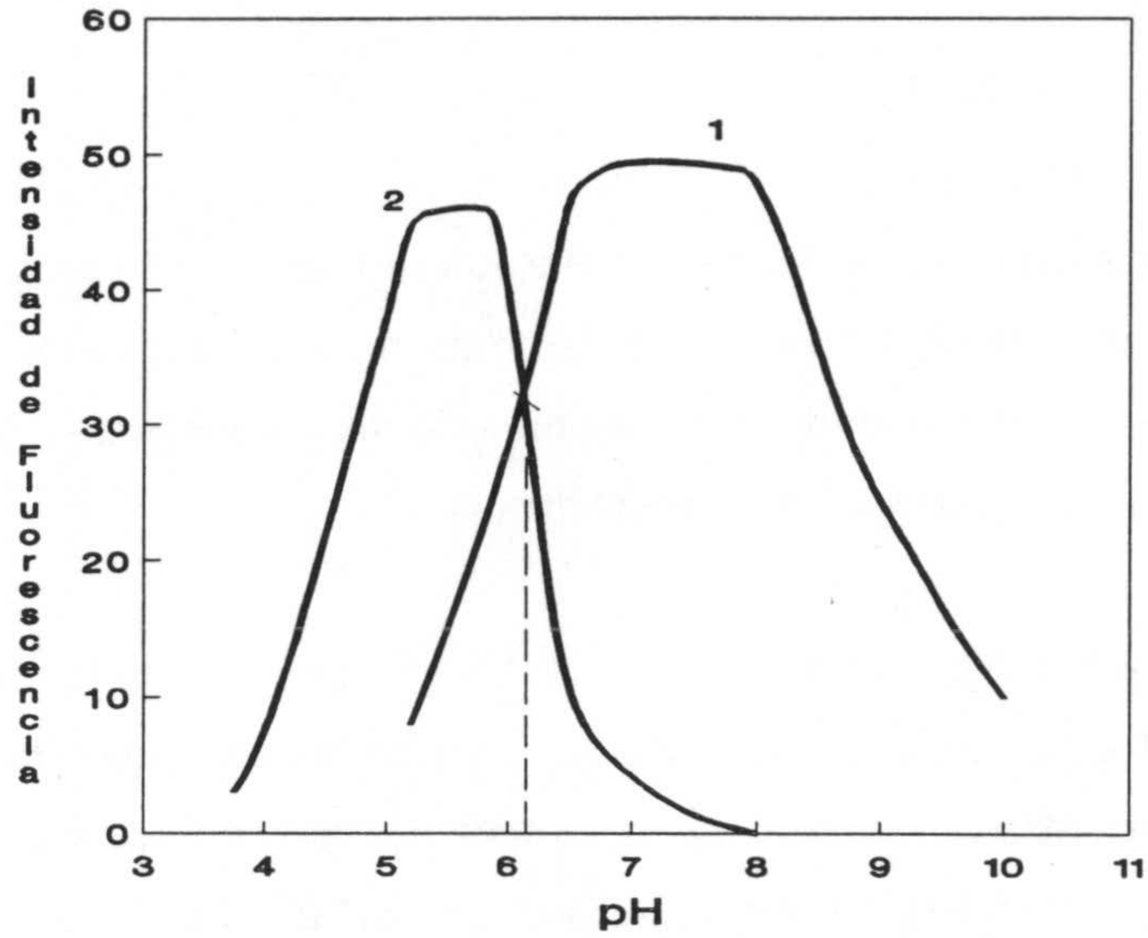


Figura VII.2. Influencia del pH sobre la Intensidad de Fluorescencia de los complejos (1) B(III)-RAS y (2) Mo(VI)-RAS. [B(III)] = [Mo(VI)] = 0'5 ppm, [RAS] = 6.10^{-5} M

2.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TAMPÓN

Con objeto de seleccionar el volumen de disolución reguladora óptimo en la determinación simultánea de los iones B(III) y Mo(III), se realizó la siguiente experiencia:

En matraces de 10 ml se adicionaron 0'5 ml de disoluciones de B(III) o de Mo(VI) de 10 ppm, volúmenes crecientes de disolución reguladora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0'1 M de pH 6'3 y 0'6 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. Las medidas se realizaron a las longitudes de onda de excitación máximas de 483 y 435 nm, para Molibdeno y Boro, y la emisión se registró a 615 nm. Las rendijas utilizadas fueron de 10 nm.

Los resultados se reflejan en la Tabla VII.1 y se representan en la Figura

VII.3 como diferencia de las señales correspondientes a los complejos y su respectivo blanco.

Tabla VII.1

Influencia de la concentración de Tampón $H_2PO_4^-$ / HPO_4^{2-}

V(ml)	IF, Mo	IF, B	IFb
0'5	42'2	49'5	14'3
1'0	44'2	50'5	14'0
1'5	45'3	51'2	14'6
2'0	47'5	49'5	15'6
2'5	55'1	50'5	16'0
3'0	57'2	50'2	16'2
4'0	58'6	50'3	17'2
5'0	57'3	51'4	18'0

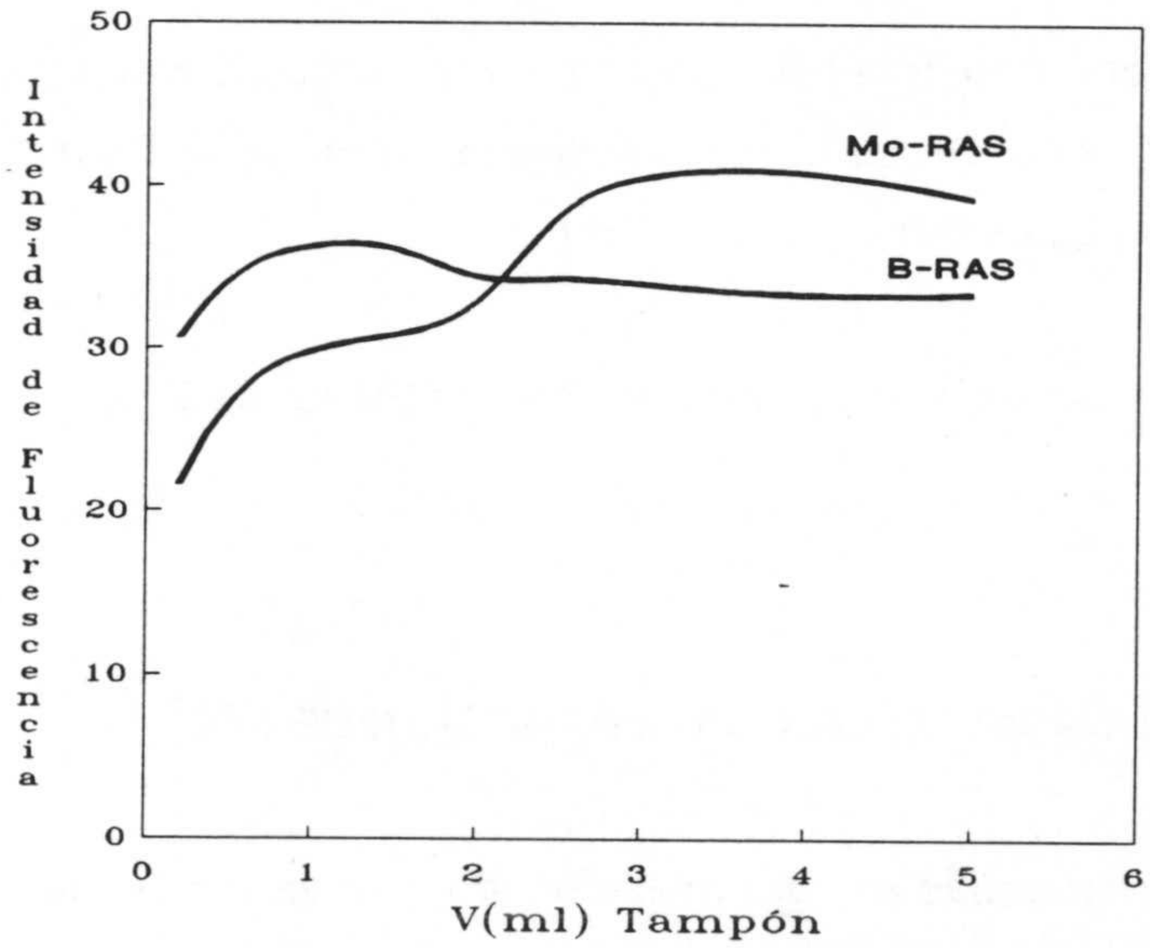


Figura VII.3. Influencia de la concentración de disolución reguladora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ sobre la fluorescencia de los complejos B(III)-RAS y Mo(VI)-RAS. [B(III)] = [Mo(VI)] = 0'5 ppm, [RAS] = 6.10^{-5} M

Como puede observarse, a partir de un volumen de disolución reguladora de 2'5 ml, se consigue una intensidad de fluorescencia máxima y constante en ambos casos así como una adecuada capacidad reguladora. Por ello, y para posteriores experiencias , se selecciona un volumen de 3 ml de Tampón fosfato 0'1 M de pH 6'3.

2.4. ESTABILIDAD, TEMPERATURA Y ORDEN DE ADICIÓN

En la optimización de los métodos de determinación fluorimétrica directa de B(III) y Mo(VI), se ha podido comprobar que la fluorescencia de ambos sistemas se desarrolla instantáneamente y permanece constante durante, al menos,5 horas.

También se observó que la temperatura es un factor crítico en el estudio de ambos complejos, siendo necesario termostatar el compartimento de cubetas. La temperatura óptima utilizada en posteriores experiencias fue de 25°C.

En cuanto al orden de adición de reactivos, tanto para el sistema B(III)-RAS como para Mo(VI)-RAS, no se observa influencia alguna, utilizándose, en ambos casos y para posteriores experiencias el orden:

Analito + Tampón + Rojo de Alizarina S

2.5. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE KCl

En las experiencias de optimización de las variables que afectan a la fluorescencia de los sistemas B(III)-RAS y Mo(VI)-RAS, fue estudiada la fuerza iónica mediante la adición de concentraciones crecientes de KCl.

En el caso del B(III), se observó que sólo a partir de una concentración de KCl de 0'8 M se producía una leve disminución en la fluorescencia del complejo, así como también en la del reactivo. Para el complejo Mo(VI)-RAS, sin embargo se observó una notable influencia al aumentar la concentración de esta sal y de otras ensayadas, incrementándose considerablemente la señal del complejo y disminuyendo la del blanco. Debido al aumento de sensibilidad que presentaba la determinación de Mo(VI) en presencia de altas concentraciones salinas, decidimos estudiar el efecto que la concentración de KCl provoca en la determinación simultánea de ambos iones a las condiciones experimentales ya optimizadas.

Para ello, se prepararon una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron 0'5 ml de disolución de Mo(VI) ó de B(III) de 10 ppm M, 3 ml de tampón fosfato de pH 6'3, 0'6 ml de disolución de RAS 10^{-3} M y el volumen indicado de disolución de KCl 2'5 M para conseguir la fuerza iónica adecuada, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada.

Las longitudes de onda de excitación fueron de 483 y 435 nm, para Molibdeno y Boro respectivamente, y la emisión se registró a 615 nm (Rex/em = 10 nm). Los resultados se recogen en la Tabla VII.2 y se representan en la Figura VII.4.

Como se puede comprobar, la intensidad de fluorescencia del complejo Mo(VI)-RAS sufre un considerable aumento en presencia de una elevada concentración de KCl, mientras que la fluorescencia de los blancos desciende, lo cual hace posible una mejora de las características del método analítico, en términos de sensibilidad. Para el sistema B(III)-RAS, la fluorescencia disminuye levemente a medida que aumenta la fuerza iónica, obteniéndose una zona en la que esta disminución permanece constante.

Tabla VII.2

Influencia de la Fuerza Iónica

[KCl]	IF,Mo	IF,B	IFb
0'00	56'2	50'2	22'4
0'10	60'4	54'6	19'6
0'20	71'1	48'4	18'0
0'30	74'2	45'2	16'7
0'40	77'2	43'6	19'8
0'60	82'5	44'3	16'0
0'80	94'3	44'0	15'8
1'00	100'9	43'5	14'9
1'20	102'2	42'4	14'9
1'40	108'2	42'0	15'6
1'60	109'4	36'3	15'2

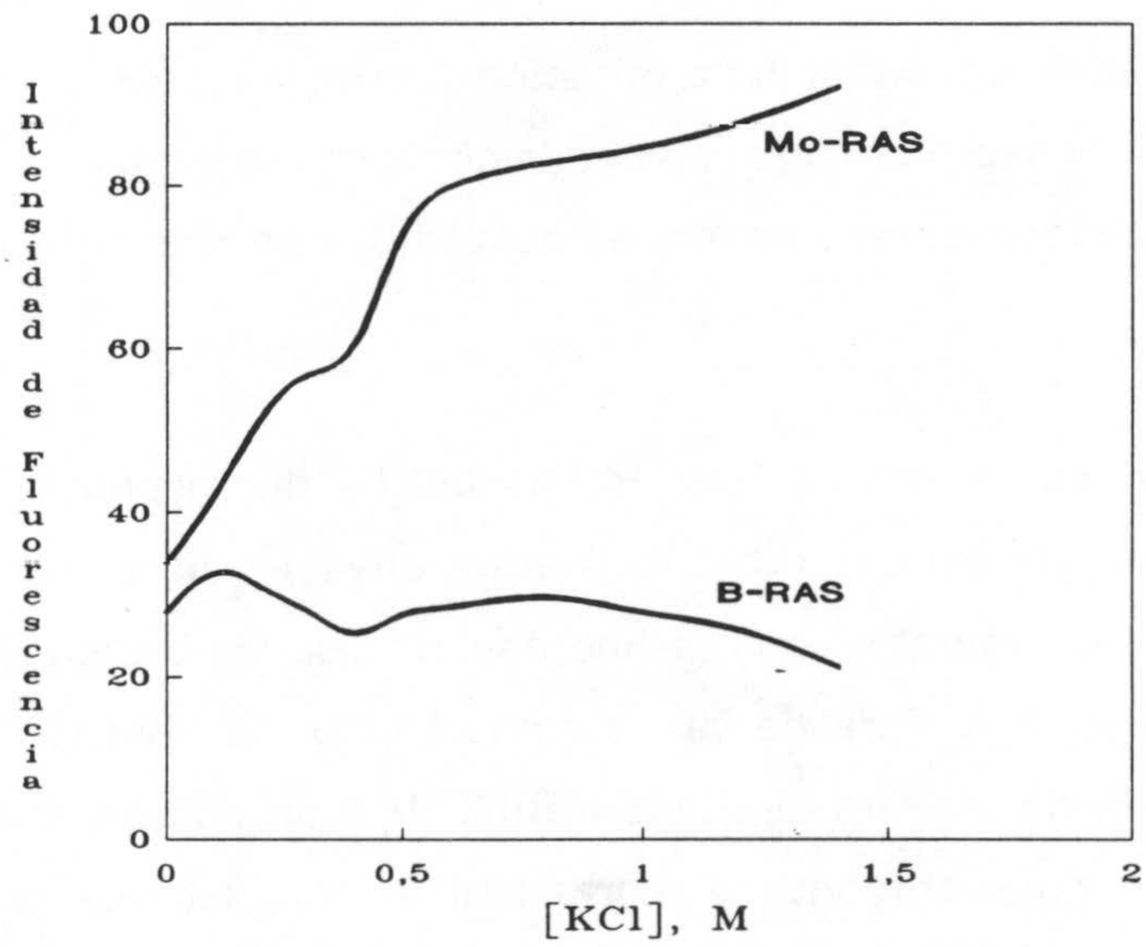


Figura VII.4. Efecto de la fuerza iónica sobre la fluorescencia de B(III)-RAS y Mo(VI)-RAS. [B(III)]= [Mo(VI)]= 0'5 ppm, [RAS]= 6.10^{-5} M. pH= 6'3

Este hecho nos proporciona una mejora en la sensibilidad de la determinación de molibdeno cuando se realiza conjuntamente con boro, lo cual es de gran utilidad, teniendo en cuenta que el tensioactivo catiónico que se empleó en la determinación directa de Mo(VI) y que mejoró las características analíticas de la determinación (BCTA), no puede ser utilizado en la resolución de esta mezcla debido a la disminución que produce este tensioactivo en la fluorescencia del complejo B(III)-RAS.

En vista de los resultados obtenidos en esta experiencia, se decide llevar a cabo la determinación conjunta de ambos iones en presencia de una fuerza iónica constante e igual a 1'0 M, proporcionada mediante una disolución de Cloruro Potásico 2'5 M.

2.6. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE REACTIVO

Para determinar la concentración de Rojo de Alizarina S a la cual la intensidad de fluorescencia de ambos complejos es máxima y se mantiene constante, a las condiciones intermedias seleccionadas, se realizó la siguiente experiencia:

En matraces de 10 ml se adicionan 0'5 ml de disoluciones de B(III) o de Mo(VI) de 10 ppm, 3 ml de tampón fosfato de pH 6'3, 4 ml de disolución de KCl 2'5 M y volúmenes crecientes de disolución de RAS 10^{-3} M. Las concentraciones finales de boro y molibdeno expresadas en molaridad, son $4'6.10^{-5}$ y $5'2.10^{-6}$ M, respectivamente. Las rendijas utilizadas fueron 10 nm y la fluorescencia se midió a 615 nm, excitando a las longitudes de onda máximas para boro y molibdeno, respectivamente.

Los resultados se recogen en la Tabla VII.3 y las curvas obtenidas por diferencia entre las señales correspondientes al complejo y blanco, para ambos analitos se representan en la Figura VII.5.

Tabla VII.3

Influencia de la concentración de RAS

[RAS].10^5	IF,Mo	IF,B	IFb
0'26	25'5	13'5	10'4
0'52	44'8	24'0	17'8
1'00	81'4	40'0	27'9
1'30	89'8	44'0	31'5
1'56	102'5	48'0	28'8
1'82	105'2	52'0	29'7
2'08	107'9	55'5	31'5
2'60	110'0	54'1	28'4
3'15	109'7	49'5	26'1
3'64	110'3	47'5	23'9
4'16	108'8	47'0	21'6
4'68	107'4	48'5	21'1
6'93	102'3	50'0	20'7
9'24	96'5	49'0	19'8
13'90	70'4	44'0	17'1
18'50	52'8	37'5	14'1

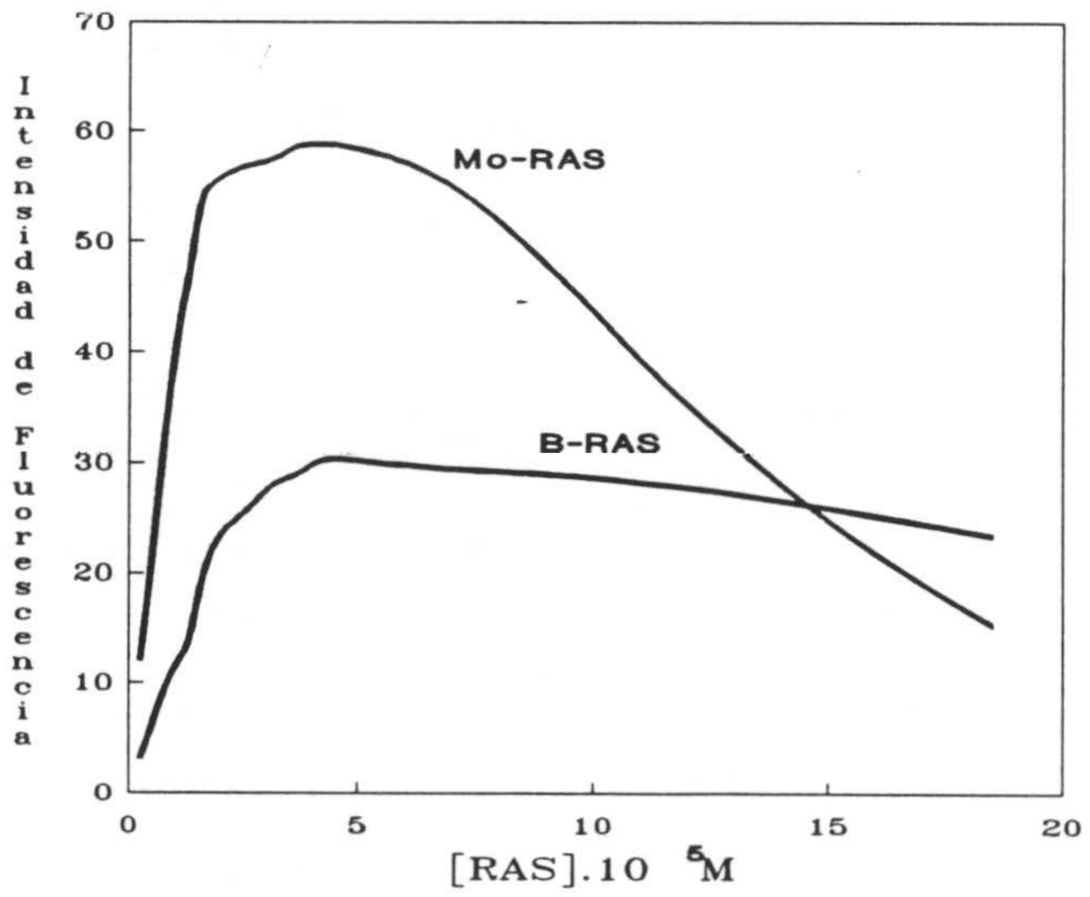


Figura VII.5. Influencia de la concentración de RAS. [B(III)] = [Mo(VI)] = 0'5 ppm, [KCl] = 1'0 M. pH = 6'3

De la representación gráfica se deducen las siguientes conclusiones:

1. Existe una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia de ambos complejos y la concentración de reactivo, llegando hasta un valor aproximado de $1'6.10^{-5}$ M, en ambos casos.

2. A partir de dicho valor, la intensidad de fluorescencia aumenta más ligeramente hasta alcanzar un valor máximo que permanece practicamente constante para el intervalo de concentración aproximada de entre $2'5.10^{-5}$ - 7.10^{-5} M para Mo(VI) y entre $2'0.10^{-5}$ - $1'0.10^{-4}$ M para B(III). Para valores superiores a estas concentraciones, se produce una ligera disminución de la fluorescencia, debido al fenómeno de inversión de ésta.

3. Los intervalos de relaciones molares en los cuales se asegura la total formación de ambos complejos, sin disminución de la fluorescencia, será de 5:1 - 15:1 (RAS:Mo) $\bar{y}$ de 0'25:1 - 4:1 (RAS:B). Estas cantidades deberán ser tenidas en cuenta en el establecimiento de las rectas de calibrado de la determinación conjunta, con objeto de seleccionar una concentración adecuada de reactivo en exceso, para acomplejar ambos iones simultaneamente.

3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN SINCRONO-DERIVADA

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas para la determinación conjunta de B(III) y Mo(VI) con Rojo de Alizarina S, es necesario determinar la influencia de los parámetros instrumentales sobre los espectros sincrónicos, así como sobre las señales derivadas utilizadas en la resolución de la mezcla binaria.

3.1. Elección de la diferencia entre las longitudes de onda de excitación y emisión

La selección de la diferencia óptima de longitudes de onda entre los monocromadores ($\Delta\lambda$), es el parámetro más importante para la aplicación satisfactoria de la espectrofluorimetría sincrónica a la resolución de mezclas multicomponentes. Esta selección es empírica y debe llevarse a cabo para cada componente. En general, el valor óptimo será aquel que nos proporcione el espectro más simple y de mayor intensidad para la sustancia en estudio.

Para ello, se prepararon una serie de matraces de 10 ml que contenían 0'5 ppm de B(III) y 0'5 ppm de Mo(VI), así como una mezcla de ambos. En todos los casos se adicionaron 3 ml de tampón fosfato de pH 6'3, 4 ml de KCl 2'5 M y la concentración de reactivo empleada fue de 6.10^{-5} M. Las rendijas de excitación y emisión utilizadas fueron de 10 nm.

Dicha selección se llevó a cabo registrando espectros sincrónicos, modificando el $\Delta\lambda$ entre 90 y 200 nm, valores que comprenden el desplazamiento de Stockes de ambos complejos, ya que suelen ser los que dan lugar a espectros sincrónicos de mayor intensidad de fluorescencia. El efecto de esta variación sobre la intensidad de fluorescencia y longitud de onda máxima del espectro sincrónico de los complejos se indica en la Tabla VII.5 y Figura VII.6.

Como puede observarse, en la Figura VII.6(A) el aumento del $\Delta\lambda$ en el barrido sincrónico produce un desplazamiento hipsocrómico de la longitud de onda máxima para ambos complejos.

Como hemos indicado anteriormente y se pone de manifiesto en la Figura VII.6(B) existe una gran dependencia entre el $\Delta\lambda$ y la intensidad de fluorescencia de los espectros sincrónicos, siendo máxima cuando éste se encuentra próximo al desplazamiento de Stokes ($\lambda_{em} - \lambda_{ex}$) de cada complejo (145 nm para molibdeno y 175 nm para boro). La selección de estos valores de $\Delta\lambda$ causan una reducción

en la anchura de banda a la mitad del espectro sincrónico de 126 a 83 nm para el complejo Mo(VI)-RAS y de 81 a 64 nm para el complejo B(III)-RAS.

Esta reducción de la anchura de banda a la mitad de la intensidad del espectro sincrónico es una de las principales características de la aplicación de la técnica sincrónica y que, a su vez, favorece la posterior aplicación de la técnica de derivadas, al producirse un aumento en la pendiente de dichos espectros.

Cuanto mayor es esta pendiente, mayor es la intensidad de la señal en derivadas y, por tanto, con la simplificación espectral producida por la técnica sincrónica estaremos aumentando la selectividad del procedimiento analítico.

Con objeto de realizar un solo barrido para la determinación conjunta de Mo(VI) y B(III), se procedió a la selección de un único $\Delta\lambda$ que fuese válido para ambos complejos.

Tabla VII.5

Influencia del $\Delta\lambda$

$\Delta\lambda$	IF,Mo	λ,Mo	IF,B	λ,B
90	70'0	520	18'2	466
120	89'3	493	30'3	455
140	97'9	481	40'4	453
145	99'0	476	43'9	449
150	99'8	474	44'5	447
170	96'4	468	44'2	447
180	93'0	465	47'2	430
185	90'2	463	46'6	428
200	88'2	463	42'5	425

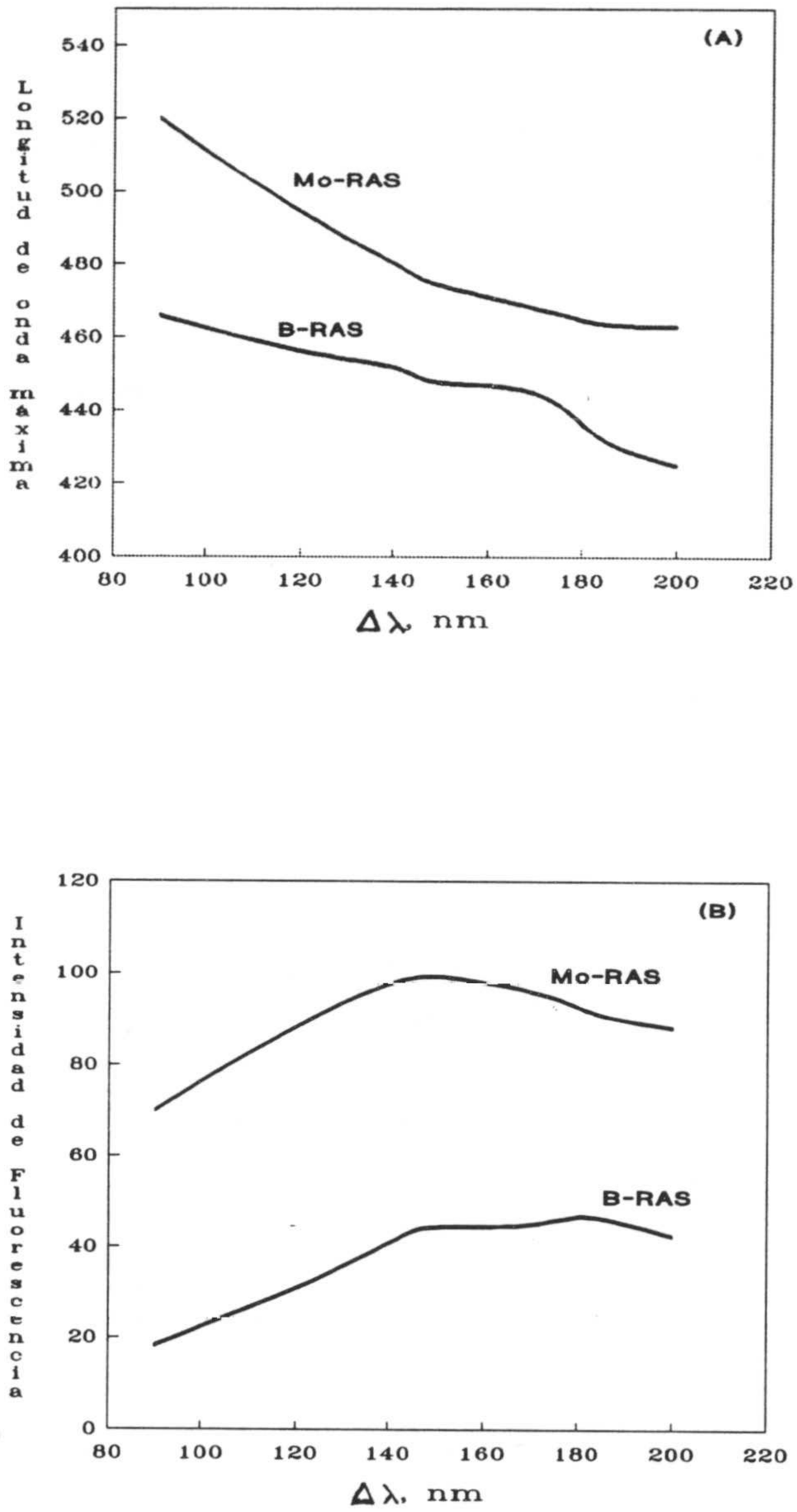


Figura VII.6. Influencia del $\Delta\lambda$ sobre los espectros sincrónicos de los complejos B(III)-RAS y Mo(VI)-RAS. (A) Efecto sobre la longitud de onda máxima; (B) Efecto sobre la intensidad de fluorescencia.

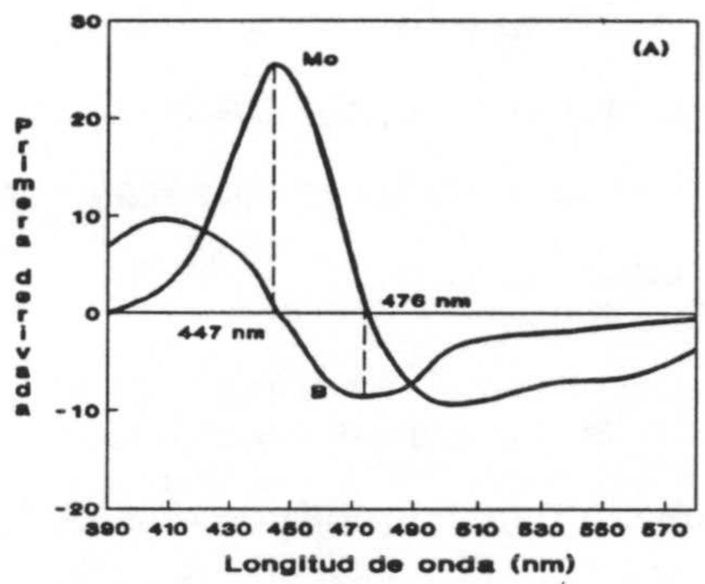
Como se observa en la Figura VII.6(B), para valores de $\Delta\lambda$ comprendidos entre 150 y 180 nm, existe una meseta en la cual la intensidad de fluorescencia no se ve afectada por la variación en el $\Delta\lambda$, pero este valor si puede afectar a la mayor o menor separación de ambos complejos tras la posterior aplicación de la técnica de derivadas a los espectros.

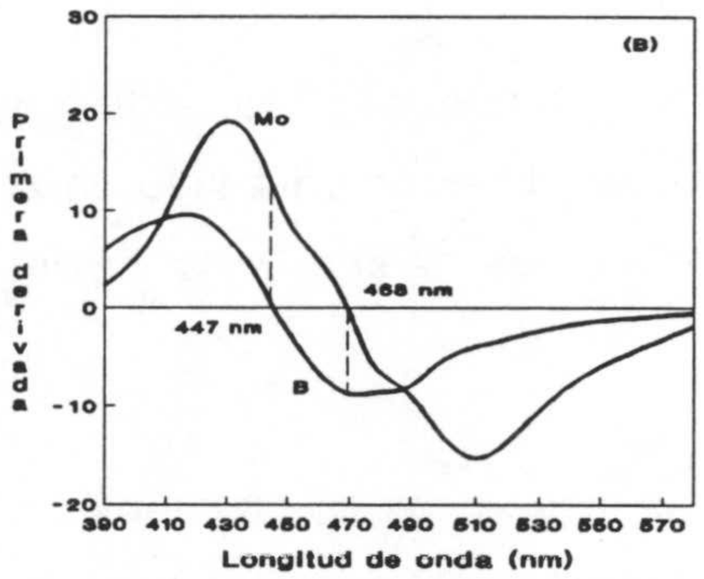
Por ello, se realizaron las derivadas de orden uno delos sincrónicos de los dos complejos a tres incrementos de longitudes de onda comprendos en dichas mesetas, concretamente a 150, 170 y 180 nm. Los resultados se representan en en la Figura VII.7.

En esta Figura se observa que las señales de mayor amplitud, tanto para boro como para molibdeno, se obtienen utilizando un $\Delta\lambda$ de 150 nm, así como también se puede comprobar que a este valor la interferencia entre ambos componentes es mínima.

La similitud entre los espectros de excitación y de emisión de ambos complejos queda de manifiesto con el registro del espectro tridimensional de una mezcla de ambos, que se representa en la Figura VII.8(A). Este fue obtenido registrando sesenta espectros de emisión entre 500 y 736 nm y variando la longitud de onda de excitación de 4 en 4 nm, desde 380 a 616 nm. En la Figura VII.8(B) se ha transferido la matriz de datos tridimensional a dos dimensiones, pudiéndose observar contornos isoemisivos representados en el plano (λ_{ex} , λ_{em}).

En este gráfico de curvas de nivel se observa aún más la proximidad entre los máximos de excitación y emisión de ambos complejos, por lo que la determinación simultánea de ambos sería imposible sin el grado de resolución conferido por la técnica sincrónica y posterior aplicación de la técnica de derivadas.





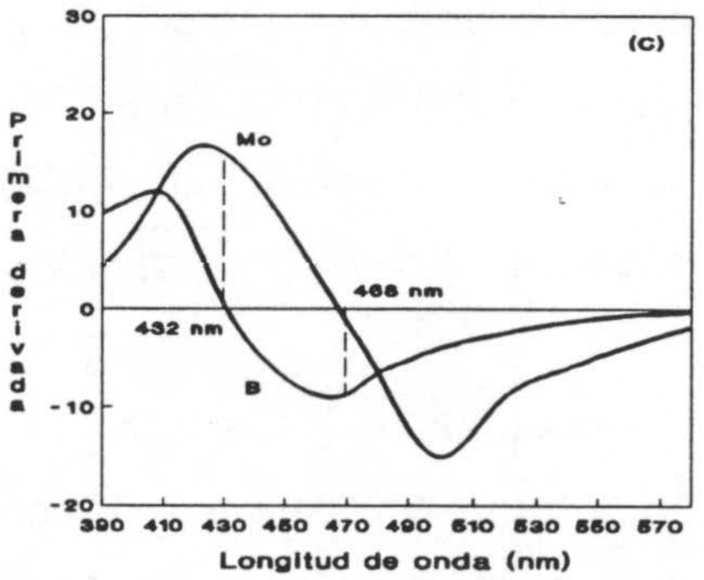
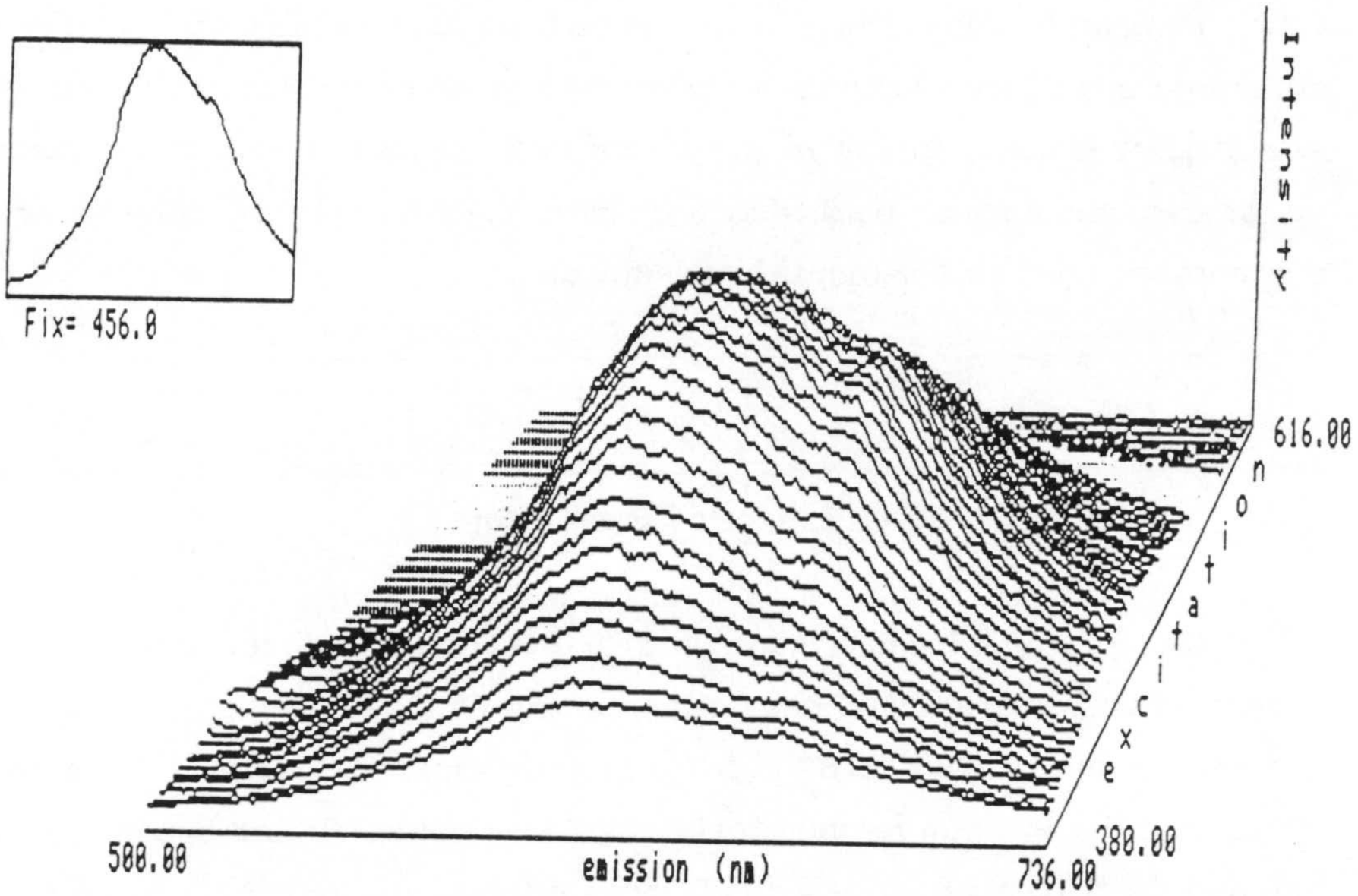


Figura VII.7. Primeras derivadas de los espectros sincrónicos de los complejos B(III)-RAS y Mo(VI)-RAS a los $\Delta\lambda$: (A) 150, (B) 170, (C) 180 nm



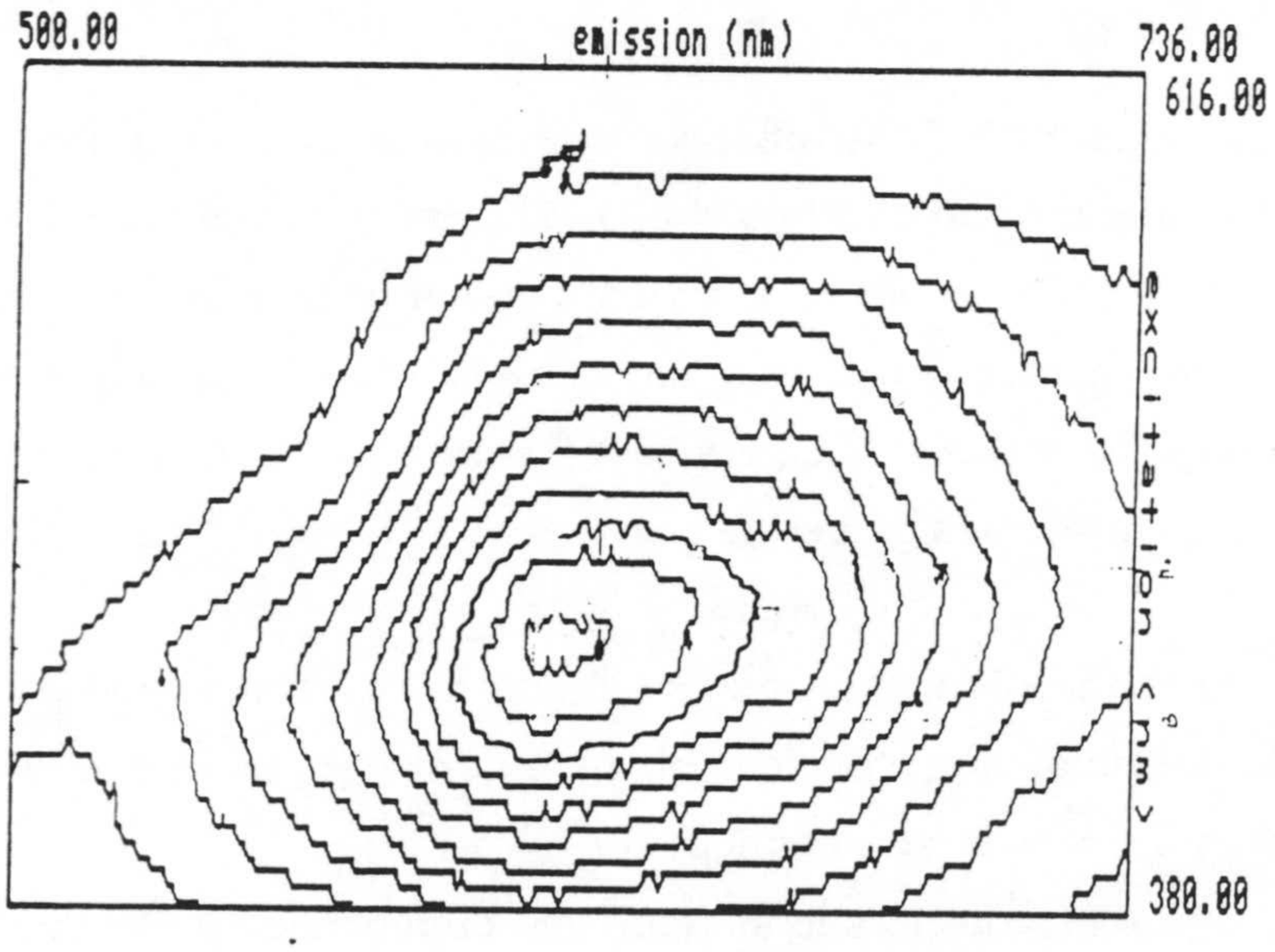


Figura VII.8. (A) Representación tridimensional de la matriz de excitación-emisión de la mezcla Mo(VI)-RAS + B(III)-RAS; (B) Curvas de nivel del mismo

En el gráfico de curvas de nivel, se ha trazado una linea a 45°, manteniendo constante una diferencia entre las longitudes de onda de 150 nm. Dicho barrido es considerado como óptimo ya que pasaría cerca de los máximos de fluorescencia de ambas sustancias, perdiéndose poca sensibilidad en la determinación y aumentando considerablemente la selectividad.

3.2. Registro de los espectros sincrónicos

Una vez optimizado el incremento de longitudes de onda, se registraron los espectros sincrónicos, manteniendo constante un $\Delta\lambda = 150$ nm, para disoluciones que contenían 0'5 ppm de B(III) ó 0'5 ppm de Mo(VI) y una mezcla de ambos, fijando el pH a 6'3 con tampón fosfato 0'1 M y utilizando una concentración de reactivo de 6.10^{-5} M, en las condiciones óptimas de trabajo. Las rendijas de excitación y emisión fueron de 10 nm.

En la Figura VII.9 se observa que el espectro sincrónico del complejo Mo(VI)-RAS presenta un máximo a 477/627 nm y que el complejo B(III)-RAS lo presenta a 450/600 nm. El solapamiento de los espectros de ambos complejos, pone de manifiesto que la resolución de la mezcla mediante fluorimetría sincrónica no es aconsejable, y que será conveniente recurrir a la combinación de fluorimetría sincrónica con la técnica de derivadas.

Al utilizar la técnica de derivación se hace necesaria la utilización de un filtrado de la señal que controle el incremento en el ruido que se produce, inevitablemente, al derivar un espectro.

En el proceso de filtrado se hace una convolución de la serie de datos con una función de filtrado consistente en una serie de coeficientes proporcionales. Cada punto de la serie de datos filtrados es una combinación lineal de un grupo de puntos adyacentes de la serie de datos sin filtrar, multiplicado cada uno por un coeficiente proporcional.

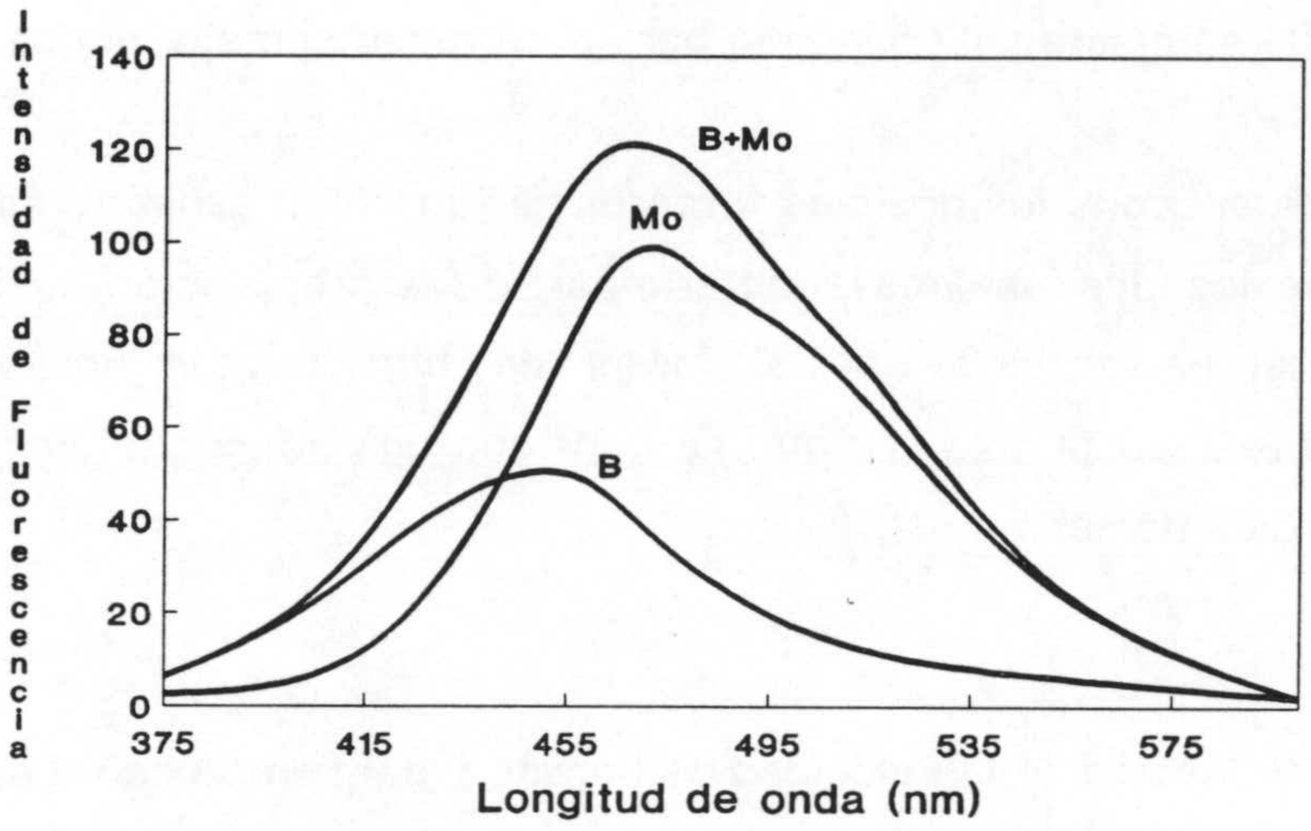


Figura VII.9. Espectros sincrónicos de los complejos Mo(VI)-RAS, B(III)-RAS y de una mezcla de ambos. $\Delta\lambda$ = 150 nm. [B(III)] = [Mo(VI)] = 0'5 ppm, [RAS] = 6.10^{-5} M, [KCl] = 1 M, pH = 6'3

En nuestro caso, para la obtención de los espectros derivados, es necesario llevar a cabo previamente el suavizado del espectro sincrónico. El software PETLS-3 de Perkin-Elmer aplica el alisado por mínimos cuadrados polinomial basado en el algoritmo de Savitzky-Golay (**29**) que ajusta un grupo de datos contiguos adquiridos a un polinómio cuadrático o cúbico mediante el desplazamiento sucesivo de una ventana móvil de datos. La ecuación de este polinómio puede utilizarse para estimar la posición del punto central filtrado. A continuación, la ventana puede desplazarse y proceder al ajuste de un nuevo polinómio de cuya ecuación podremos calcular la posición del nuevo punto central filtrado y así sucesivamente hasta filtrar todo el conjunto de datos.

Los factores de filtrado que pueden usarse son: 9, 13, 19, 25, 37, 49 y 149, los cuales hacen referencia al número de puntos considerados en cada ventana y que se ajustan al polinómio para determinar el mejor punto central.

Al aplicar todos los posibles factores de filtrado al espectro sincrónico de la mezcla de los dos analitos a determinar, cuya preparación se ha descrito anteriormente, se observa que el factor de filtrado más apropiado es el correpondiente a 25 puntos, ya que se consigue una adecuada disminución del ruido sin pérdida de señal.

3.3. Selección de la velocidad de barrido y del tiempo de respuesta

Una vez establecidas la diferencia óptima de longitudes de onda se procedió a seleccionar la velocidad de barrido más adecuada, registrándose los espectros sincrónicos de dos muestras que contenían 0'5 ppm de B(III) ó 0'5 ppm de Mo(VI) fijando el pH a 6'3 con tampón fosfatos 0'1 M y utilizando una concentración de reactivo de 6.10^{-5} M, en las condiciones óptimas de trabajo. Las rendijas de excitación y emisión fueron de 10 nm.

Las velocidades de barrido utilizadas fueron: 60, 120, 240 y 480 nm/min. En su optimización, se fueron variando los tiempos de respuesta entre 0'5 y 4 s. Se comprobó que el espectro sincrónico no se afectaba practicamente al modificar la velocidad de barrido pero en la primera derivada y segunda derivada se apreció un aumento del ruido al disminuir la velocidad utilizada, así como una ligera disminución en la señal.

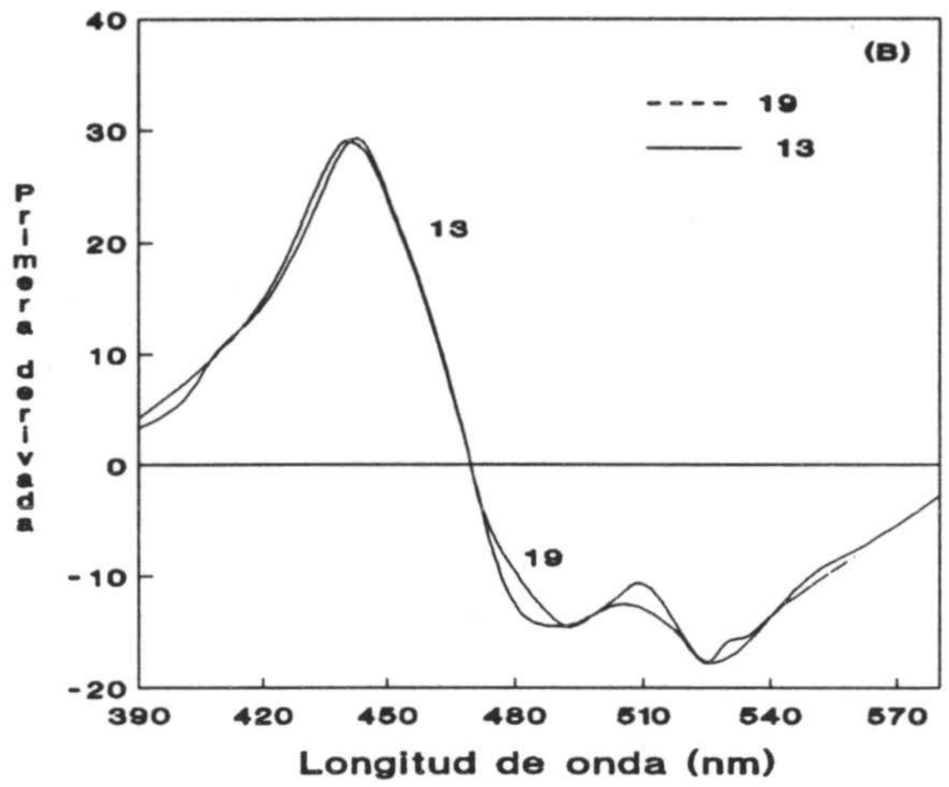
Se considera, por tanto, que una combinación de 480 nm/min y un tiempo de respuesta de 0'5 s. son los más óptimos para conseguir espectros practicamente exentos de ruido y sin pérdida de sensibilidad.

3.4. Selección del intervalo de longitudes de onda utilizado en la obtención de los espectros sincrónico-derivados

El intervalo de longitudes de onda ($\Delta\lambda'$) se puede modificar para que el proceso de derivación sea más efectivo, aunque se pierda resolución. Para comprobar la influencia de esta variable instrumental y seleccionar el valor óptimo para el que se minimice la dispersión sin disminuir notablemente la resolución, se registró la primera derivada del espectro sincrónico ($\Delta\lambda$ = 150 nm) de una disolución que contenía 0'5 ppm de B(III) y 0'5 ppm de Mo(VI) a pH 6'3 conseguido con tampón fosfato 0'1 M y utilizando una concentración de reactivo de 6.10^{-5} M, en las condiciones óptimas de trabajo. Las rendijas de excitación y emisión empleadas fueron de 10 nm.

Los resultados se muestran en la Figura VII.10 y VII.11 en la que han sido representados algunos de los intervalos de longitudes de onda ensayados para la obtención de la primera y segunda derivada del espectro sincrónico.

Se pudo comprobar que cuando este intervalo es superior a 25 nm, la señal obtenida al realizar la primera derivada del espectro sincrónico está practicamente exenta de ruido, pero a partir de este valor la señal sufre una considerable disminución que conlleva la pérdida de sensibilidad. Por ello,hemos elegido como óptimo un valor de 25 nm,tanto en el registro de la primera como de la segunda derivada del espectro sincrónico.



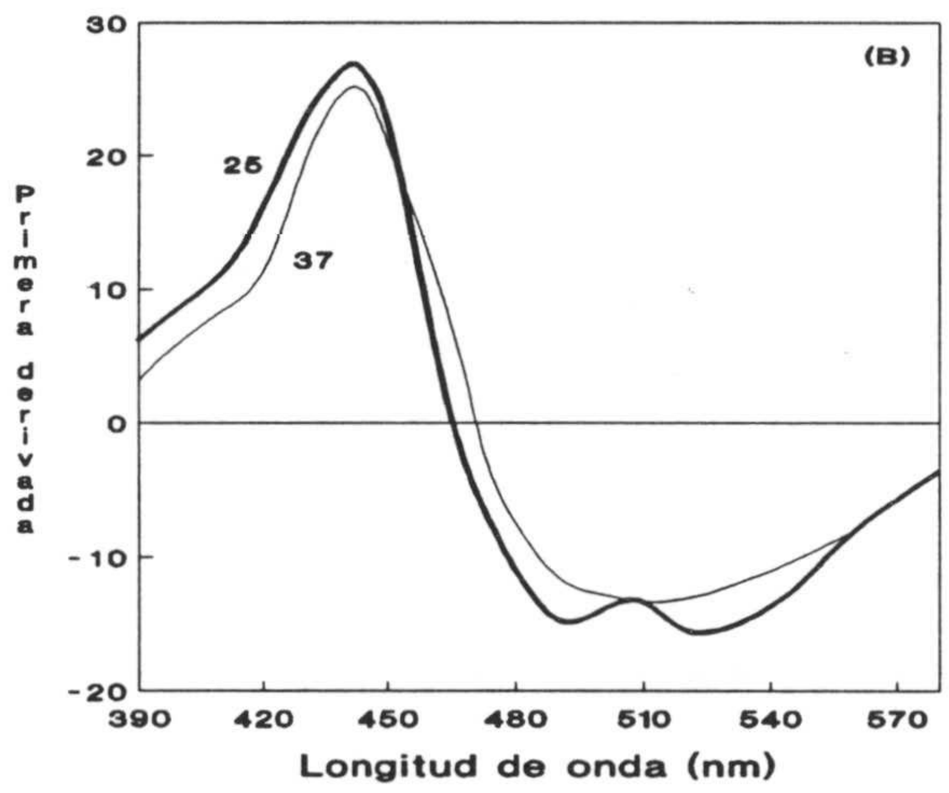
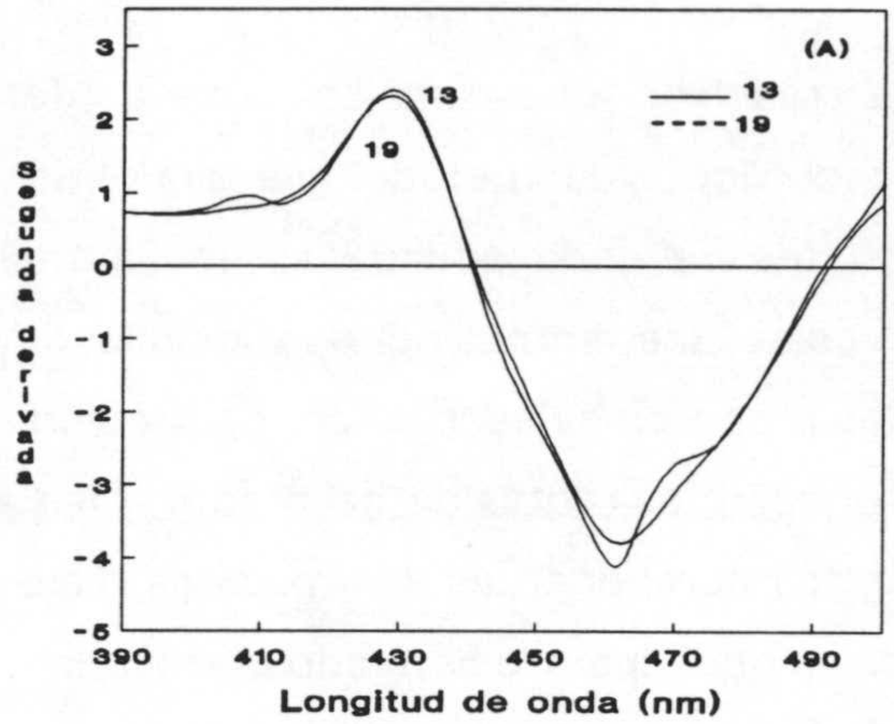


Figura VII.10. Influencia del intervalo de λ ($\Delta\lambda'$) sobre la primera derivada del espectro sincrónico: (A) 13 y 19 nm; (B) 25 y 37 nm. [Mo(VI)] = [B(III)] = 0'5 ppm, [RAS] = 6.10^{-5} M, pH = 6'3



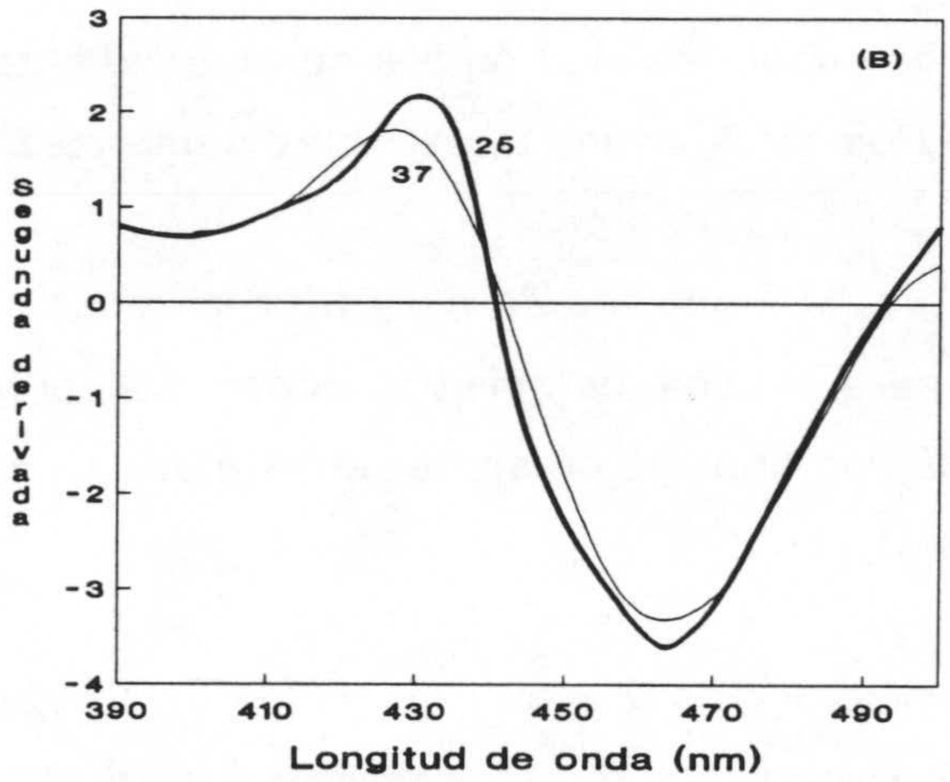


Figura VII.11. Influencia del intervalo de λ ($\Delta\lambda'$) sobre la segunda derivada del espectro sincrónico: (A) 13 y 19 nm; (B) 25 y 37 nm. [Mo(VI)] = [B(III)] = 0'5 ppm, [RAS] = 6.10^{-5} M, pH = 6'3

3.5. Selección de las longitudes de onda analíticas

Con objeto de resolver una mezcla binaria de ambos complejos fluorescentes, se ha recurrido a la metodología sincrónica-derivada. Para la elección de las longitudes de onda adecuadas se ha utilizado la técnica de "medida en el punto de corte" (zero crossing) o modelo isodiferencial (**30,31**) con objeto de tomar medidas proporcionales a las concentraciones de ambos analitos y establecer las correspondientes rectas de calibrado. Mediante esta técnica, al resolver una mezcla de dos componentes, las medidas realizadas en el punto de corte con el eje de abcisas del espectro derivado correspondiente a uno de ellos, será unicamente función de la concentración del otro compuesto.

En la Figura VII.12(A) y (B) se muestran la primera y segunda derivada respectivamente, de los espectros sincrónicos correspondientes a los complejos de B(III) y Mo(VI) con Rojo de Alizarina S, así como a una mezcla de ambos.

Como se observa, las medidas de h1 y h2 realizadas a las longitudes de onda seleccionadas para ambos complejos, deben ser proporcionales a las concentraciones de los dos analitos presentes en la mezcla. Estas longitudes de onda son:

Mo(VI)-RAS(h1): $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 447/597 nm (1ª derivada)
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 472/622 nm (2ª derivada)

B(III)-RAS (h2): $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 476/626 nm (1ª derivada)
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 446/596 nm (2ª derivada)

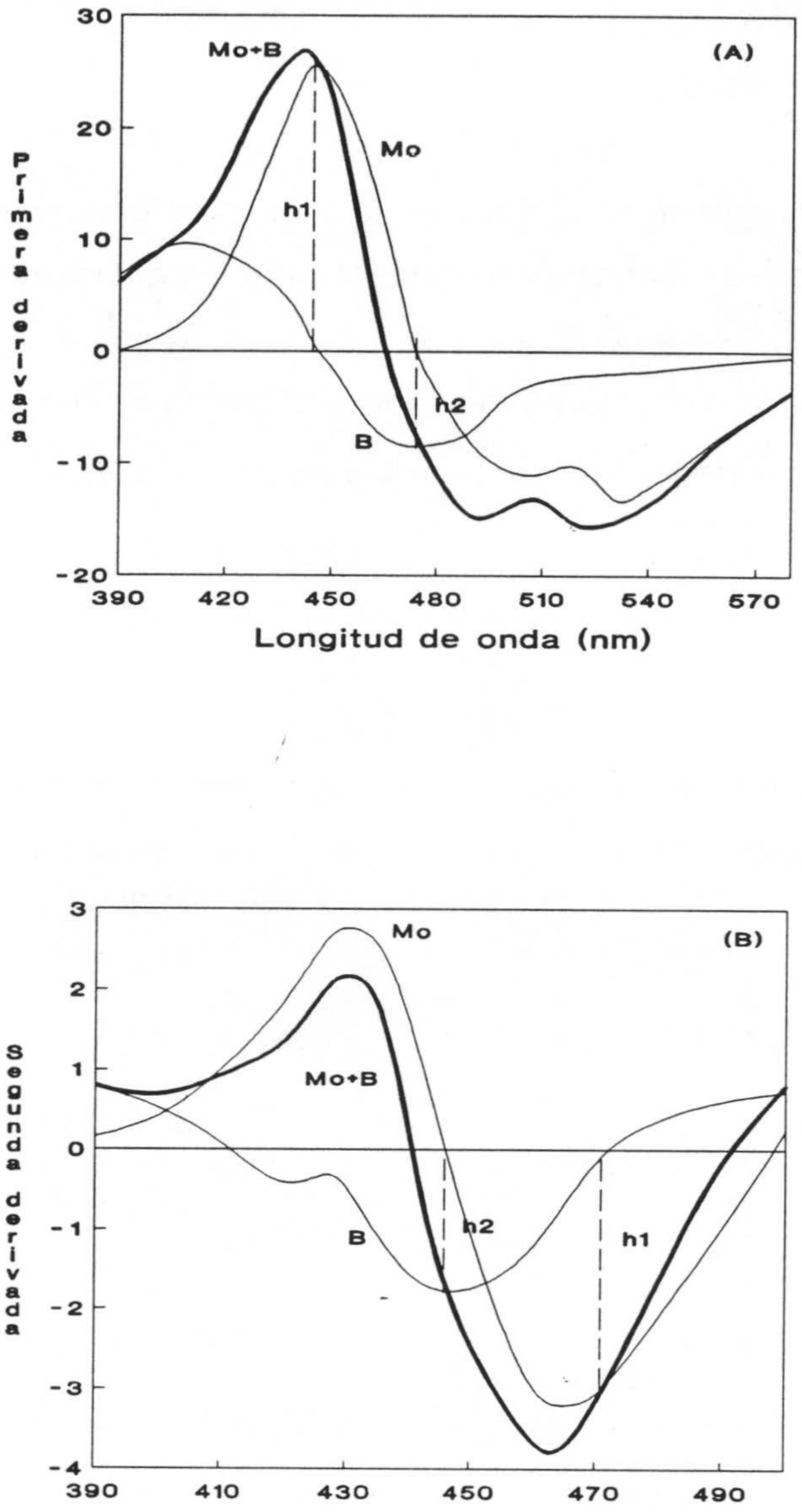


Figura VII.12. (A) Primera y (B) segunda derivada de los espectros sincrónicos de los complejos B(III)-RAS, Mo(VI)-RAS y de una mezcla de ambos a $\Delta\lambda$ = 150 nm. h1 = Señal analítica de Mo(VI)-RAS a λ = 447/597 nm (1ª derivada) y λ = 472/622 nm (2ª derivada); h2 = Señal analítica de B(III)-RAS a λ = 476/626 nm (1ª derivada) y λ = 446/596 nm (2ª derivada)

4. RESUMEN DE LA OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES PARA LA RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA

Tras haber concluido el estudio de la influencia que ejercen una serie de factores experimentales e instrumentales en el establecimiento de la determinación simultánea de B(III) y Mo(VI) con el reactivo Rojo de Alizarina S por espectrofluorimetría sincrónica-derivada, los resultados de esta optimización han sido resumidos en la Tabla VII.5.

Tabla VII.5

Optimización de variables para la determinación conjunta de B(III) y Mo(VI)

Variable	Valor óptimo
pH	6'3
[Dis. reguladora]	$H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0'03 M
T^a	25°C
Estabilidad	>5 h.
Orden de adición	No afecta
[RAS]	8.10^{-5} M
[KCl]	1'0 M
Rendijas ex/em	10/10 nm
v. barrido	480 nm/min
T. Respuesta	0'5 s
F. Filtrado	25
$\Delta\lambda'$	25
B ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	
1^a D	476/626 nm
2^a D	446/596 nm
Mo ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	
1^a D	447/597 nm
2^a D	472/622 nm

5. ESTABLECIMIENTO DE LA DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA SIMULTÁNEA DE BORO(III) Y MOLIBDENO(VI)

5.1. RECTAS DE CALIBRADO

Una vez establecidas las variables experimentales e instrumentales óptimas y con el fin de proponer un método de determinación simultánea de B(III) y Mo(VI) con Rojo de Alizarina S, se han obtenido las correspondientes rectas de calibrado para ambos analitos, utilizando la primera y segunda derivada de los espectros sincrónicos a las longitudes de onda ya seleccionadas.

A) PRIMERA DERIVADA DE LOS ESPECTROS SINCRÓNICOS

Rectas de calibrado de Molibdeno(VI)

Se prepararon una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron de 0'1 a 0'9 ml de disolución de Mo(VI) de 10 ppm, 3 ml de tampón fosfato de pH 6'3, 4 ml de disolución de KCl 2'5 M y 0'8 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. También se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Los espectros sincrónicos se registraron a 25°C con las siguientes condiciones instrumentales: $\Delta\lambda$ = 150 nm, rendijas de excitación y emisión: 10,10; velocidad de barrido 480 nm/min; tiempo de respuesta 0'5 s. Factor de filtrado: 25 puntos.

La primera derivada se obtuvo con un $\Delta\lambda'$ de 25 nm y las medidas se realizaron en el punto isodiferencial a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 447/597 nm.

Se han realizado tres réplicas para cada valor de concentración y sus correspondientes señales se relacionan en la Tabla VII.6. La Figura VII.13 muestra la primera derivada de los espectros sincrónicos pertenecientes a cada una de las

concentraciones, así como la correspondiente recta de calibrado.

Tabla VII.6

Recta de calibrado de Mo(VI) en 1ª Derivada

[Mo(VI)], ppm	R		
0'0	2'4	2'6	2'5
0'1	7'7	7'2	7'2
0'3	16'2	14'3	15'2
0'5	23'7	22'5	22'7
0'7	31'3	30'2	30'3
0'9	40'1	37'6	37'9

El ajuste de esta recta por mínimos cuadrados nos proporciona los valores que se reunen en la Tabla VII.7.

Tabla VII.7

Datos estadísticos de la recta de calibrado

Ordenada en el origen (a) = 3'056

Desviación estándar (s_a) = 0'292 DER (a) = 9'55 %

Pendiente (b) = 39'545

Desviación estándar (s_b) = 0'556 DER (b) = 1'41 %

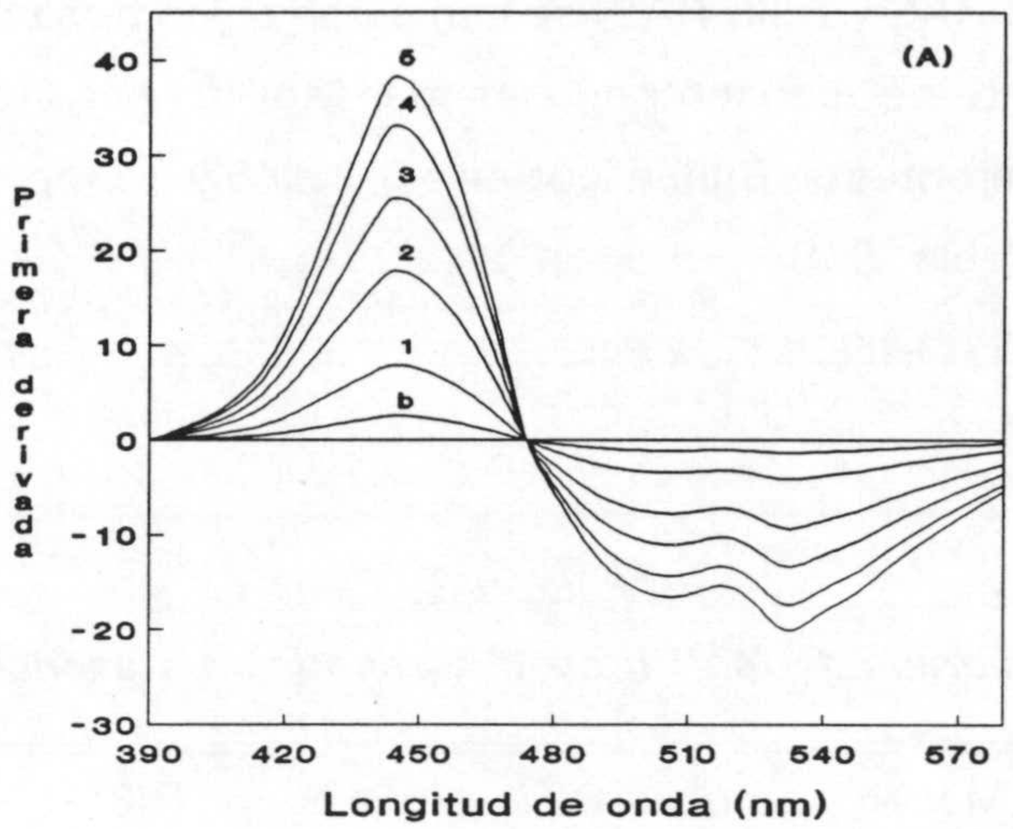
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$) = 0'7518

Coef. de correlación (r) = 0'9984

Coef. de determinación (r^2) = 99'68 %

g = $8'90.10^{-4}$

Fallo de Ajuste (P= 59'3 %)



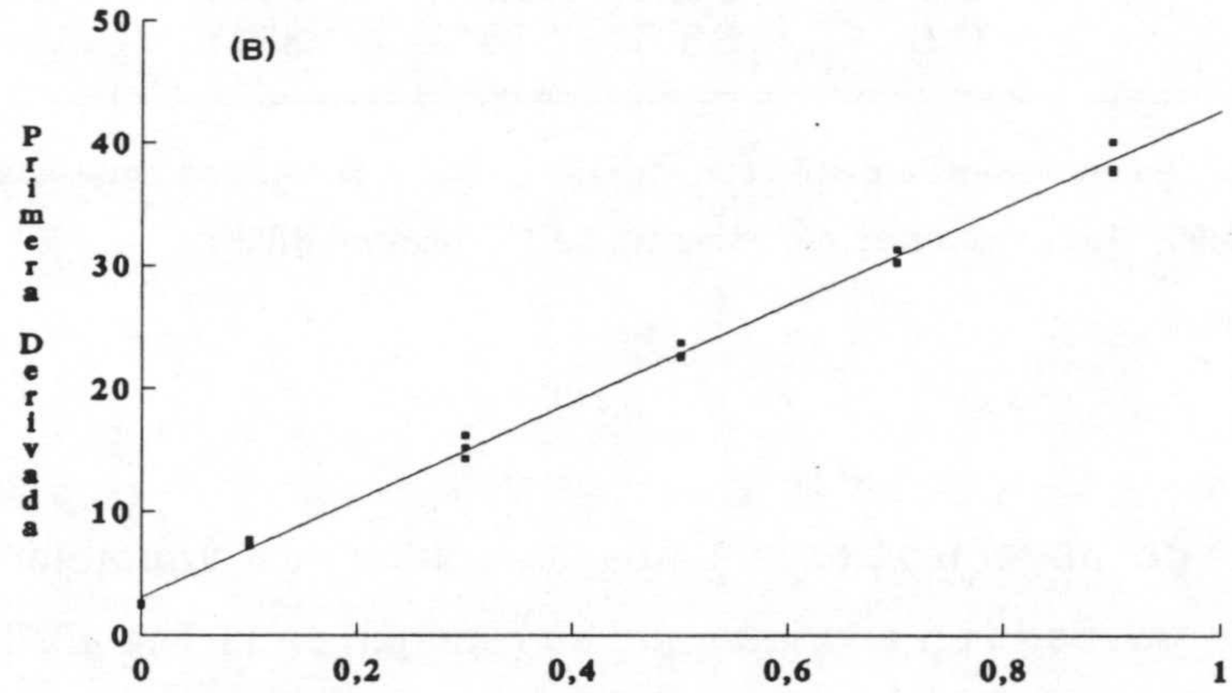


Figura VII.13. Complejo Mo(VI)-RAS. Rango 0'1-0'9 ppm (A) Primera derivada de los espectros sincrónicos: (b), blanco, (1) 0'1, (2) 0'3, (3) 0'5, (4) 0'7, (5) 0'9 ppm. (B) Recta de calibrado de los mismos.

Con objeto de comprobar la independencia entre las señales analíticas de los complejo Mo(VI)-RAS y B(III)-RAS, se han establecido tres rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de Mo(VI) pero en presencia de concentraciones diferentes de B(III) e iguales a 0'2, 0'5 y 1'0 ppm. Los resultados se muestran en la Tabla VII.8.

Tabla VII.8

Rectas de calibrado de Mo(VI) en 1ª Derivada en presencia de B(III)

[Mo(VI)], ppm	R(1)	R(2)	R(3)
0'0	3'1	2'5	2'6
0'1	7'0	6'3	6'4
0'3	14'9	14'0	14'1
0'5	22'8	21'7	21'8
0'7	30'6	29'4	29'4
0'9	38'5	37'1	37'1

R(1) = Señales en presencia de 0'2 ppm de B(III); R(2) = Señales en presencia de 0'5 ppm de B(III); R(2) = Señales en presencia de 1'0 ppm de B(III)

El ajuste de las rectas por mínimos cuadrados nos proporciona los valores de pendiente y ordenada en el origen que se recogen en la Tabla VII.9, en donde se observa que estos valores están incluidos en el intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen correspondientes a la recta de calibrado establecida en ausencia de B(III).

Tabla VII.9

Ajuste de las rectas de calibrado de Mo(VI) en 1ª derivada en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de B(III)

Concentraciones		Pendiente	Ord. origen	r^2%
[Mo], ppm	[B],ppm			
0'1-0'9	0'0	39'5 ± 1'2	3'1 ± 0'6	99'7
	0'2	39'3	3'1	99'9
	0'5	38'5	2'5	99'9
	1'0	38'3	2'6	99'4

Rectas de calibrado de Boro

Se prepararon una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron de 0'03 a 0'30 ml de disolución de B(III) de 100 ppm, 3 ml de tampón fosfatos de pH 6'3, 4 ml de disolución de KCl 2'5 M y 0'8 ml de disolución de Rojo de Alizarina S 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. También se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Los espectros sincrónicos se registraron a 25°C con las siguientes condiciones instrumentales: $\Delta\lambda = 150$ nm; rendijas de excitación y emisión: 10,10; velocidad de barrido 480 nm/min; tiempo de respuesta 0'5 s, factor de filtrado: 25 puntos. La primera derivada se obtuvo con un $\Delta\lambda'$ de 25 nm y las medidas se realizaron en el punto isodiferencial a $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 476/626$ nm.

Se han realizado tres réplicas para cada valor de concentración y sus correspondientes señales se relacionan en la Tabla VII.10. En la Figura VII.14 se representa la primera derivada de los espectros sincrónicos pertenecientes a cada una de las concentraciones, así como la correspondiente recta de calibrado.

Tabla VII.10

Recta de calibrado de B(III) en 1ª Derivada

[B(III)], ppm	R		
0'0	0'5	0'7	0'6
0'3	4'1	5'2	4'6
0'7	10'0	8'8	8'9
1'1	13'8	15'3	14'5
2'0	24'2	25'4	23'5
3'0	34'9	35'7	36'0

El ajuste de esta recta por mínimos cuadrados nos proporciona los valores que se reunen en la Tabla VII.11.

Tabla VII.11

Datos estadísticos de la recta de calibrado

Ordenada en el origen (a) = 1'114

Desviación estándar (s_a) = 0'248 DER (a) = 22'27 %

Pendiente(b) = 11'580

Desviación estándar (s_b) = 0'158 DER (b) = 1'36 %

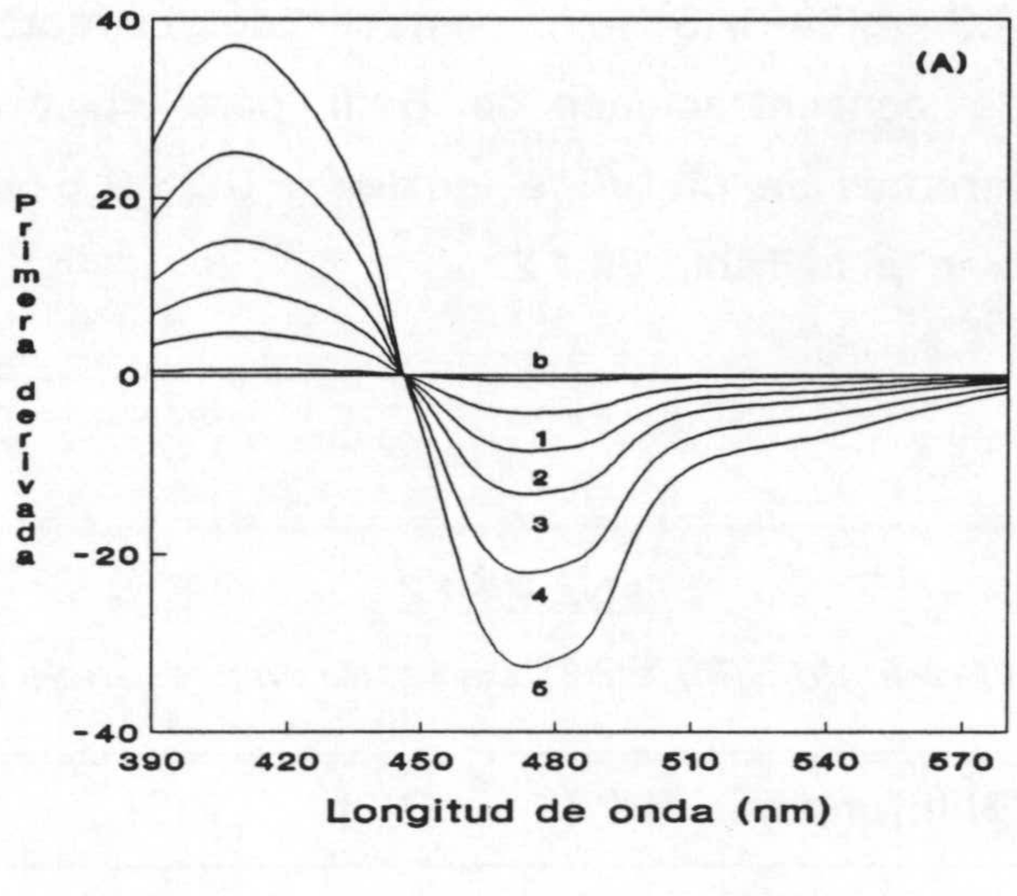
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$) = 0'6919

Coef. de correlación (r) = 0'9985

Coef. de determinación (r^2) = 99'70 %

g = $8'372.10^{-4}$

Fallo de Ajuste (P= 27'0 %)



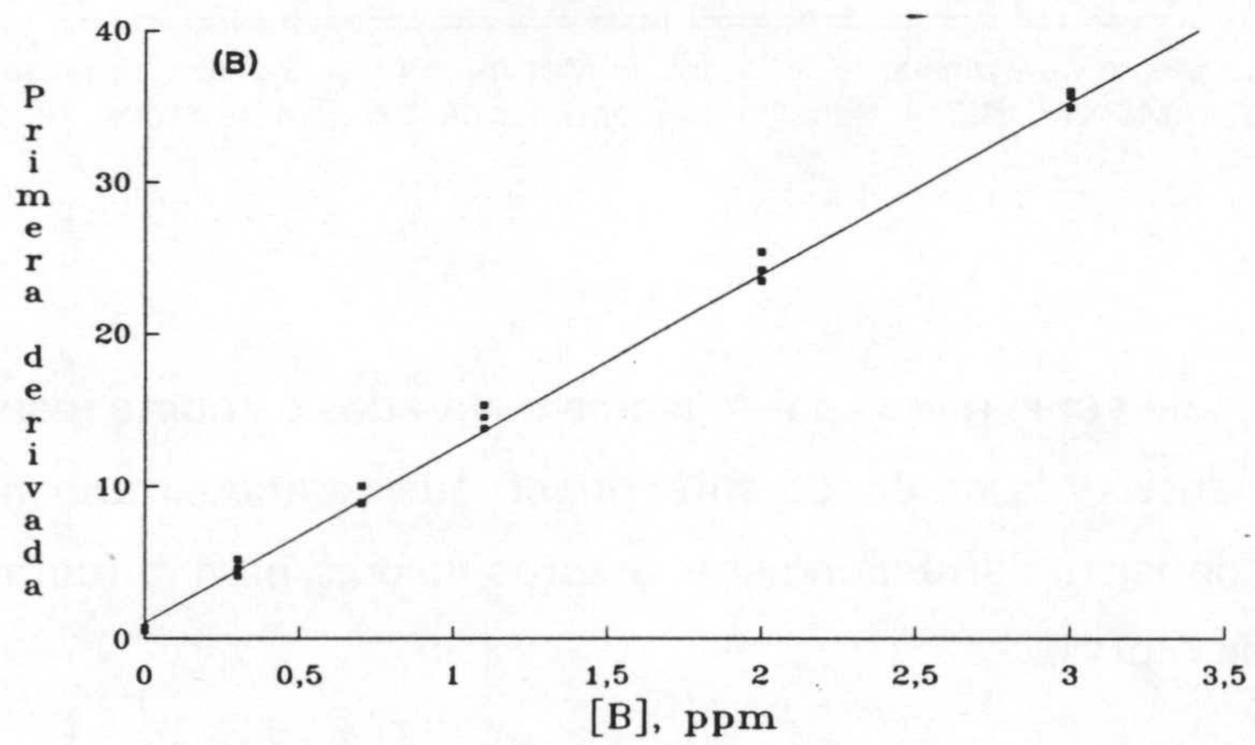


Figura VII.14. Complejo B(III)-RAS. Rango 0'3-3'0 ppm: (A) Primera derivada de los espectros sincrónicos: (b) blanco, (1) 0'3, (2) 0'7, (3) 1'1, (4) 2'0, (5) 3'0 ppm. (B) Recta de calibrado.

Para comprobar la independencia entre las señales analíticas de los complejos Mo(VI)-RAS y B(III)-RAS, se han establecido tres rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de B(III) pero en presencia de tres concentraciones diferentes de Mo(VI) e iguales a 0'2, 0'5 y 1'0 ppm. Los resultados se muestran en la Tabla VII.12.

Tabla VII.12

Rectas de calibrado de B(III) en 1ª Derivada en presencia de Mo(VI)

[B(III)], ppm	R(1)	R(2)	R(3)
0'0	1'4	1'6	1'6
0'3	4'8	5'0	5'1
0'7	9'4	9'5	9'7
1'1	13'9	14'0	14'3
2'0	24'2	24'2	24'6
3'0	35'6	35'5	36'1

R(1) = Señales en presencia de 0'2 ppm de Mo(VI); R(2) = Señales en presencia de 0'5 ppm de Mo(VI); R(3) = Señales en presencia de 1'0 ppm de Mo(VI)

El ajuste de estas rectas por mínimos cuadrados da como resultado valores para las pendientes y la ordenada en el origen que se encuentran incluidos en el intervalo de confianza correspondiente a estos valores para la recta de calibrado en ausencia de Mo(VI).

Los resultados se muestran en la Tabla VII.13.

Tabla VII.13

Ajuste de las rectas de calibrado de B(III) en 1ª derivada en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de Mo(VI)

Concentraciones		Pendiente	Ord. origen	r^2%
[B], ppm	[Mo],ppm			
0'0-3'0	0'0	11'6 ± 0'3	1'1 ± 0'5	99'7
	0'2	11'4	1'4	99'8
	0'5	11'3	1'6	99'8
	1'0	11'3	1'5	99'4

B) SEGUNDA DERIVADA DE LOS ESPECTROS SINCRÓNICOS

Siguiendo el procedimiento operatorio descrito para las anteriores rectas de calibrado, se llevaron a cabo las segundas derivadas de los espectros sincrónicos obteniéndose los resultados que se describen a continuación.

Los espectros sincrónicos se registraron a 25°C con las siguientes condiciones instrumentales: $\Delta\lambda$ = 150 nm; rendijas de excitación y emisión: 10,10; velocidad de barrido 480 nm/min; tiempo de respuesta 0'5 s, factor de filtrado: 25 puntos.

Recta de calibrado de Molibdeno

La segunda derivada se obtuvo con $\Delta\lambda'$ de 25 nm y las medidas se realizaron en el punto isodiferencial a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 472/622 nm.

Se han realizado tres réplicas para cada valor de concentración y sus correspondientes señales se relacionan en la Tabla VII.14. La Figura VII.15 representa la segunda derivada de los espectros sincrónicos pertenecientes a cada una de las concentraciones y la correspondiente recta de calibrado.

Tabla VII.14

Recta de calibrado de Mo(VI) en 2ª derivada

[Mo(IV)], ppm	R		
0'0	0'0	0'1	0'2
0'1	0'8	0'7	0'8
0'3	2'0	1'7	1'6
0'5	2'8	2'3	2'7
0'7	3'5	3'5	3'4
0'9	5'0	4'0	4'7

El ajuste de esta recta por mínimos cuadrados nos proporciona los valores que se reunen en la Tabla VII.15.

Tabla VII.15

Datos estadísticos de la recta de calibrado

Ordenada en el origen (a) = 0'214

Desviación estándar (s_a) = 0'093 DER (a) = 43'41%

Pendiente(b) = 4'793

Desviación estándar (s_b) = 0'177 DER (b) = 3'70%

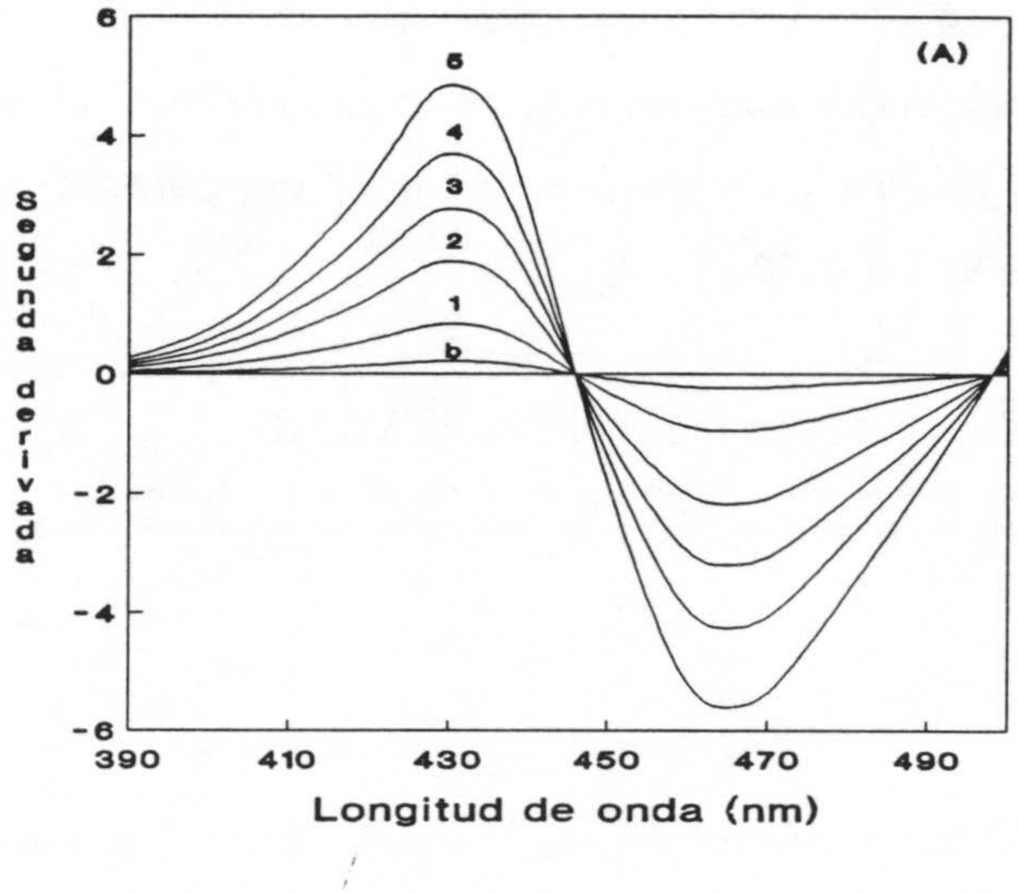
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$) = 0'2395

Coef. de correlación (r) = 0'9892

Coef. de determinación (r^2) = 97'86 %

g = $6'149.10^{-3}$

Fallo de Ajuste (P= 73'7 %)



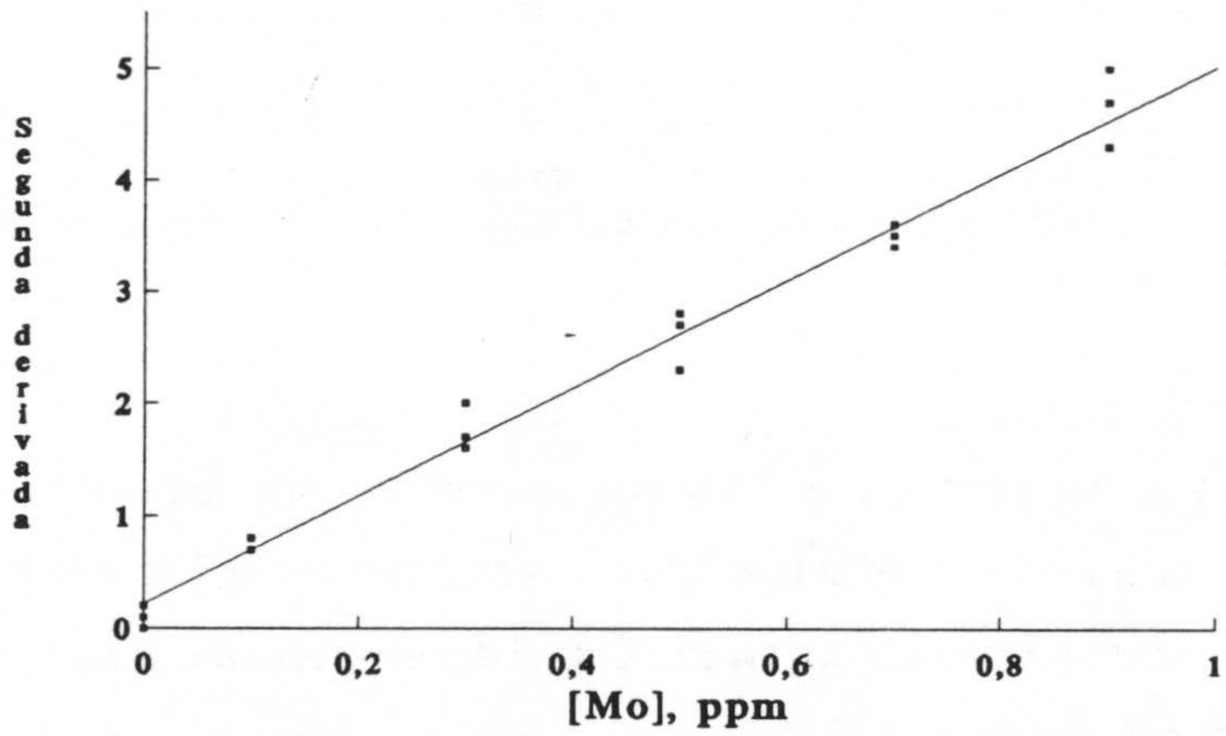


Figura VII.15. Complejo Mo(VI)-RAS. Rango 0'1-0'9 (A) Segunda derivada de los espectros sincrónicos. (b) blanco, (1) 0'1, (2) 0'3, (3) 0'5, (4) 0'7, (5) 0'9 ppm. (B) Recta de calibrado

La independencia entre las señales analíticas de la 2ª derivada de los espectros sincrónicos de los complejos Mo(VI)-RAS y B(III)-RAS, se ha comprobado estableciendo dos rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de Mo(VI) pero en presencia de concentraciones diferentes de B(III) e iguales a 0'2 y 0'5 ppm.

Los resultados se muestran en la Tabla VII.16.

Tabla VII.16

Rectas de calibrado de Mo(VI) en 2ª Derivada en presencia de B(III)

[Mo(VI)], ppm	R(1)	R(2)
0'0	0'3	0'0
0'1	0'7	0'5
0'3	1'7	1'4
0'5	2'8	2'5
0'7	3'5	3'3
0'9	4'4	4'2

R(1) = Señales en presencia de 0'2 ppm de B(III); R(2) = Señales en presencia de 0'5 ppm de B(III).

El ajuste de las rectas por mínimos cuadrados nos proporciona los valores de pendiente y ordenada en el origen que se recogen en la Tabla VII.17, en donde se observa que estos valores están incluidos en el intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen correspondientes a la recta de calibrado establecida en ausencia de B(III).

Tabla VII.17

Ajuste de las rectas de calibrado de Mo(VI) en 2ª derivada en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de B(III)

Concentraciones		Pendiente	Ord. origen	r^2%
[Mo], ppm	[B],ppm			
0'1-0'9	0'0	4'8±0'4	0'2±0'2	99'8
	0'2	4'6	0'3	99'7
	0'5	4'7	0'0	99'3

Recta de calibrado de Boro

La segunda derivada se obtuvo con un factor de filtrado de 25 puntos y las medidas se realizaron en el punto isodiferencial a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 446/596 nm.

Se han realizado tres réplicas para cada valor de concentración y sus correspondientes señales se relacionan en la Tabla VII.18. La segunda derivada de los espectros sincrónicos y la recta de calibrado se muestra en la Figura VII.16.

Tabla VII.18

Recta de calibrado de B(III) en 2ª derivada

[B(III)], ppm	R		
0'0	0'2	0'2	0'3
0'3	0'9	1'0	0'9
0'7	2'1	2'1	2'0
1'1	3'1	2'8	2'9
2'0	4'9	4'7	5'0
3'0	7'0	7'1	7'3

El ajuste de esta recta por mínimos cuadrados nos proporciona los valores que se reunen en la Tabla VII.19.

Tabla VII.19

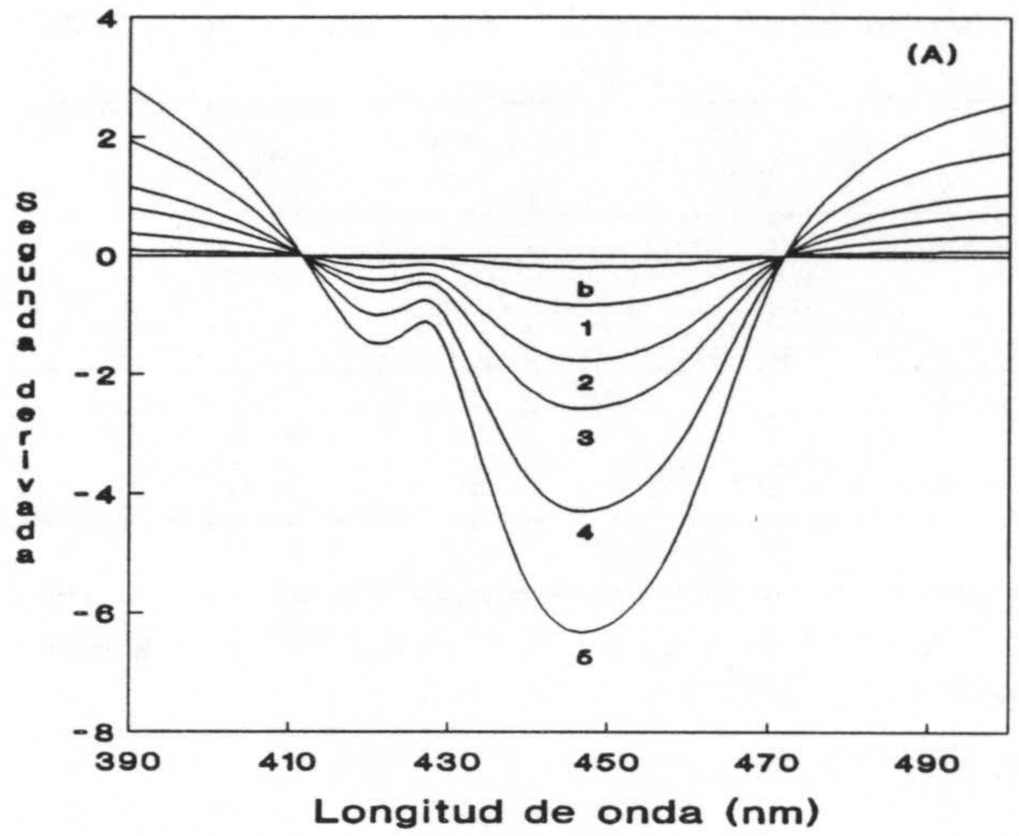
Datos estadísticos de la recta de calibrado

Ordenada en el origen (a) = 0'325
Desviación estándar (s_a) = 0'049 DER (a) = 15'08 %
Pendiente (b) = 2'284
Desviación estándar (s_b) = 0'031 DER (b) = 1'37 %
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$) = 0'1368
Coef. de correlación (r) = 0'9985
Coef. de determinación (r^2) = 99'70 %
g = $8'419.10^{-4}$
Fallo de Ajuste (P= 8'8 %)

En la Tabla VII.20 se muestran las señales relativas a rectas de calibrado de B(III) en segunda derivada en el rango de concentraciones anterior pero en presencia de dos concentraciones diferentes de Mo(VI) e iguales a 0'2 y 0'5 ppm con objeto de comprobar la independencia de las señales.

El ajuste de estas rectas por mínimos cuadrados da como resultado valores para las pendientes y la ordenada en el origen que se encuentran incluidos en el intervalo de confianza correspondiente a estos valores para la recta de calibrado en ausencia de Mo(VI).

Los resultados se muestran en la Tabla VII.21.



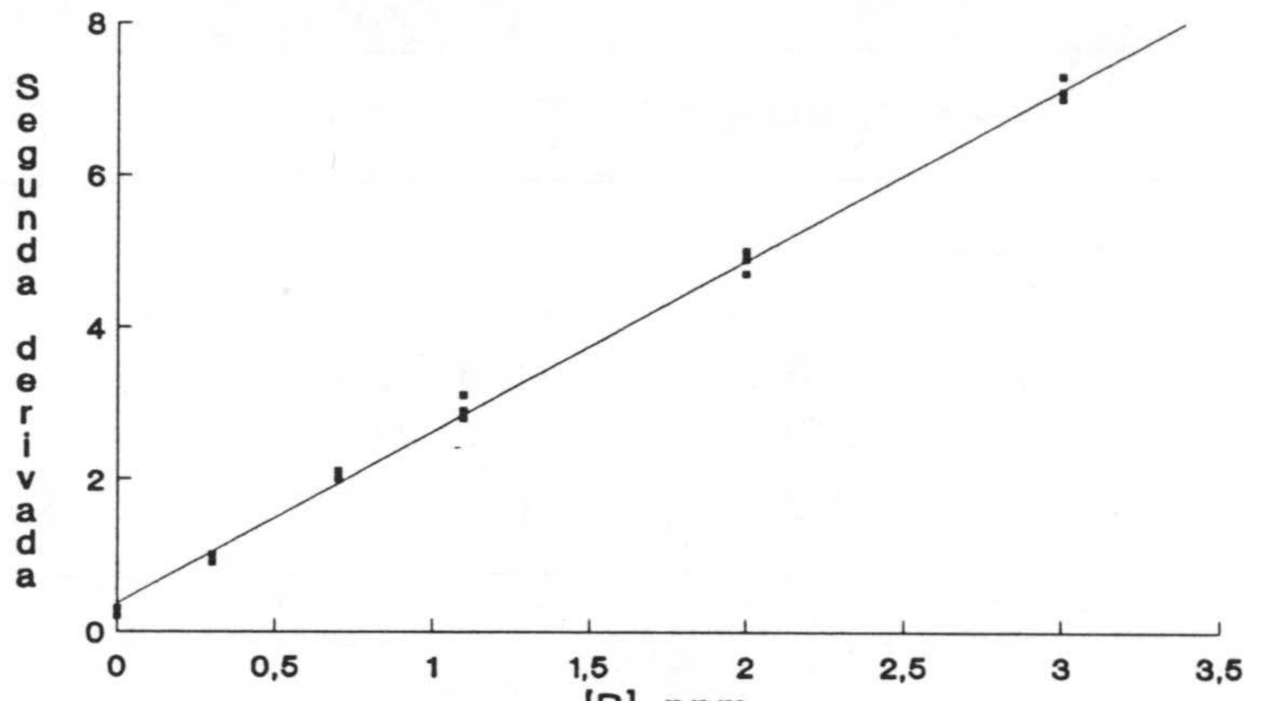


Figura VII.16. Complejo B(III)-RAS. Rango 0'3-3'0 ppm (A) Segunda derivada de los espectros sincrónicos, (b) blanco, (1) 0'3, (2) 0'5, (3) 0'7, (4) 1'1, (5) 2'0, (6) 3'0 ppm. (B) Recta de calibrado

Tabla VII.20

Rectas de calibrado de B(III) en 2ª Derivada en presencia de Mo(VI)

[B(III)], ppm	R(1)	R(2)
0'0	0'4	0'4
0'3	1'1	1'0
0'7	1'9	2'0
1'1	2'8	2'9
2'0	4'8	5'0
3'0	7'0	7'3

R(1) = Señales en presencia de 0'2 ppm de Mo(VI); R(2) = Señales en presencia de 0'5 ppm de Mo(VI).

Tabla VII.21

Ajuste de las rectas de calibrado de B(III) en 2ª derivada en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de Mo(VI)

Concentraciones		Pendiente	Ord. origen	r^2%
[B], ppm	[Mo],ppm			
0'0-3'0	0'0	2'3 ± 0'1	0'3 ± 0'1	99'7
	0'2	2'2	0'4	99'5
	0'5	2'3	0'4	99'8

5.2. PARÁMETROS DE FIABILIDAD

Los parámetros de fiabilidad del método: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido determinados por los criterios recomendados por la IUPAC y mediante el modelo de regresión lineal, a partir del conjunto de datos obtenidos de la experiencia de calibrado.

A) ***Según la IUPAC***

Límites de detección y cuantificación

Para el cálculo de los límites de detección y determinación, se preparan 10 muestras de blanco, introduciendo en matraces de 10 ml: 3 ml de tampón fosfato de pH 6'3, 4 ml de disolución de KCl 2'5 M y 0'8 ml de disolución de Rojo de Alizarina S 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada.

Se registraron las señales analíticas de la primera y segunda derivada de los espectros sincrónicos (a las longitudes de onda seleccionadas para B(III) y Mo(VI). Estos valores, así como su tratamiento estadístico (valor medio y desviación estándar) se muestran en las Tablas VII.22 y VII.23.

Tabla VII.22

Repetitividad del blanco. Primera derivada

Mo(VI)-RAS (λ = 447nm)		*B(III)-RAS (λ = 476 nm)*	
BLANCO	Señal	BLANCO	Señal
1	2'6	1	0'9
2	2'7	2	0'4
3	2'6	3	0'7
4	2'5	4	0'3
5	2'3	5	0'9
6	2'8	6	0'4
7	2'8	7	0'6
8	2'5	8	0'5
9	2'6	9	0'4
10	2'7	10	0'9
$\overline{R}$	2'61	$\overline{R}$	0'60
s	0'152	s	0'236

Tabla VII.23

Repetitividad del blanco. Segunda derivada

Mo(VI)-RAS (λ = 472nm) ***B(III)-RAS (λ = 446 nm)***

BLANCO	Señal	BLANCO	Señal
1	0'3	1	0'4
2	0'2	2	0'2
3	0'1	3	0'2
4	0'3	4	0'3
5	0'2	5	0'3
6	0'2	6	0'1
7	0'1	7	0'2
8	0'3	8	0'1
9	0'1	9	0'2
10	0'4	10	0'2
$\overline{R}$	0'23	$\overline{R}$	0'22
s	0'095	s	0'087

Precisión

Para su determinación, se preparan dos series de 10 matraces de 10 ml que contenían: 0'5 ppm de Mo(VI) ó 1 ppm de B(III), 3 ml de tampón fosfato de pH 6'3, 4 ml de disolución de KCl 2'5 M y 0'8 ml de disolución de Rojo de Alizarina S 10^{-3} M, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada.

Se registra la 1ª y 2ª derivada del espectro sincrónico ($\Delta\lambda$ = 150 nm) a las condiciones instrumentales ya optimizadas y se obtienen las correspondientes señales analíticas, así como los valores de concentración encontrados mediante las correspondientes rectas de calibrado.

Los resultados y su tratamiento estadístico se muestran en las Tablas VII.24 y VII.25.

Tabla VII.24

Datos de repetitividad en la determinación de 0'5 ppm de Mo(VI)

Primera derivada (λ = 447nm)		*Segunda derivada (λ = 472nm)*	
Señal	[Mo],ppm	Señal	[Mo],ppm
22'8	0'499	2'6	0'497
23'0	0'504	2'5	0'477
22'6	0'494	2'5	0'477
22'8	0'499	2'6	0'497
23'0	0'504	2'6	0'497
22'3	0'487	2'7	0'519
23'3	0'512	2'7	0'519
22'4	0'489	2'5	0'477
23'5	0'517	2'5	0'477
22'8	0'499	2'5	0'477
$[\bar{M}o]$	0'500	$[\bar{M}o]$	0'491
s	0'0094	s	0'0172

Tabla VII.25

Datos de repetitividad en la determinación de 1'0 ppm de boro

Primera derivada (λ = 476 nm)		*Segunda derivada (λ = 446 nm)*	
Señal	[B],ppm	Señal	[B],ppm
12'2	0'957	2'5	0'952
12'4	0'974	2'6	0'996
12'7	1'001	2'7	1'040
13'9	1'104	2'8	1'084
12'7	1'001	2'7	1'040
13'1	1'035	2'5	0'952
12'5	0'983	2'6	0'996
13'0	1'026	2'5	0'952
12'6	0'992	2'7	1'040
12'5	0'983	2'6	0'996
$[\bar{B}]$	1'006	$[\bar{B}]$	1'005
s	0'0416	s	0'0454

La estimación de los parámetros que caracterizan la calidad de la determinación analítica, siguiendo las recomendaciones de la IUPAC, aparecen an la Tabla VII.18.

Tabla VII.26

Parámetros de fFiabilidad según las recomendaciones IUPAC

Analito	Met.	Lin.(r^2%)	Sen.cal.(R/ppm)	LD (ppm)	LQ (ppm)	DER(%)*
Mo	1D	99'7	39'5	0'012	0'040	1'88
	2D	97'9	4'8	0'059	0'196	3'50
B	1D	99'7	11'6	0'061	0'203	4'14
	2D	99'7	2'3	0'114	0'382	4'52

* [Mo] = 0'5 ppm; [B] = 1'0 ppm

B) ***Según el análisis de la regresión***

La sensibilidad analítica, así como la linealidad son establecidas mediante el uso de los datos derivados de los calibrados para molibdeno(VI) y boro(III), reflejados en las Tablas VII.7 y VII.11 en primera derivada y VII.15 y VII.19 en segunda derivada para molibdeno y boro, respectivamente.

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar tanto de los blancos, así como de cada uno de los patrones usados para el establecimiento de las rectas de calibrado, respectivamente.

Las desviaciones estándar obtenidas para cada una de las concentraciones de B(III) y Mo(VI) en los calibrados de la primera y segunda derivada de los

espectros sincrónicos se reflejan en las Tablas VII.27 y VII.28.

Tabla VII.27

Desviaciones estándar de cada concentración de los calibrados de Mo(VI)

Primera derivada (λ = 447nm)		*Segunda derivada (λ = 472nm)*	
[Mo],ppm	$s.10^2$	[Mo],ppm	$s.10^2$
0'00	1'33	0'00	3'52
0'10	1'26	0'10	3'31
0'30	1'20	0'30	3'14
0'50	1'19	0'50	3'13
0'70	1'25	0'70	3'26
0'90	1'37	0'90	3'61

Tabla VII.28

Desviaciones estándar de cada concentración de los calibrados de B(III)

Primera derivada (λ = 476 nm)		*Segunda derivada (λ = 446 nm)*	
[B],ppm	$s.10^2$	[B],ppm	$s.10^2$
0'0	4'09	0'00	4'10
0'3	3'92	0'30	3'94
0'7	3'78	0'70	3'78
1'1	3'73	1'10	3'74
2'0	3'89	2'00	3'90
3'0	4'46	3'00	4'47

La estimación de todos los parámetros característicos de la determinación conjunta de boro y molibdeno, calculados a partir del conjunto de datos de los calibrados aparece en la Tabla VII.28.

Tabla VII.28

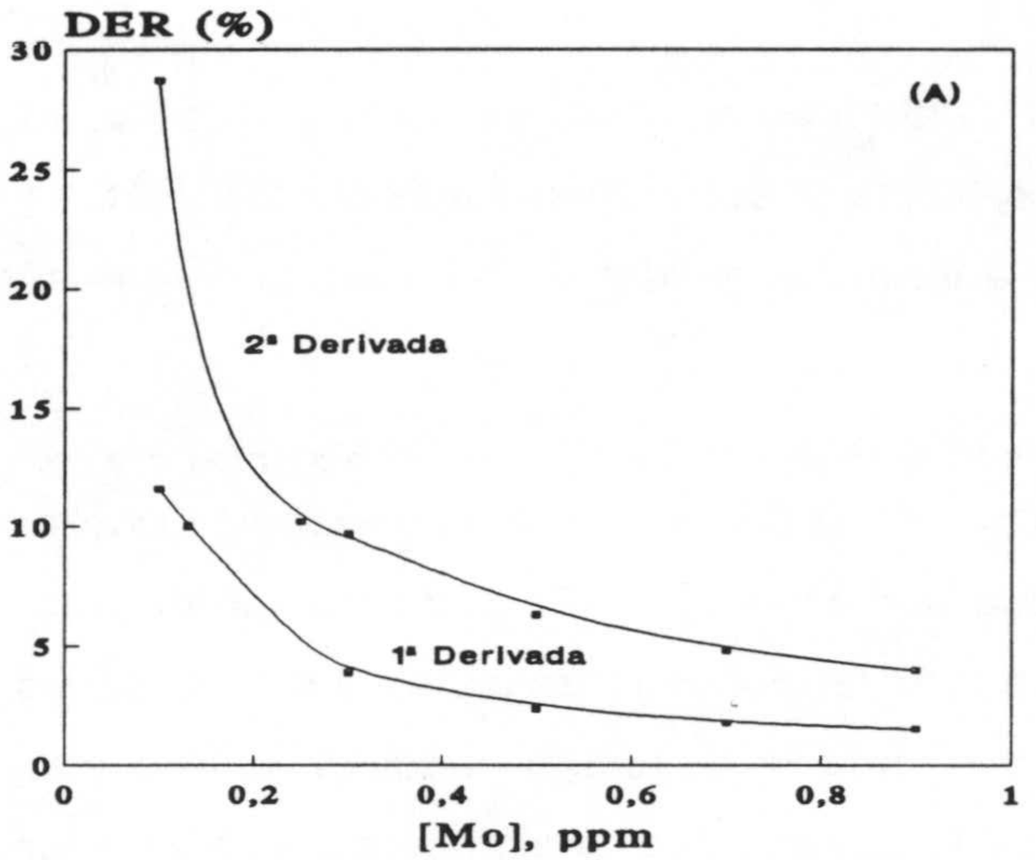
Parámetros de Fiabilidad según el modelo de Regresión lineal

Analito	Metodo	Linealidad(%)	Sens. anal. (ppm)	LD (ppm)	LQ (ppm)
Mo	1D	98'59	0'02	0'04	0'13
	2D	96'30	0'05	0'10	0'25
B	1D	98'64	0'06	0'12	0'40
	2D	98'62	0'07	0'13	0'42

Precisión (DER,%)	**Mo**			**B**	
(ppm)	1D	2D	(ppm)	1D	2D
0'1	11'58	28'71	0'3	12'88	14'81
0'3	3'88	9'68	0'7	5'40	4'96
0'5	2'37	6'29	1'1	3'22	3'27
0'7	1'79	4'81	2'0	1'94	1'96
0'9	1'52	3'97	3'0	1'50	1'50

En la Figura VII.17 se observa la representación de la desviación estándar relativa de la primera y segunda derivada del espectro sincrónico para a cada valor de concentración de B(III) y Mo(VI), respectivamente, de modo que es posible estimar la precisión para cualquier valor de concentración dentro del rango lineal para ambos calibrados.

Se incluye también en la gráfica el valor del límite de cuantificación, al cual le corresponde un error del 10%.



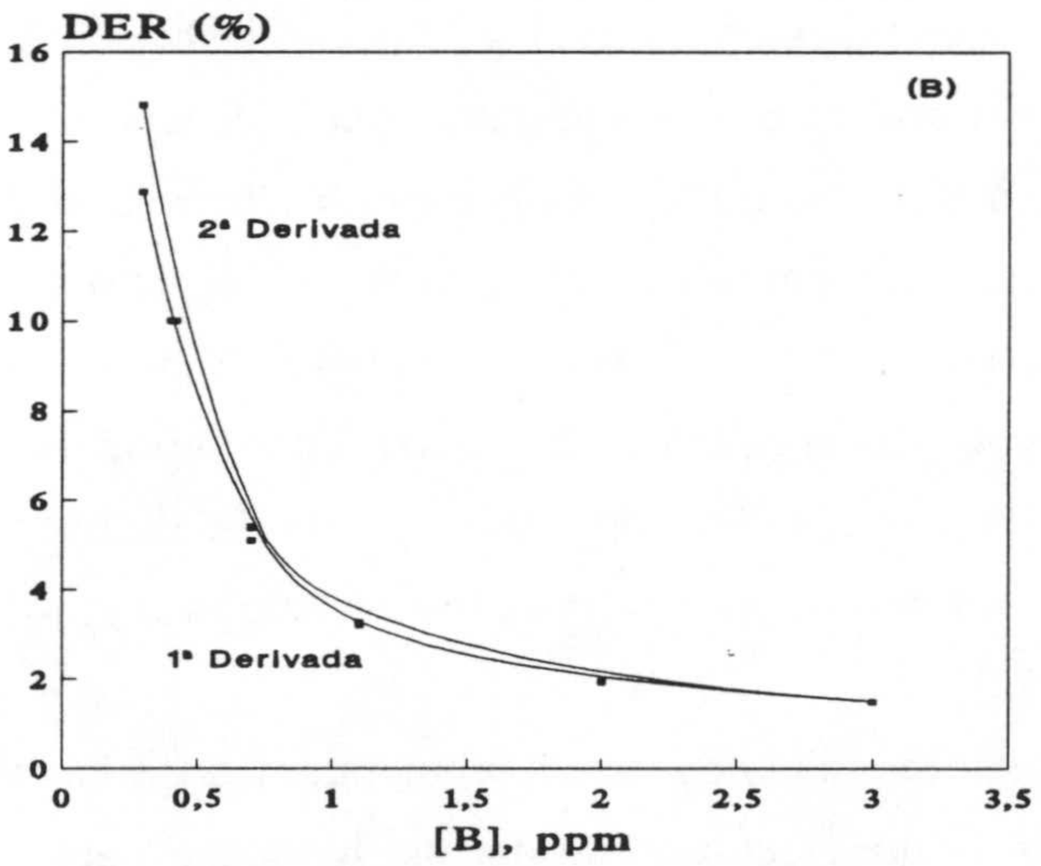


Figura VII.17. Estimación de la precisión. (A) Determinación de molibdeno. Rango 0'1-0'9 ppm; (B) Determinación de boro. Rango 0'3-3'0 ppm

* *Comparación de los parámetros de calidad del método estimados mediante los criterios de la IUPAC y el modelo de regresión lineal*

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

En primer lugar, cabe destacar que la sensibilidad de calibrado no es un parámetro que pueda ser usado para la comparación de dos metodologías de medida ya que depende de las condiciones instrumentales usadas y no proporciona información acerca de la mejora de una metodología con respecto a otra (**32,33**).

En el caso de la sensibilidad analítica calculada utilizando la desviación estándar de regresión ($s_{R,C}/b$), si es posible su uso como parámetro comparativo ya que nos indica la menor diferencia en concentración que el método es capaz de discernir en todo el rango lineal, independientemente del instrumento utilizado y de las transformaciones matemáticas realizadas para obtener la señal analítica, como puede ser la diferenciación numérica. Así, podemos concluir que en la determinación conjunta de boro(III) y molibdeno(VI) con Rojo de Alizarina S, la sensibilidad analítica se empeora al aumentar el orden de derivación, fundamentalmente en el caso del molibdeno, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que la segunda derivada del espectro sincrónico presenta una mayor dispersión en las medidas, que se traduce, en un aumento de la desviación estándar de regresión, $s_{R,c}$ y un empeoramiento de las características del calibrado.

Los límites de detección y determinación muestran valores más elevados al obtenerlos utilizando la desviación estándar del blanco a partir de los datos del calibrado, calculada como ya se indicó en el Capítulo I, que mediante la aproximación de la IUPAC. Esto es consecuencia de que en esta aproximación se asume que la pendiente es un parámetro constante en el calibrado mientras que al utilizar las expresión para los Límites de Detección y de cuantificación que propone el modelo de regresión lineal, la imprecisión de este valor es tenida en

cuenta mediante la desviación estándar de regresión, $s_{R,c}$, afectando considerablemente el resultado en el caso de las técnicas de derivadas, donde la dispersión aumenta al aumentar el orden de derivación (**34,35**).

En el cálculo de la precisión utilizando los datos del calibrado, no sólo se tiene en cuenta la imprecisión asociada a un valor de concentración replicado, sino que se consideran los errores asociados a la pendiente y la ordenada en el origen, obteniéndose una representación gráfica (Figura VII.17), donde se pone de manifiesto que, en el caso de la determinación de Mo(VI) los errores relativos son más elevados cuando se mide la segunda derivada del espectro sincrónico mientras que en el caso del boro no se observa empeoramiento al cambiar de metodología.

SELECTIVIDAD

Con el fin de comprobar la aplicabilidad del método propuesto para la determinación simultánea de B(III) y Mo(VI) en tejidos vegetales, donde es interesante su cuantificación, se ha estudiado el efecto que la presencia de iones extraños, comunmente encontrados en este tipo de material, ejerce en la determinación por espectrofluorimetría sincrónica-derivada, así como la influencia de determinados agentes enmascarantes.

Como criterio para decidir si la sustancia es o no interferente, se aplica el modelo propuesto en el Capítulo I, basado en la obtención de un intervalo de confianza sobre las señales analíticas, $\Delta R = s_R.t(\alpha = 0'10, n\text{-}2\ gl, n = n^o$ de puntos del calibrado), correspondientes a la concentración de analito sobre la que se va a ensayar la interferencia, utilizando los datos de los calibrados establecidos.

La experiencia que se llevó a cabo fue la siguiente:

En matraces de 10 ml se introdujeron concentraciones constantes de B(III) y Mo(VI) iguales a 0'5 ppm y cantidades decrecientes de cada uno de los iones

ensayados como posibles interferentes, comenzando por 500 ppm y disminuyendo esta concentración hasta alcanzar un valor de señal analítica comprendida dentro de intervalo de confianza. Posteriormente, se adicionan las cantidades adecuadas de tampón, KCl y reactivo, para obtener la concentración ya optimizada y se procede al registro de los espectros sincrónicos y de sus derivadas de primer y segundo orden.

Para las concentraciones de Molibdeno y Boro seleccionadas se han obtenido las señales predichas para las corespondientes concentraciones seleccionadas, así como los intervalos de confianza sobre las mismas en función de la desviación estándar s_R, obtenidos utilizando las metodologías de primera y segunda derivada del espectro sincrónico. Los resultados se muestran en la Tabla VII.30.

Todos los valores que no estén incluidos dentro de los intervalos de confianza de las señales analíticas predichas, deducidos a partir de los datos del calibrado, implican que la sustancia es interferente en todo el rango lineal establecido para la determinación de B(III) y Mo(VI).

Tabla VII.30

Intervalos de confianza sobre señales y concentraciones en primera y segunda derivada

Analito	Metodo	Señal (R)	s_R	$\Delta R(\pm)$	ICR
Mo	1D	22'82	0'774	1'35	21'5-24'2
	2D	2'61	0'247	0'43	2'2- 3'0
B	1D	6'90	0'715	1'24	5'7-8'1
	2D	1'47	0'142	0'25	1'2-1'7

s_R = Desviación estándar de la señal
Intervalo de confianza sobre la señal: $\Delta R = \pm t_{2\alpha,n-2\ gl} \cdot s_R$; $t_{0'10,16\ gl} = 1'746$

Fundamentalmente en las determinaciones analíticas basadas en la aplicación de la técnica sincrónico-derivada no es adecuado utilizar como criterio de tolerancia en el estudio de interferentes un valor arbitrario de error sobre señal o sobre concentración ya que no se considera la magnitud de los errores accidentales de la metodología utilizada, ni tampoco se tienen en cuenta la variación de estos en función del nivel de concentración de analito sobre el cual se ha realizado el estudio.

Estos argumentos nos llevan a proponer una nueva forma de estimar la tolerancia de sustancias interferentes a partir de los datos del calibrado, como ya se ha explicado en el Capítulo I, la cual ha sido aplicada a todos los métodos fluorimétricos desarrollados en esta memoria, con especial interés en el caso de la metodología de derivadas, en las que la diferenciación de la señal provoca un aumento en el ruido de fondo a medida que aumenta el orden de derivación, lo cual provoca mayor dispersión en las medidas y mayores errores en los datos derivados del calibrado (**34**), que han de ser tenidos en cuenta en el establecimiento del intervalo de confianza.

En las Tablas VII.31 y VII.32 se muestran las señales analíticas para los diferentes iones ensayados en la determinación conjunta de Mo(VI) y B(III) respectivamente, mediante las metodologías de primera y segunda derivada del espectro sincrónico.

A partir de estos valores y utilizando el método de interpolación de Lagrange mediante el submenu del programa desarrollado, se estiman las concentraciones permitidas de interferentes en la determinación simultánea de ambos iones.

Los resultados aparecen en la Tabla VII.33, donde se observa que las principales interferencias son producidas por Fe(II), Fe(III) y Cu(II). Esto implica que, debido a que su contenido en tejidos vegetales es elevado, será necesaria su eliminación antes de realizar la determinación mediante la utilizacion de una resina de intercambio iónico.

Los demás iones ensayasados no interfieren en ambas metodologías a los niveles usualmente encontrados en material vegetal.

Tabla VII.31. Estudio de Interferencias en la determinación de Mo(VI)

Ión extraño	Cx/C_{Mo}	Cx(ppm)	Log Cx	R(1D)	R(2D)
Li(I)	1000	500	2'70	22'7	2'4
Na(I)	1000	500	2'70	21'8	2'7
K(I)	1000	500	2'70	23'0	2'9
Mg(II)	1000	500	2'70	48'0	8'0
	500	250	2'40	31'1	5'0
	100	50	1'70	23'8	2'8
Ca(II)	1000	500	2'70	22'9	2'6
Mn(II)	1000	500	2'70	23'0	2'7
Fe(II)	10	5	0'70	7'3	0'8
	5	2'5	0'40	13'8	1'5
	2	1	0'00	19'5	2'4
	1	0'5	-0'3	20'2	___
	0'5	0'25	-0'6	21'9	___
Fe(III)	10	5	0'70	5'0	0'8
	5	2'5	0'40	12'5	1'5
	2	1	0'00	17'8	2'5
	1	0'5	-0'3	21'8	___
Cu(II)	10	5	0'70	15'1	1'9
	5	2'5	0'40	20'2	2'4
	3	1'5	0'17	22'3	___
Zn(II)	500	250	2'40	ppta	ppta
	100	50	1'70	10'7	2'5
	50	25	1'40	13'9	___
	25	12'5	1'10	22'0	___
NO_3^-	1000	500	2'70	23'2	2'4
NO_2^-	1000	500	2'70	22'8	2'3
SO_4^{2-}	1000	500	2'70	23'2	2'8
F^-	1000	500	2'70	40'2	2'8
	500	250	2'40	23'0	___
Tartrato	1000	500	2'70	16'1	2'4
	500	250	2'40	21'7	___

R(1) = Señal en 1ª derivada, R(2) = señal en 2ª derivada

Tabla VII.32. Estudio de Interferencias en la determinación de B(III)

Ión extraño	Cx/C_B	Cx(ppm)	Log Cx	R(1D)	R(2D)
Li(I)	1000	500	2'70	6'6	1'4
Na(I)	1000	500	2'70	6'8	1'7
K(I)	1000	500	2'70	7'0	1'7
Mg(II)	1000	500	2'70	14'3	4'6
	500	250	2'40	7'9	2'7
	100	50	1'70	___	1'6
Ca(II)	1000	500	2'70	12'9	1'8
	500	250	2'40	8'0	___
Mn(II)	1000	500	2'70	7'8	1'5
Fe(II)	10	5	0'70	0'3	0'2
	5	2'5	0'40	1'8	0'5
	2	1	0'00	4'5	0'8
	1	0'5	-0'30	5'3	1'5
	0'5	0'3	-0'60	6'3	___
Fe(III)	10	5	0'70	1'0	0'1
	5	2'5	0'40	2'3	0'2
	2	1	0'00	4'1	0'8
	1	0'5	-0'30	___	1'4
Cu(II)	10	5	0'70	2'8	0'3
	5	2'5	0'40	5'4	0'7
	3	1'5	0'17	6'5	1'3
Zn(II)	500	250	2'40	ppta	ppta
	100	50	1'70	3'2	0'8
	50	25	1'40	5'0	1'4
	25	12'5	1'10	6'2	___
NO_3^-	1000	500	2'70	6'7	1'4
NO_2^-	1000	500	2'70	7'2	1'5
SO_4^{2-}	1000	500	2'70	7'5	1'7
F^-	1000	500	2'70	7'2	1'6
Tartrato	1000	500	2'70	6'7	1'3

R(1) = Señal en 1ª derivada, R(2) = señal en 2ª derivada

Tabla VII.33. Niveles de tolerancia para B(III) y Mo(VI) expresados en concentración (ppm)

Ión extraño	Mo		B	
	1D	2D	1D	2D
Li(I)	500	500	500	500
Na(I)	500	500	500	500
K(I)	500	500	500	500
Ca(II)	500	500	500	500
Mn(II)	500	500	500	500
Fe(III)	0'5	1'4	0'7	0'7
Fe(II)	0'3	1'3	0'4	0'5
Cu(II)	2'0	3'5	2'3	1'6
Zn(II)	13'1	50	18'6	15'9
NO_3^-	500	500	500	500
NO_2^-	500	500	500	500
SO_4^{2-}	500	500	500	500
F^-	264	500	500	500
Tartrato	261	500	500	500

En cuanto al uso de enmascarantes, se ensayó la sal disódica del EDTA en concentraciones molares, seleccionándose un valor de 5.10^{-4} M, el cual no produce interferencia en la determinación conjunta en ninguna de las metodologías de medida empleadas.

Aunque esta concentración no es suficiente para producir una mejora de la selectividad de la determinación, si es suficiente para impedir que se produzca la precipitación del ión Fe(III) existente en las matrices vegetales tratadas cuando se produce la neutralización del extracto trás haber realizado el tratamiento de las cenizas con HCl, que se describe en la parte de aplicaciones analíticas.

5.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Una vez establecidas las rectas de calibrado, se propone el siguiente procedimiento para la determinación conjunta de Mo(VI) y Bo(III) con Rojo de Alizarina S mediante fluorescencia sincrónica-derivada:

En matraces de 10 ml se introduce la disolución problema cuyo contenido final debe estar comprendido entre 0'1-3'0 ppm de B(III) y 0'04-0'9 ó 0'1-0'9 ppm de Mo(VI), si se mide en 1ª ó 2ª derivada, respectivamente. Se adicionan 3 ml de disolución reguladora fosfato monosódico/disódico de pH 6'3 0'1 M, 4 ml de disolución de KCl 2'5 M y 0'8 ml de disolución de Alizarina S 10^{-3}M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada.

Se registran los espectros sincrónicos a 25°C, utilizando un $\Delta\lambda$ = **150 nm**, *con las siguientes condiciones instrumentales: Rendijas de excitación y emisión: 10,10; velocidad de barrido 480 nm/min; tiempo de respuesta 0'5 s.*

Se obtiene la primera y segunda derivada de éstos midiendo la distancia vertical desde el espectro hasta la linea base a las siguientes longitudes de onda:

Mo-ARS(h1): $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 447/597 nm (1ª derivada)

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 472/622 nm (2ª derivada)

B-ARS (h2): $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 476 /626 nm (1ª derivada)

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 446/596 nm (2ª derivada)

Para la obtención de ambas derivadas se utilizó un $\Delta\lambda'$ de 25 nm.

El contenido en B(III) y Mo(VI) se determina a partir de las correspondientes rectas de calibrado.

6. APLICACIONES ANALÍTICAS

6.1. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE BORO Y MOLIBDENO EN MEZCLAS SINTÉTICAS

Con el fin de estudiar la eficiencia del método propuesto para la determinación simultánea de ambos iones en una muestra real, se ha estudiado el efecto que ejerce cada uno de los iones sobre la respuesta del otro.

Para ello, se ha aplicado el método a muestras que contienen diferentes proporciones de ambos analitos, varlando progresivamente la relación entre los límites 1:1 y 1:30. Se registraron las señales analíticas a las correspondientes longitudes de onda de la 1ª y 2ª derivada de los espectros sincrónicos.

Las concentraciones ensayadas y los resultados obtenidos como promedio de tres determinaciones, en cada caso se reunen en la Tabla VII.34.

Tabla VII.34

Resolución de mezclas sintéticas de Mo(VI)-RAS y B(III)-RAS en 1ª y 2ª derivadas del espectro sincrónico

1ª Derivada

Relación Mo:B	Mo(VI), ppm Puesto	Hallado*	Er(%)	B(III), ppm Puesto	Hallado*	Er(%)
1:1	0'5	0'499	0'2	0'5	0'517	3'4
1:2	0'5	0'484	4'0	1'0	1'017	1'7
1:5	0'2	0'189	5'5	1'0	1'009	0'9
1:10	0'1	0'095	5'0	1'0	0'997	0'3
1:30	0'1	0'094	6'0	3'0	2'978	0'7

2ª Derivada

Relación Mo:B	Mo(VI), ppm Puesto	Hallado*	Er(%)	B(III), ppm Puesto	Hallado*	Er(%)
1:1	0'5	0'477	4'6	0'5	0'517	5'2
1:2	0'1	0'101	1'4	1'0	1'017	5'5
1:5	0'2	0'192	4'0	1'0	1'009	2'8
1:10	0'1	0'106	7'0	1'0	0'997	2'1

* Media de tres determinaciones

6.2. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE BORO Y MOLIBDENO EN TEJIDOS VEGETALES

Para comprobar la utilidad del método propuesto, éste ha sido aplicado en muestras vegetales, en las que es de gran utilidad disponer de un método que permita la determinación simultánea de boro y molibdeno en un único tratamiento.

En este tipo de muestras, la diferencia entre los contenidos de ambos elementos es elevada, siendo bastante superiores los niveles de B(III) que los de Mo(VI). Esto pone de manifiesto la conveniencia de disponer de un método de

determinación conjunta, que contemple, en términos de sensibilidad, la diferencia entre los contenidos, permitiendo la cuantificación de ambos oligolementos en una misma muestra y en un único barrido mediante la técnica de espectrofluorimetría sincrónico-derivada.

Las muestras seleccionadas para el estudio fueron:

- Hojas de melón, suministradas por el Dpto. de Fisiología Vegetal (Univ. de Granada)
- Hojas de tomate, procedentes de cultivos en invernaderos de El Ejido (Almería)

Tratamiento de las muestras

Las hojas finamente divididas se introducen en estufa hasta eliminación de la humedad. Posteriormente se procede a su trituración hasta un polvo fino, el cual se introduce en estufa, entre 65-70°C durante unas 16 horas (hasta pesada constante).

Se pesa en cápsula de porcelana, a temperatura ambiente, una cantidad de aproximadamente 3-5 g, la cúal es introducida en horno mufla y sometida a una temperatura de 500°C durante 2 h. Las cenizas resultantes son humedecidas con agua destilada y posteriormente tratadas con 3 ml de HCl (1:1), calentándose en placa durante unos minutos a unos 70°C. Las paredes de la cápsula son lavadas con agua caliente y se procede a su filtrado y lavado en caliente sobre papel de filtro lavado al ácido (**36**).

Se adicionan 1'25 ml de disolución de EDTA disódico 0'1 M y la disolución resultante es neutralizada hasta pH 3'0-3'5 con NaOH 0'1 M, ya que en medios fuertemente ácidos el molibdeno(VI) puede encontrarse en forma de cationes

MoO_2^{2+}, MoO^{4+} y $HMo_2O_6^+$ (**37**). La disolución de EDTA disódico es adicionada para acomplejar al Fe(III) existente en las muestras, evitando así la precipitación del hidróxido al comenzar la neutralización.

La muestra se trasfiere finalmente a un matraz de 25 ml, diluyendo hasta el volumen final con agua destilada.

Con objeto de eliminar la interferencia que ocasiona la presencia de Fe(III) y Cu(II) en la determinación de boro y molibdeno en tejidos vegetales, se procede a su eliminación haciendo pasar una alícuota de 10 ml, con un caudal de 0'5 $ml.min^{-1}$, a través de una resina de intercambio catiónico (Amberlita IR-120, ciclo H^+, 100-200 mesh), previamente purificada mediante lavado con agua destilada y regenerada con HCl 4 M.

La solución resultante del intercambio iónico es neutralizada con hidróxido sódico, transferida a un matraz de 25 ml y enrasada hasta el volumen final con agua destilada.

Procedimiento

El contenido en boro y molibdeno se determinó introduciendo, en matraces de 10 ml, alícuotas de disolución de muestra de 2'25 ml, 3 ml de disolución reguladora fosfato monosódico/disódico de pH 6'3, 4 ml de disolución de KCl 2'5 M y 0'08 ml de disolución de RAS 10^{-2} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. Se registran los espectros sincrónicos a 25°C, utilizando las condiciones instrumentales de las rectas de calibrado y se mide el contenido de ambos iones a las longitudes de onda ya seleccionadas.

Debido a los bajos contenidos en molibdeno que presentan estas matrices vegetales y habiendose observado peores resultados en los límites de detección

y de determinación y en la precisión en la segunda derivada, solamente ha sido aplicada la primera derivada del espectro sincrónico para el análisis de este tipo de muestras.

Determinación del contenido en molibdeno y boro en hoja de melón y tomate

Se ha procedido a la validación del método utilizando la metodología de la adición de patrón ya descrita y aplicada en capítulos anteriores, en los que han sido determinados boro y molibdeno por fluorescencia directa en el mismo tipo de matrices, poniéndose de manifiesto que las pendientes del calibrado y de la adición no difieren significativamente tanto para boro como para molibdeno, y por tanto, es posible la utilización de esta metodología, obteniéndose el contenido de molibdeno por el método de adición de patrón debido al bajo contenido en este tipo de muestras.

* *Comprobación de la exactitud*

Ensayos de Recuperación

Se ha estimado la exactitud del método mediante el cálculo de la recuperación al adicionar a una determinada cantidad de muestra, concentraciones conocidas del analito a determinar, siempre antes de llevar a cabo el proceso de eliminación de interferencias, que en este tipo de muestras ha consistido en el paso a través de una resina de intercambio catiónico en ciclo ácido. De este modo, no sólo se consigue la evaluación de la exactitud, sino también la comprobación de que no existen pérdidas de ambos analitos en el proceso de eliminación de interferentes aplicado.

Se han realizado tres adiciones para boro y molibdeno, obtieniéndose una

recuperación media, cuyo valor es contrastado frente a la unidad, mediante el test de la t de Student. Los cálculos se han llevado a cabo mediante la aplicación informática desarrollada en esta memoria, que utiliza las expresiones generales ya descritas en el Capítulo I, poniéndose de manifiesto mediante el test de comparación frente a la unidad, que la recuperación obtenida del método no es significativamente distinta de 1 (o del 100%), ya que el valor de t(ℜ) calculado es inferior al tabulado para el nivel de significación seleccionado y los grados de libertad adecuados, lo que implica que el método es exacto y que la eliminación de interferentes no lleva consigo pérdidas considerables de ninguno de los dos iones a determinar en el método propuesto.

Los resultados se muestran en las Tablas VII.35 y VII.36.

Tabla VII.35

Comprobación de la exactitud en hoja de melon: Ensayos de Recuperación

[Mo] adic. ($\mu g.ml^{-1}$)	[Muestra] ($mg.ml^{-1}$)	Recuperación (ℜ) Mo	B
0'3	18	0'963	0'962
0'5		0'984	0'984
0'7		0'947	0'985

Mo: $\Re = 0'9647$; $s_{\Re} = 0'0186$; $t(\Re) = 2'590$ (P = 12'2%); $t_{tab}(\alpha = 0.05, 3\ gl) = 4'303$
B: $\Re = 0'9770$; $s_{\Re} = 0'0130$; $t(\Re) = 2'444$ (P = 13'4%); " " "
$s_{\Re}$ = Desviación estándar de los valores de recuperación obtenidos
$t(\Re)$ = Estadístico calculado para comparar la recuperación media frente a la unidad

Tabla VII.36

Comprobación de la exactitud en hojas de tomate: Ensayos de Recuperación

[Mo] adic. ($\mu g.ml^{-1}$)	[Muestra] ($mg.ml^{-1}$)	Recuperación (ℜ) Mo	B
0'3	18	0'960	0'912
0'5		0'976	1'001
0'7		0'990	0'990

Mo: ℜ = 0'9753; $s_{\Re}$ = 0'0150; t(ℜ) = 2'271 (P = 15'1%); $t_{tab}(\alpha = 0'05, 3\ gl) = 4'303$
B: ℜ = 0'9677; $s_{\Re}$ = 0'0485; t(ℜ) = 0'911 (P = 45'8%) " " "
$s_{\Re}$ = Desviación estándar de los valores de recuperación obtenidos
t(ℜ) = Estadístico calculado para comparar la recuperación media frente a la unidad

* *Resultado del análisis*

Se han llevado a cabo tres tratamientos con tres porciones diferentes de muestra de hoja de melón y de tomate. Los resultados de la determinación de boro y molibdeno se reflejan en las Tablas VII.37 y VII.38.

Tabla VII.37

Determinación de molibdeno y boro en hoja de melón

Determinación	$[Mo]_{mat.seca}$ ($\mu g.g^{-1}$)	$[B]_{mat.\ seca}$ ($\mu g.g^{-1}$)
1	1'20	30'09
2	1'45	27'28
3	1'22	30'23
Cm	1'29	29'20
s	0'139	1'664
DER	10'8 %	5'7 %

Tabla VII.38

Determinación de molibdeno y boro en hoja de tomate

Determinación	$[Mo]_{mat.seca}$ ($\mu g.g^{-1}$)	$[B]_{mat.\ seca}$ ($\mu g.g^{-1}$)
1	2'61	24'75
2	2'26	23'52
3	2'21	22'59
Cm	2'36	23'62
s	0'217	1'083
DER	9'2 %	4'6 %

Los resultados obtenidos en este Capítulo han sido publicados en Analytical Chimica Acta, **283**, 213 (1993).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

VII.1. J.B. F. Lloyd, *Nature*, **231**, 64 (1971).

VII.2. S. Rubio, A. Gómez-Hens y M. Válcarcel, "Analytical applications of Synchronous Fluorescence Spectroscopy", *Talanta*, **33, 633 (1986).**

VII.3. J.N. Miller, T.A. Ahmad y A.F. Fell, *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **16**, 37 (1982).

VII.4. P. Jonh y I. Soutar, *Anal. Chem.*, **48**, 520 (1976).

VII.5. G.L. Green y T.C. O'Haver, *Anal. Chem.*, **46**, 2191 (1974).

VII.6. A.F. Fell y G. Smith, *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **19**, 28 (1982).

VII.7. M. Salgado, C. Bosh, F. Sánchez Rojas y J.M. Cano Pavón, "Espectrofluorimetría de Derivadas y sincrónica. Principios y Aplicaciones", *Química Analítica*, **5**, 4 374 (1986)

VII.8. J.B.F. Lloyd, *Analyst*, **99**, 729 (1974).

VII.9. T. Vo-Dihn, *Anal. Chem.*, **50**, 396 (1978).

VII.10. T. Vo-Dihn y P.R. Martinez, *Anal. Chim. Acta*, **125**, 13 (1981).

VII.11. M. Tachibana y M. Funsawa, "Selective and simultaneous determination of trace amounts of 5H-bezo[b]carbazole and nephtacene in a variety of analogous chemicals using the zone-melting technique and synchronous fluorescence spectrometry ", *Analyst*, **117**, 1485 (1992).

VII.12. J.J. Santana Rodriguez, Z. Sosa Ferrera, A. Alfonso Perera y V. González Díaz, "Sensitive simultaneous determination of Benzo(A)pyrene, Perylene and Chrysene by synchronous spectrofluorimetry in nonionic micellar media", *Talanta*, **39**(12), 1611 (1992).

VII.13. C. Cruces Blanco y F. García Sánchez, "Determination of the fungicide dichlone by normal and first derivative spectrofluorimetry", *Anal. Chim. Acta*, **166**, 277 (1984).

VII.14. C. Cruces Blanco y F. García Sánchez, "Detemination of Giberellic acid residues on fruits by synchronous scanning derivative spectrofluorimetry", *J. Ass. of Anal. Chem.*, **69**(1), 105 (1986).

VII.15. F. García Sánchez y C. Cruces Blanco, "Spectrofluorimetric determination of pesticide residue mixtures by issodifferential derivative spectroscopy", *Anal. Chem.*, **60** (4), 323 (1988).

VII.16. A.L. Ramos Rubio, C. Cruces Blanco y F. Gracía Sánchez, "Synchronous scanning first and second derivative spectrofluorimetric determination of the alkaloid boberine", *Fresenius Z' Anal. Chem.*, **323**, 153 (1986).

VII.17. F. García Sánchez, C. Cruces Blanco y A.L. Ramos rubio, "Multicomponent fluorescenct analysis by synchronous derivative method to determine mixture of Beberine, Luguine and Sanguinarine", *Talanta*, **37**(6), 579 (1990).

VII.18. A. Alarcón, A.I. Martínez, M. Morell y J.J. Laserna, *Microchem. J.*, **38**, 362 (1988).

VII.19. F. Salinas, A. Muñoz de la Peña y M.S. Durán Merás, "Analysis of mixtures of Oxytetracycline and Rivoflavine by first-derivative synchronous spectrofluorimetry", *Analyst*, **116**, 291 (1991).

VII.20. C. Cruces Blanco y F. García Sánchez, "Spectrofluorimetric and synchronous scanning first derivative spectrofluorimetry determination of Magnesium with SAPH", *Anal. Chem.*, **56**, 2033.

VII.21. F. García Sánchez, A. Navas y M. Santiago, *Anal. Chim. Acta*, **167**, 217 (1985).

VII.22. F. Capitán, A. Navalón, E. Manzano, L.F. Capitán-Vallvey y J.L. Vichez, "Determination of Boron with Chromotropic Acid by first-derivative synchronous spectrofluorimetry", *Fresenius J. Anal. Chem.*, **340**, 6 (1991).

VII.23. S. Rubio, A. Gómez-Hens y M. Válcarcel, "Analysis of binary and ternary mixtures of Titanium, Zirconium and Hafnium by derivative synchronous fluorescence spectrometry", *Anal. Chem.*, **57**, 1101 (1985).

VII.24. M.E. Ureña, A. García de Torres y J.M. Cano Pavón, *Anal. Chem.*, **59**, 1129 (1987).

VII.25. F. García Sánchez, J.C. Marquez y M. Hernández, "Fluorimetric determination of Aluminium and Beryllium in mixtures by synchronous derivative Spectrometry", *Analyst*, **112**, 649 (1987).

VII.26. A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, M.E. Sánchez y J.A. Murillo, "Simultaneos determination of Aluminium and Zinc by First- and Second-derivative Synchronous Fluorimetry", *Analyst*, **113**, 1435 (1988).

VII.27. F. Salinas, A. Muñoz de la Peña, L.F. Capitán-Vallvey y A. Navalón, "Simultaneous determination of Molybdenum and Tungsten by First-derivative synchronous spectrofluorimetry", *Analyst*, **114**, 1297 (1989).

VII.28. F. Capitán, G. Sánchez-Palencia, A. Navalón, L.F. Capitán-Vallvey y J.L. Vilchez, "Simultaneous determination of Molybdenum and Tungsten by first-derivative synchronous solid-phase spectrofluorimetry", *Anal. Chim. Acta*,

259, 345 (1992).

VII.29. A. Savitzky y M.J.E. Golay, *Anal. Chem.*, **36**, 1627 (1964).

VII.30. B. Morelli, "Zero crossing derivative spectrophotonmetric determination of mixtures of Cephapirin sodium and Cefuroxime sodium in pure from and in injection", *Analyst*, **113**, 1077 (1988).

VII.31. T.C. O'Haver, *Clin. Chem.*, **25**, 1548 (1979).

VII.32. J.D. Ingle Jr. " Sensitivity and limit of detection in quantitative spectrometric method". *J. Chem. Ed.*, **51(2)**, 100 (1971)

VII.33. R.K. Skogerboe y C.L. Grant. "Comments on the definitions of the terms sensitivity and detection limit", *Spectroscopy Lett.*, **3**, 215 (1970)

VII.34. T.C. O'Haver, "Derivative Spectroscopy: Theoretical Aspects", *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **19**, 22 (1982).

VII.35. T.C. O'Haver y T. Begley, "Signal-to-noise Ratio in Higher order Derivative Spectrometry". *Anal. Chem.*, **53**, 1876 (1981).

VII.36. J.López Ritas y J. López Melida. "El Diagnóstico de Suelos y Plantas". Ed. Mundi Prensa. Madrid (1985), p.320.

VII.37. F. Burriel, F. Lucena, S. Arribas y J. Hernández. *"Química Analítica Cualitativa"*. Ed. Paraninfo. Madrid (1989). p. 544-546.

CAPÍTULO VIII

DETERMINACIÓN CONJUNTA DE Mo(VI) Y W(VI) CON ROJO DE ALIZARINA S POR ESPECTROFLUORIMETRÍA SINCRÓNICA-DERIVADA EN MEDIO MICELAR

1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

1.1. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES

En anteriores Capítulos de esta Memoria han sido estudiados independientemente los complejos fluorescentes que forma el reactivo Rojo de Alizarina S (RAS), con Mo(VI) y W(VI) en medio micelar, utilizando el tensioactivo catiónico Bromuro de Cetiltrimetilamonio (BCTA), y posteriormente se han establecido las metodologías analíticas para su determinación.

Para observar la interacción entre las dos especies fluorescentes, se han registrado los espectros de excitación y de emisión de ambos complejos a pH 4'3, el cual está comprendido en la zona de meseta de las curva pH/intensidad de fluorescencia obtenidas para ambos complejos independientemente. Las concentraciones de Molibdeno y Wolframio ensayadas han sido de 250 ppb, siendo la concentración de RAS de $1'5.10^{-5}$ M y utilizando una concentración micelar de BCTA del 0'5 %, en ambos casos.

En la Figura VIII.1 se muestran los espectros de excitación y emisión, observándose una emisión máxima del complejo Mo(VI)-RAS a 618 nm, siendo la longitud de onda de excitación 488 nm y para el complejo W(VI)-RAS, la emisión es máxima a 605 nm, cuando la excitación es a 478 nm. En ambos casos se utilizaron rendijas de excitación y emisión de 10 nm. El registro se realizó en modo no corregido a 25°C, siendo la velocidad de barrido 480 nm/min y la respuesta 0'5 s.

Debido al alto grado de solapamiento que presentan ambos espectros de emisión, existiendo unicamente una diferencia de 10 nm en las longitudes de onda del máximo, no sería posible la determinación simultánea de ambos iones mediante fluorescencia convencional.

Con objeto de una posible resolución de la mezcla de analitos utilizando la técnica de fluorescencia sincrónica-derivada, sin necesidad de una previa separación, se han optimizado las variables experimentales que determinan la formación de los complejos, seleccionándose condiciones intermedias que permitan la máxima formación de ambas especies.

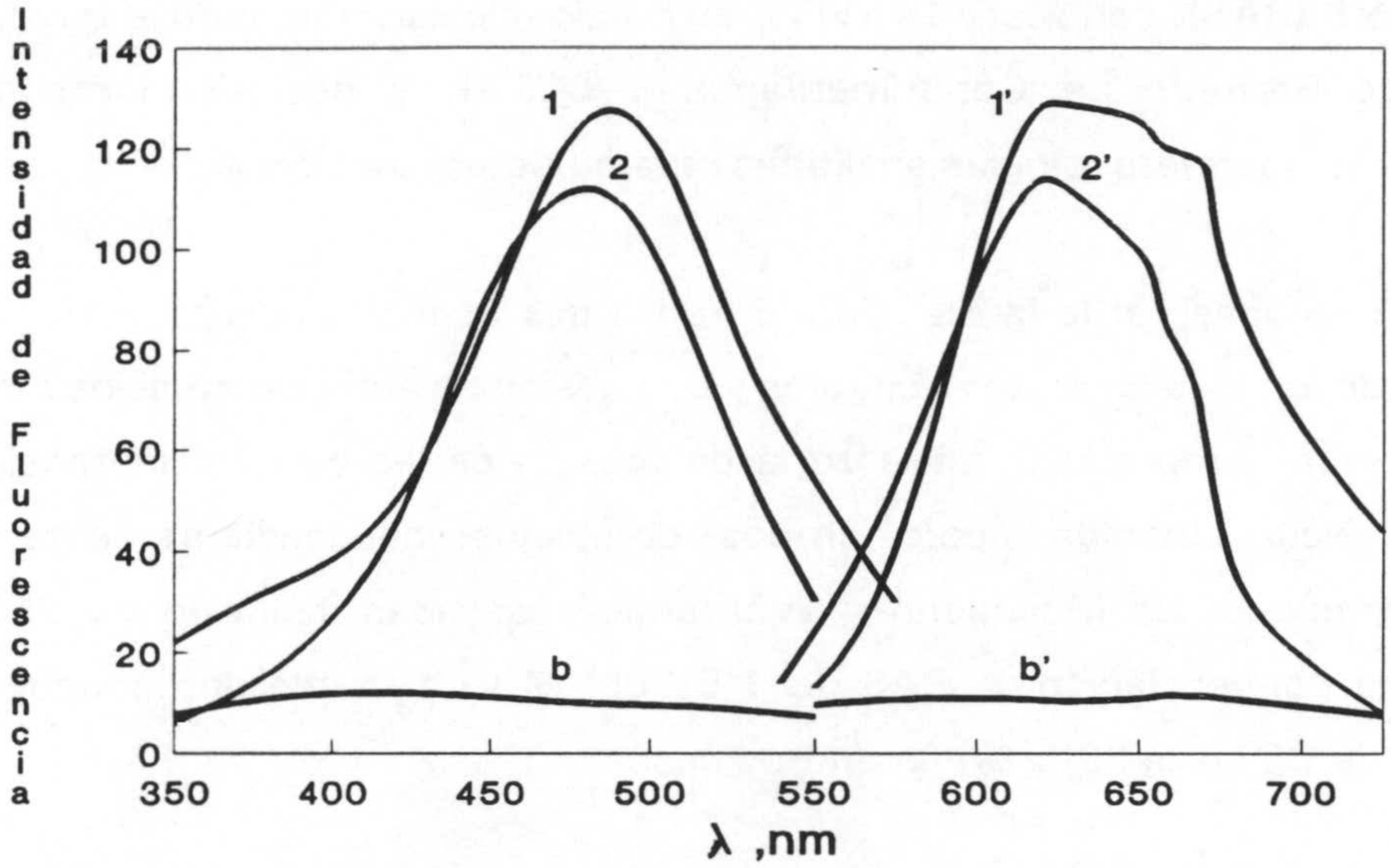


Figura VIII.1. Espectros de excitación y emisión de los complejos Mo(VI)-RAS (1,1′), W(VI)-RAS (2,2′), y blanco (b,b′) a pH 4′3. [W(VI)] = [Mo(VI)] = 250 ppb, [RAS] = 1′5.10^{-5} M, [BCTA] = 0′5%.

1.2. INFLUENCIA DEL PH

En capítulos anteriores han sido ya establecidas las condiciones óptimas de formación de los complejos individualmente. En el estudio del pH, se observó que, en el caso del complejo Mo(VI)-RAS, la zona en la que la fluorescencia es máxima

y constante se encuentra comprendida en el intervalo entre 4'3-5'0, mientras que para el complejo W(VI)-RAS, el valor máximo se consigue en la zona comprendida entre pH 3'0-4'3.

En la Figura VIII.2 se muestran superpuestas las curvas de pH obtenidas por diferencia entre las intensidades de fluorescencia de los complejos y de sus respectivos blancos, en presencia de BCTA, al realizar la optimización individual para ambas especies fluorescentes en los Capítulos III y IV. Las medidas de fluorescencia fueron realizadas a los máximos de excitación de 488 y 478 nm y a las longitud de onda de emisión de 618 nm y 605 nm para los complejos de Mo(VI) y W(VI) con Rojo de Alizarina S, respectivamente, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm.

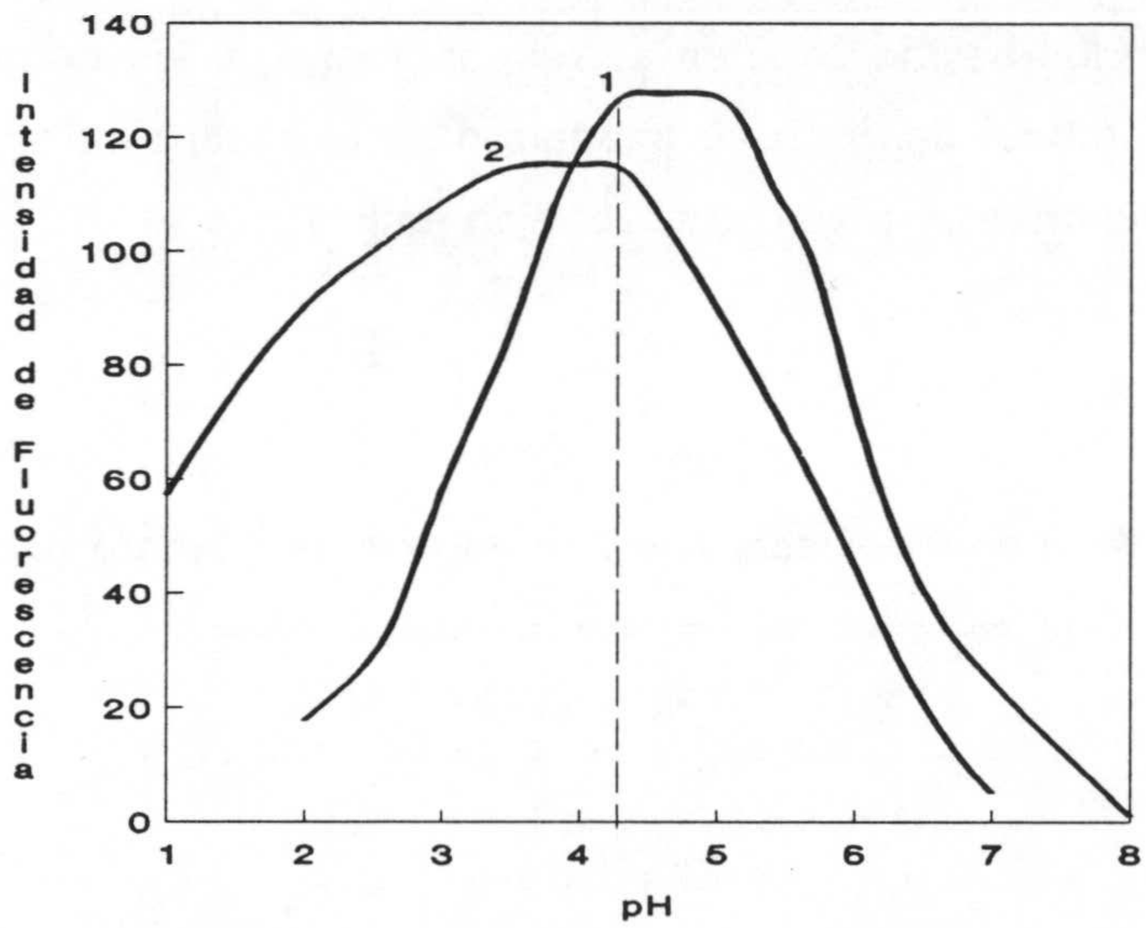


Figura VIII.2. Influencia del pH sobre la Intensidad de Fluorescencia de los complejos (1) [Mo(VI)] = [RAS] = 1.10^{-5} M; y (2) [W(VI)] = [RAS] = 5.10^{-5} M. [BCTA] = 0'5 %

Se comprueba que, en ambas curvas existe una zona de solapamiento del intervalo de pH en el que la intensidad de fluorescencia es máxima y constante, seleccionándose un pH óptimo de trabajo de 4'3, ya que a este valor se consigue una total formación de ambos complejos fluorescentes.

1.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TAMPÓN

En matraces de 10 ml se adicionaron 0'1 ml de disoluciones de Mo(VI) o de W(VI) de 100 ppm, volúmenes crecientes de disolución acético/acetato 0'1 M de pH 4'3 y 1'0 ml de BCTA al 5 % y 1'5 ml de disolución de RAS 10^{-4} M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada. Las medidas se realizaron a las longitudes de onda de los máximos de ambos complejos siendo las rendijas utilizadas en ex/em de 5 nm y la temperatura de 25°C.

Los resultados de las señales correspondientes a los complejos y a un blanco común a ambos, dado que la magnitud de la inluencia del reactivo es la misma a las condiciones de medida, se reflejan en la Tabla VIII.1.

Tabla VIII.1

Influencia de la concentración de Tampón Acético/Acetato, pH 4'3

V(ml)	IF, Mo	IF, W	IFb
0'5	109'9	93'9	5'0
1'0	112'5	93'8	4'8
1'5	113'5	93'5	5'4
2'0	112'9	96'3	5'8
2'5	109'7	96'4	6'0
3'0	111'6	96'2	6'4
3'5	111'1	96'9	7'6

A la vista del resultado, se selecciona para posteriores experiencias, un volumen de tampón acético/acetato 0'1 M de 2'0 ml, en un volumen final de 10 ml, no alterándose para este valor la señal fluorescente máxima para ambos complejos y consiguiéndose un adecuado control del pH.

1.4. ESTABILIDAD, TEMPERATURA Y ORDEN DE ADICIÓN

En el estudio de los complejos Mo(VI)-RAS y W(VI)-RAS en medio micelar se observó que la formación de ambas especies fluorescentes es instantánea, mateniéndose constante el valor de la señal durante al menos 4 horas.

Aunque la temperatura no es un factor crítico en una amplio intervalo de valores en ambos casos, se decide termostatar el compartimento de cubetas a 25°C debido a la solidificación que presenta el tensioactivo a temperaturas inferiores a 15°C.

En cuanto al orden de adición de reactivos, tanto para el sistema Mo(VI)-RAS como para W(VI)-RAS, es indiferente, utilizándose en ambos casos y para posteriores experiencias el orden:

Analito + Rojo de Alizarina S + Tampón + BCTA

1.5. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE BCTA

Dado que en la optimización de la concentración de medio catiónico micelar para ambos complejos se observó que a relaciones p/v de tensiactivo catiónico superiores al 0'5 % la señal fluorescente era máxima y permanecía constante hasta valores muy superiores, una vez sobrepasada la c.m.c. (Capítulos III y IV), hemos seleccionado como concentración adecuada de BCTA, en el caso de coexistir ambas especies fluorescentes para ser determinadas conjuntamente, un

ligero exceso, de modo que para posteriores experiencias se trabajará al 1 % de dicho tensioactivo, asegurando así una completa interacción de las micelas con los complejos formados.

1.6. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE REACTIVO

El establecimiento de la concentración de RAS óptima para la total formación de ambos complejos a la concentración micelar seleccionada, se determinó de la siguiente forma:

En matraces de 10 ml se adicionan 0'1 ml de disoluciones de Mo(VI) o de W(VI) de 100 ppm, volúmenes crecientes de disolución de RAS 10^{-3} M, 2'0 ml de disolución tampón acético/acetato de pH 4'3 y 2'0 ml de disolución de BCTA al 5 %, enrasando finalmente con agua destilada. Las concentraciones finales de Molibdeno y Volframio expresadas en molaridad, son $1'0.10^{-5}$ y $5'5.10^{-6}$ M, respectivamente. Las rendijas utilizadas fueron de 5 nm y la fluorescencia se midió a las longitudes de onda de los máximos de ambos complejos.

Los resultados se recogen en la Tabla VIII.2 y las curvas obtenidas por diferencia entre las señales correspondientes al complejo y blanco para ambos analitos se representan en la Figura VIII.3.

De la representación gráfica se deducen las siguientes conclusiones:

1. Existe una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia de ambos complejos y la concentración de reactivo, llegando hasta un valor de $1'2.10^{-5}$ M para Mo(VI)-RAS y $0'8.10^{-5}$ M para W(VI)-RAS.

2. A partir de estos valores, se observa un tramo en el que la señal fluorescente se hace máxima, permaneciendo estable para el intervalo de

concentración aproximada de entre $1'4.10^{-5}$ - $3'0.10^{-5}$ M para Mo(VI) y entre $1'0.10^{-5}$ - $3'5.10^{-5}$ M para W(VI), disminuyendo levemente al sobrepasar estos valores.

3. El intervalo de relaciones molares en los cuales se asegura la total formación de ambos complejos, sin disminución de la fluorescencia, será de 1'4:1 - 3:1 (RAS:Mo) y de 1'8:1 - 6'4:1 (RAS:W). De este modo es posible seleccionar para ambos calibrados una cantidad adecuada de reactivo que asegure la total formación de los dos complejos.

Tabla VIII.2

Influencia de la concentración de RAS

[RAS].10^5	IF,Mo	IF,W	IFb
0'2	29'1	35'2	1'4
0'4	48'2	69'0	1'9
0'6	65'0	77'2	3'3
0'8	82'3	87'3	5'2
1'0	107'5	92'1	5'8
1'2	113'8	95'6	5'9
1'4	113'9	96'1	6'3
1'6	112'7	96'3	6'7
2'0	113'0	97'0	7'3
2'5	112'5	97'2	8'2
3'0	108'8	96'8	9'2
3'5	107'3	95'8	11'0
4'0	101'0	92'0	12'5

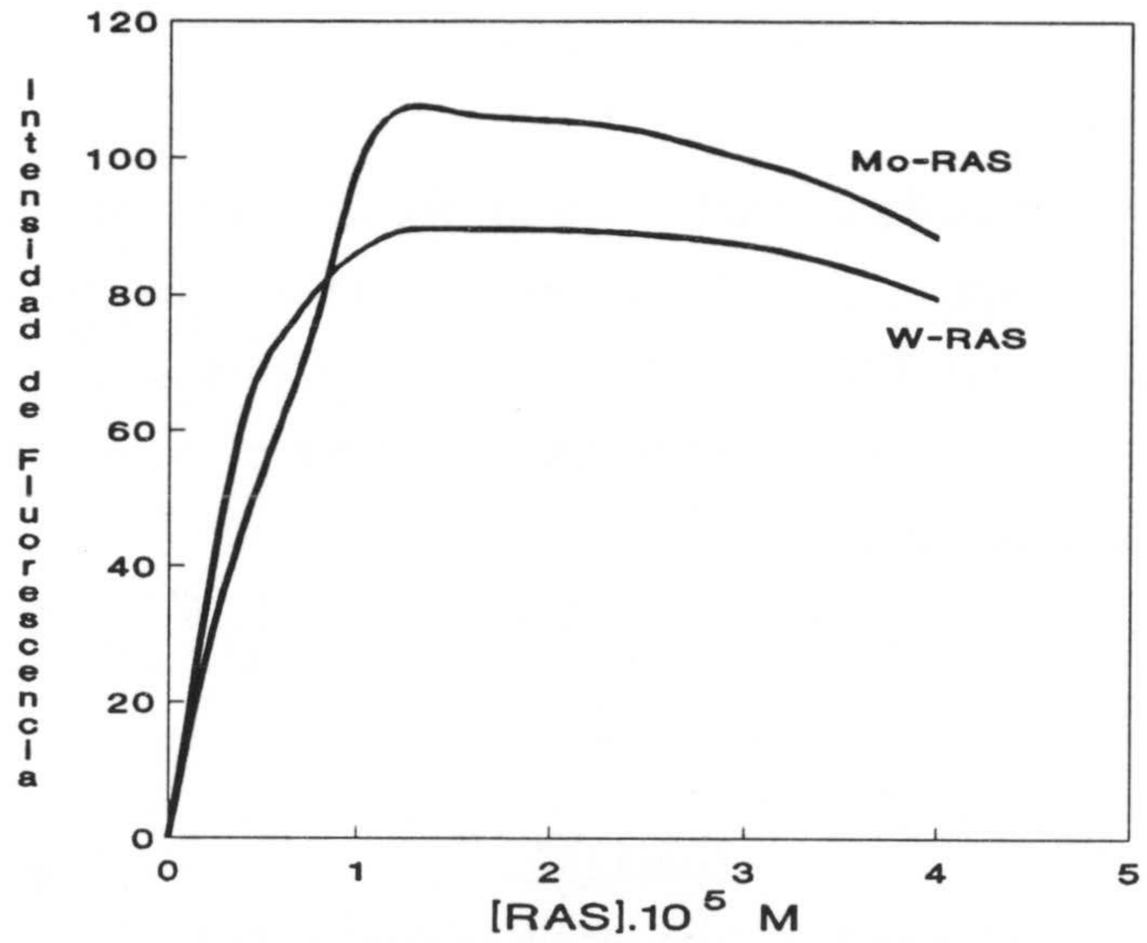


Figura VIII.3. Influencia de la concentración de RAS. [Mo(VI)] = [W(VI)] = 1'0 ppm, [BCTA] = 1'0 %. pH = 4'3

2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN SINCRÓNICA-DERIVADA

2.1. ELECCIÓN DE LA DIFERENCIA ENTRE LAS LONGITUDES DE ONDA DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN ($\Delta\lambda$)

Para su selección se prepararon una serie de matraces de 10 ml que contenían 1'0 ppm de Mo(VI) y 1'0 ppm de W(VI), así como una mezcla de ambos. A cada uno de ellos se adicionaron 2'0 ml de tampón fosfato de pH 4'3, 2'0 ml de BCTA al 5 % y RAS hasta obtener una concentración final de 3.10^{-5} M, asegurando así la total formación de ambos complejos. Las rendijas de ex/em utilizadas fueron de 5 nm.

El estudio se llevó a cabo registrando a 25°C, diferentes espectros sincrónicos, en los que se modifica el $\Delta\lambda$ entre 80 y 145 nm. El efecto de esta variación sobre la intensidad de fluorescencia y longitud de onda máxima del espectro sincrónico, asi como de su anchura de banda a la mitad para ambos complejos, se indica en la Tabla VIII.3 y se representa en la Figura VIII.4.

Tabla VIII.3

Influencia del $\Delta\lambda$

$\Delta\lambda$	IF,Mo	λ,Mo	IF,W	λ,W	$D\lambda^{1/2}$
80	102'0	519	82'2	510	69
85	107'0	520	86'0	506	70
90	110'3	516	93'2	502	71
95	119'0	512	95'2	498	72
100	126'4	508	100'1	495	73
105	132'0	506	111'6	491	74
110	160'7	503	128'5	485	75
120	158'0	495	138'5	479	78
127	158'1	489	143'4	477	78
130	157'6	488	156'2	475	81
135	156'8	480	159'7	470	82
140	151'6	478	159'5	470	85
145	149'6	478	156'5	467	86

En la Figura VIII.4(A) se observa una leve disminución del valor de longitud de onda del máximo del espectro sincrónico para ambos complejos a medida que aumenta el $\Delta\lambda$.

En la Figura VIII.4(B) se pone de manifiesto que, en el caso del complejo Mo(VI)-RAS, el espectro sincrónico muestra un valor máximo de señal fluorescente cuando es registrado utilizando un intervalo de $\Delta\lambda$ comprendido entre 110 nm y 135 nm.

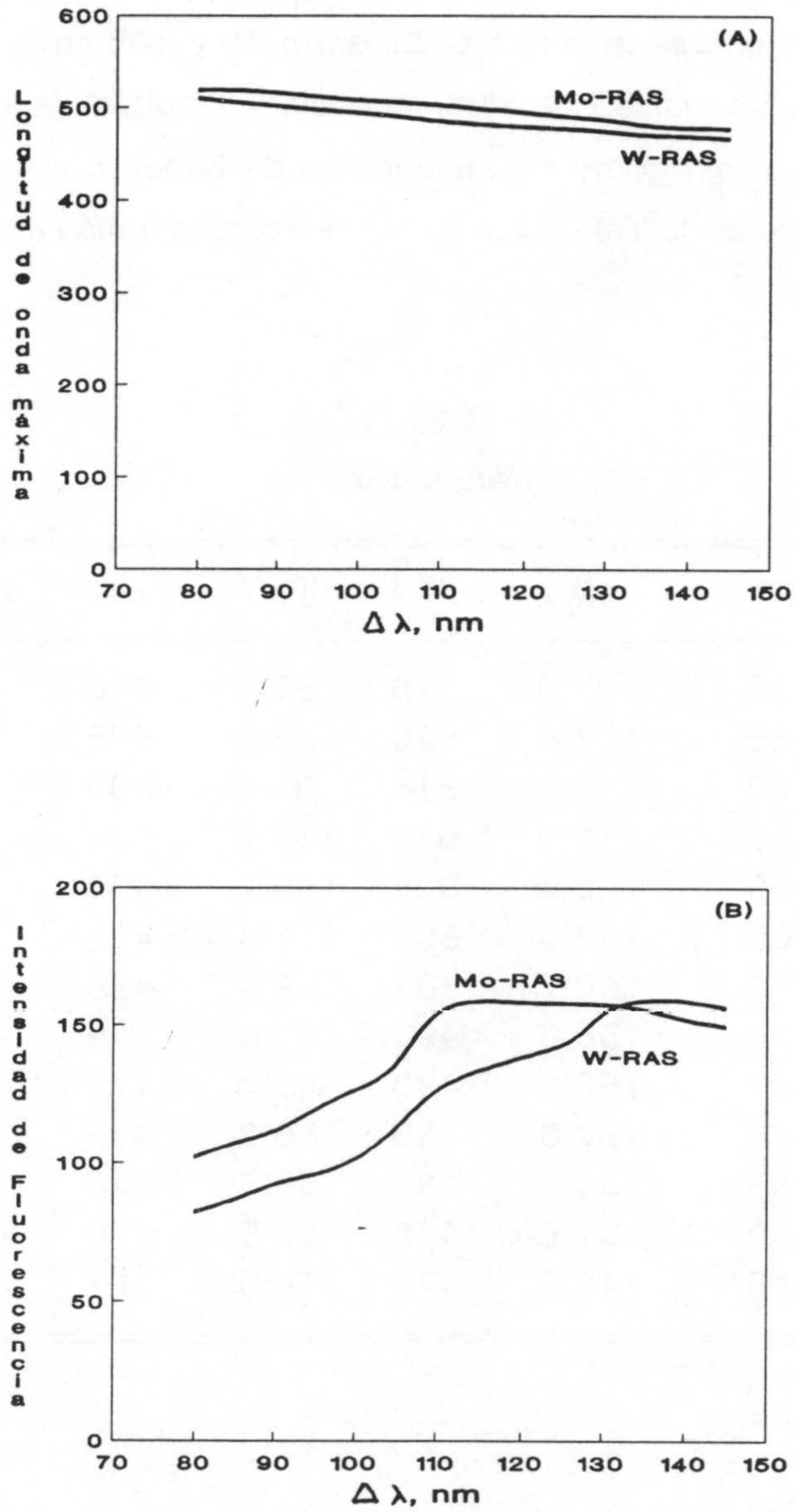
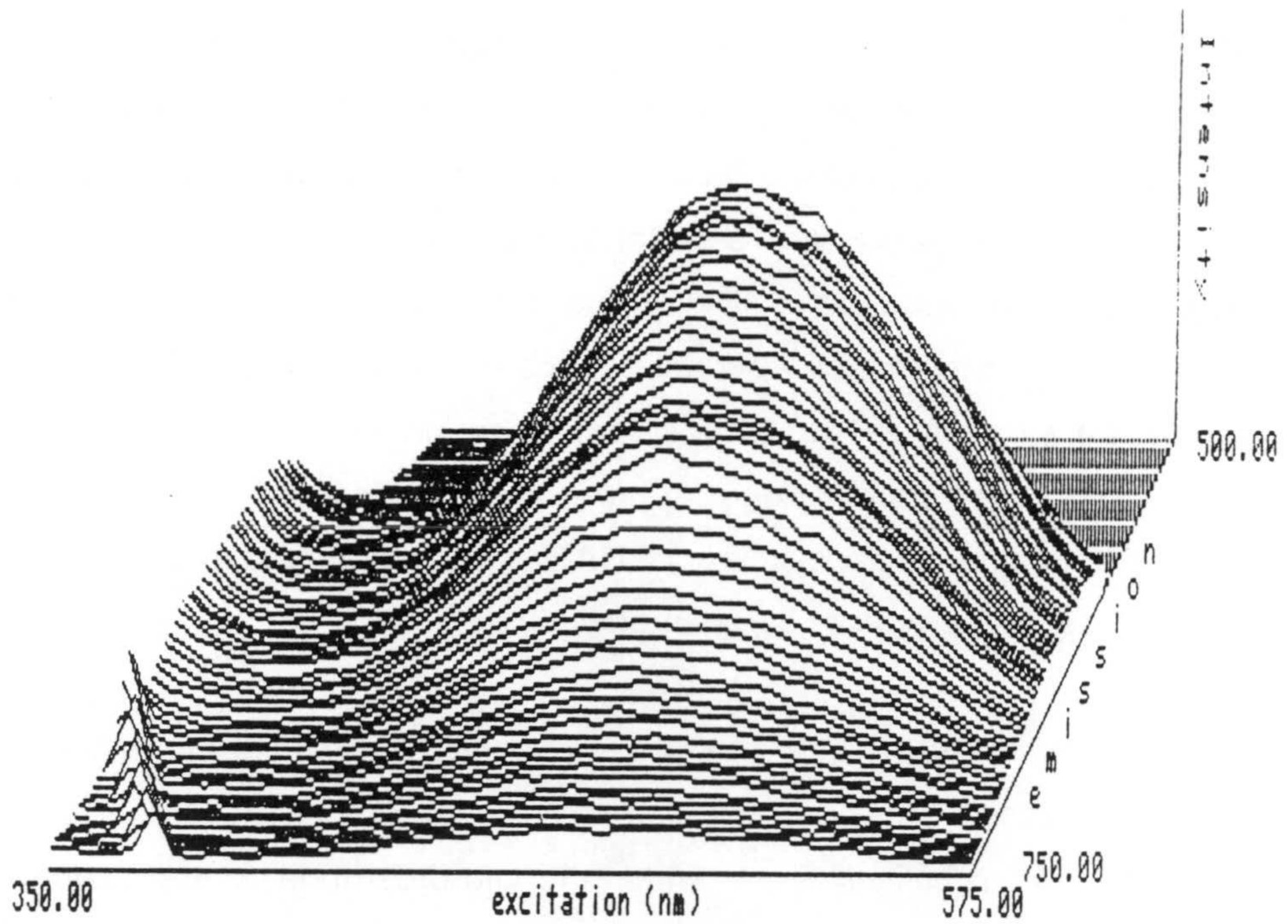


Figura VIII.4. Influencia del $\Delta\lambda$ sobre los espectros sincrónicos de los complejos Mo(VI)-RAS y W(VI)-RAS. (A) Efecto sobre la longitud de onda máxima; (B) Efecto sobre la intensidad de fluorescencia.

Para el complejo W(VI)-RAS, la intensidad de fluorescencia aumenta progresivamente permaneciendo constante en el intervalo comprendido entre 128-145 nm. Al registrar la anchura de banda a la mitad de los espectros sincrónicos obtenidos en la zona en la que la señal es máxima, se observó que mediante la utilización de un valor de $\Delta\lambda =$ 110 nm se consigue un espectro sincrónico más estrecho. Esto nos hace seleccionar como valor de $\Delta\lambda$ utilizado en la determinación simultánea de ambos iones, en un único barrido sincrónico el correspondiente a 110 nm ya que, aunque se produce una ligera disminución de la señal correspondiente al complejo W-RAS, se consigue una mejor resolución en la obtención de las derivadas del espectro sincrónico.

En la Figura VIII.5(A) se muestra el espectro tridimensional de la mezcla de ambos compuestos. Este fue obtenido registrando cuarenta y seis espectros de emisión entre 500 y 750 nm y variando la longitud de onda de excitación de 5 en 5 nm, desde 350 a 580 nm. En la Figura VIII.5(B) se ha transferido la matriz de datos tridimensional a dos dimensiones, observando el mapa de contornoS isoemisivos representados en el plano (λ_{ex} , λ_{em}).

En el gráfico de curvas de nivel, se ha trazado una linea a 45°, manteniendo constante una diferencia entre las longitudes de onda de 110 nm. Dicho barrido es considerado como óptimo ya que está muy próximo a los máximos de intensidad fluorescente de ambos complejos, aunque no se corresponde con la diferencia entre las longitudes de onda de excitación y de emisión máximas de los espectros convencionales, pero dado que practicamente no se pierde sensibilidad en la determinación y que además el espectro sincrónico obtenido da un pico más estrecho , es el valor que hemos seleccionado para llevar a cabo la determinación conjunta.



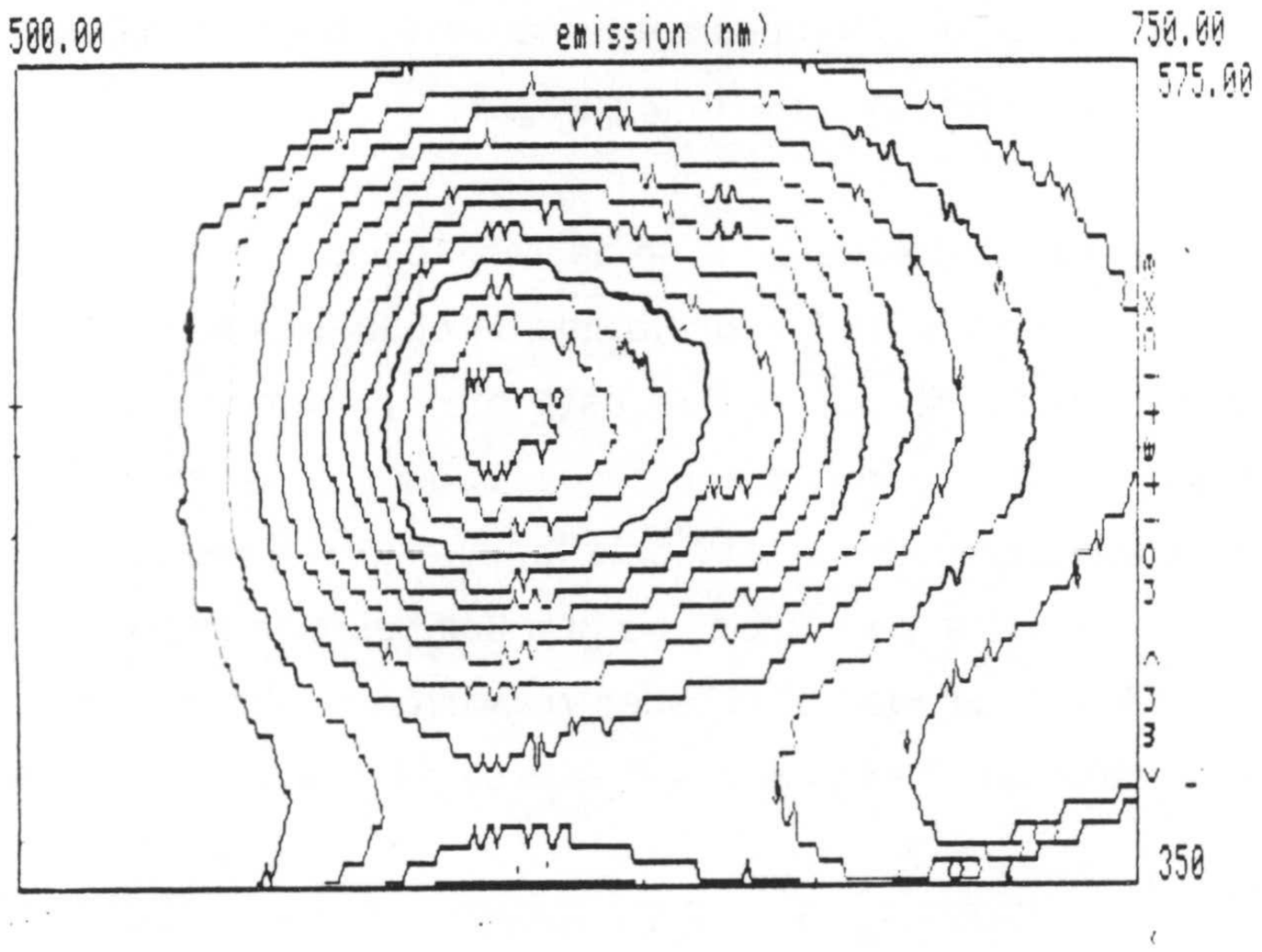


Figura VIII.5. (A) Representación tridimensional de la matriz de excitación-emisión de la mezcla Mo(VI)-RAS + W(VI)-RAS, [Mo(VI] = [W(VI)] = 1'0 ppm, [RAS] = 3.10^{-5} M; (B) Curvas de nivel del mismo

2.2. REGISTRO DE LOS ESPECTROS SINCRÓNICOS

Se llevó a cabo el registro de los espectros sincrónicos, manteniendo constante un $\Delta\lambda$ = 110 nm, para disoluciones que contenían 1'0 ppm de Mo(VI) ó 1'0 ppm de W(VI) y una mezcla de ambos, fijando el pH a 4'3 con 2'0 ml de tampón acetato 0'1 M y utilizando una concentración de reactivo de 3.10^{-5} M en medio micelar al 1'0 % en BCTA. La temperatura del sistema se mantuvo a 25 °C y se usaron rendijas de excitación y emisión de 5 nm.

En la Figura VIII.6 se pone de manifiesto el alto grado de solapamiento que presentan los espectros sincrónicos de ambos complejos obteniéndose un máximo a 500/610 nm para el complejo Mo(VI)-RAS y a 480/590 nm para el complejo W(VI)-RAS. No es posible resolver la mezcla mediante fluorimetría sincrónica y se utilizará, por tanto, la metodología de derivadas para una adecuada determinación simultánea en un único barrido.

Para eliminar el ruido que se produce en el proceso de derivación, se ha llevado a cabo el suavizado del espectro sincrónico obtenido, ensayándose los factores de filtrado permitidos con objeto de seleccionar aquel que produzca una mejor relación señal/ruido. Una vez registrados los espectros sincrónicos y su 1ª derivada, utilizando los factores s_0,s_1 s_2,s_3 s_4,s_5 y s_6, que se corresponden con el número de puntos utilizados en el ajuste del polinómio para determinar el mejor punto central (5,9,13,19,25,37 y 45, respectivamente), se seleccionó el correspondiente a 25 puntos, con el que se consigue una eliminación del ruido sin pérdida de sensibilidad.

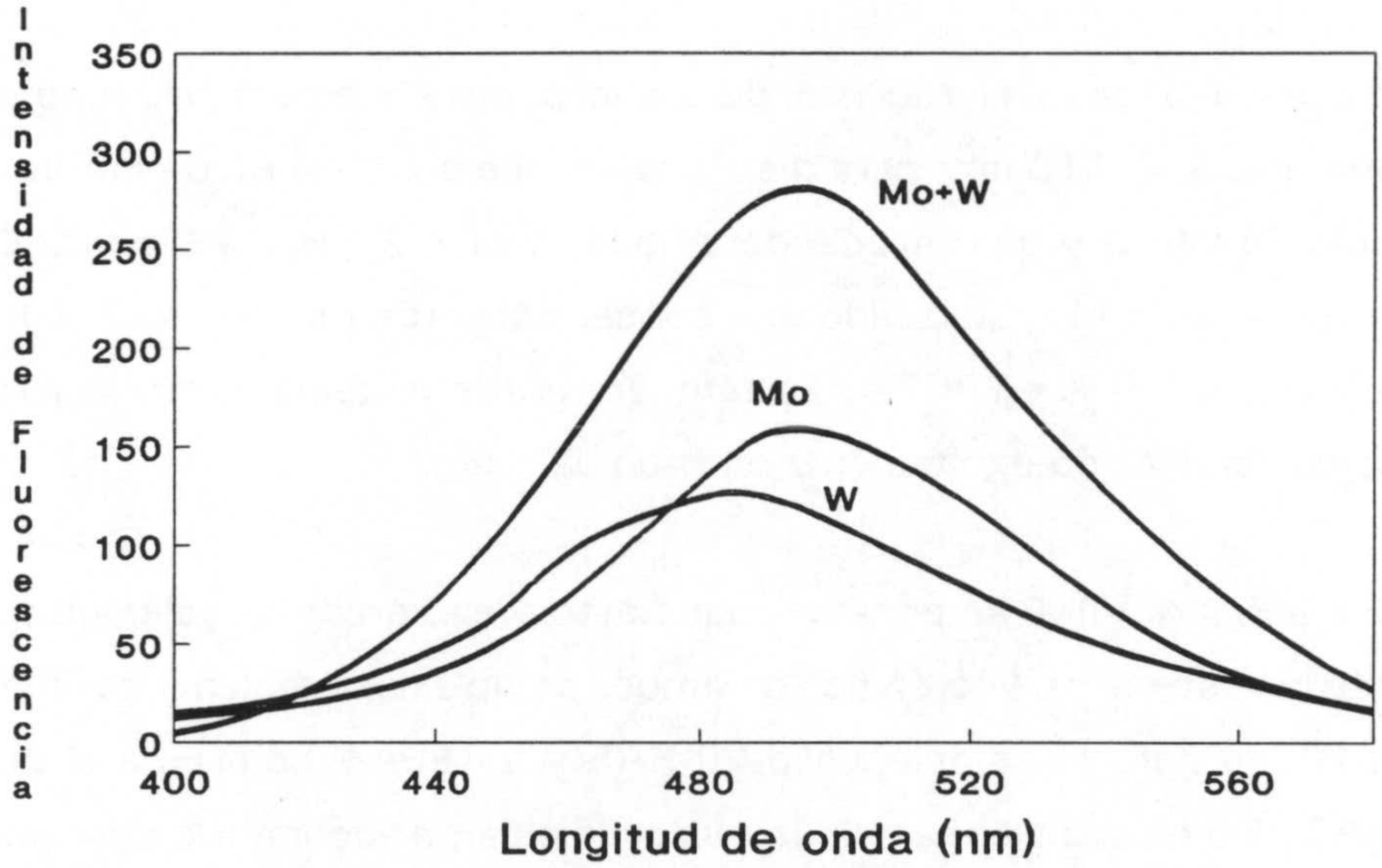


Figura VIII.6. Espectros sincrónicos de los complejos Mo(VI)-RAS, W(VI)-RAS y de una mezcla de ambos. $\Delta\lambda$ = 110 nm. [Mo(VI)] = [W(VI)] = 1'0 ppm, [RAS] = 3.10^{-5} M, [BCTA] = 1 %, pH = 4'3

2.3. SELECCIÓN DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO Y DEL TIEMPO DE RESPUESTA

Para seleccionar la velocidad de barrido óptima se registraron los espectros sincrónicos de dos muestras que contenían 1'0 ppm de Mo(VI) ó 1'0 ppm de W(VI), fijando el pH a 4'3 con tampón acético/acetato y utilizando una concentración de reactivo de 3.10^{-5} M, en presencia de un 1 % de BCTA. Las rendijas de excitación y emisión fueron de 5 nm.

Las velocidades de barrido utilizadas fueron: 60, 120, 240 y 480 nm/min, variando los tiempos de respuesta entre 0'5 y 4'0 s. Se seleccionó como óptima una combinación de 480 nm/min de velocidad de barrido y 0'5 s como tiempo de respuesta, obteniéndose, en este caso una señal máxima en el espectro sincrónico con ausencia de ruido y una primera derivada de este con una adecuada resolución.

2.4. SELECCIÓN DEL INCREMENTO DE LONGITUD DE ONDA UTILIZADO EN LA OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS SINCRÓNICO DERIVADOS.

Se procedió al registro de la primera derivada del espectro sincrónico ($\Delta\lambda$ = 110 nm) de una disolución que contenía 1'0 ppm de Mo(VI) y 1'0 ppm de W(VI) a pH 4'3, en presencia de una concentración de RAS de 3.10^{-5} M y en medio catiónico micelar al 1 %, en las condiciones operatorias óptimas. Las rendijas de excitación y emisión empleadas fueron de 5 nm.

Los resultados se muestran en la Figura VIII.7, en la que han sido representados algunos de los intervalos de longitudes de onda ensayados para la obtención de la primera derivada del espectro sincrónico.

Se ha seleccionado como intervalo de longitud de onda ($\Delta\lambda'$) conveniente para la obtención de la primera derivada del espectro sincrónico, el correspondiente a una anchura de 25 nm, ya que en este caso se consigue una adecuada dismunución del ruido sin excesiva pérdida de señal, lo que sí ocurre al aumentar este valor.

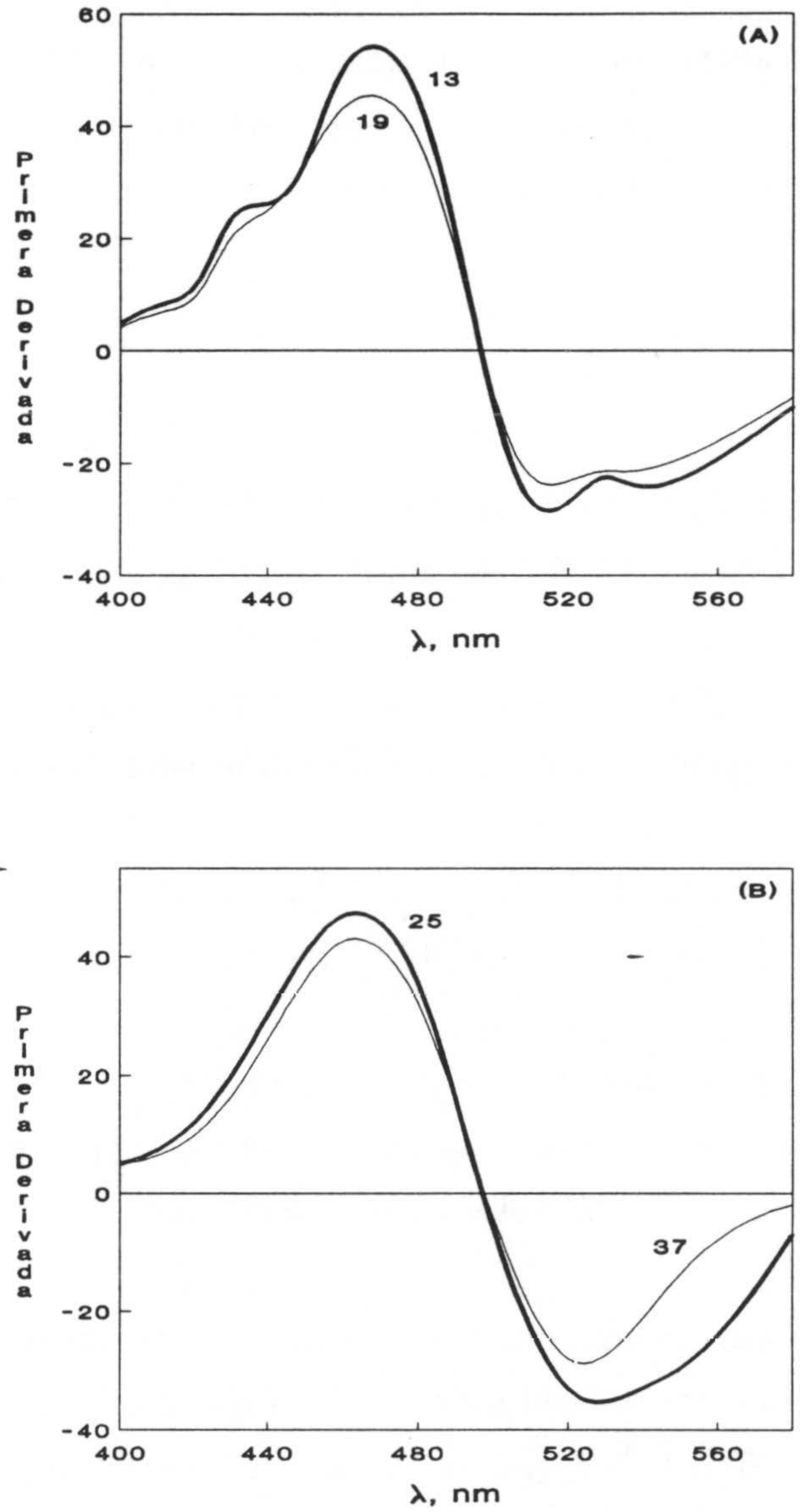


Figura VIII.7. Influencia del intervalo de longitudes de onda utilizado en la obtención de la primera derivada del espectro sincrónico: (A) 13 y 19 nm; (B) 25 y 37 nm. [Mo(VI)]= [W(VI)]= 1'0 ppm, [RAS]= 3.10^{-5} M, [BCTA]= 1 %, pH=4'3

2.5. SELECCIÓN DE LAS LONGITUDES DE ONDA ANALÍTICAS

Para seleccionar las longitudes de onda óptimas a las cuales es posible la resolución de la mezcla de complejos fluorescentes Mo(VI)-RAS y W(VI)-RAS mediante la primera derivada del espectro sincrónico, se utiliza la técnica de "medida en el punto de corte" o modelo isodiferencial. Para la obtención de las longitudes de onda de medida de Mo(VI) y W(VI) en una única muestra, se han registrado previamente las 1ª derivadas de los espectros sincrónicos correspondientes a ambos complejos, a las condiciones instrumentales óptimas, y posteriormente, la correspondiente a la mezcla de ambos, determinándose el valor de aquellas longitudes de onda en las que la señal es debida exclusivamente a la presencia de uno de los analitos, no produciendo el otro ninguna contribución en ella.

En la Figura VIII.8 se muestra la primera derivada de los espectros sincrónicos correspondientes a los complejos de Mo(VI) y W(VI) con RAS en medio micelar, así como a una mezcla de ambos, siendo las concentraciones finales utilizadas: [Mo(VI)] = [W(VI)] = 1'0 ppm, [RAS] = 3.10^{-5} M, [BCTA] = 1'0 % a pH 4'3.

Se han seleccionado como longitudes de onda de medida para la determinación conjunta, los siguientes valores:

Mo(VI)-RAS(h1): λ_{ex} /λ_{em} = 486/596 nm

W(VI)-RAS (h2): λ_{ex} /λ_{em} = 502/612 nm

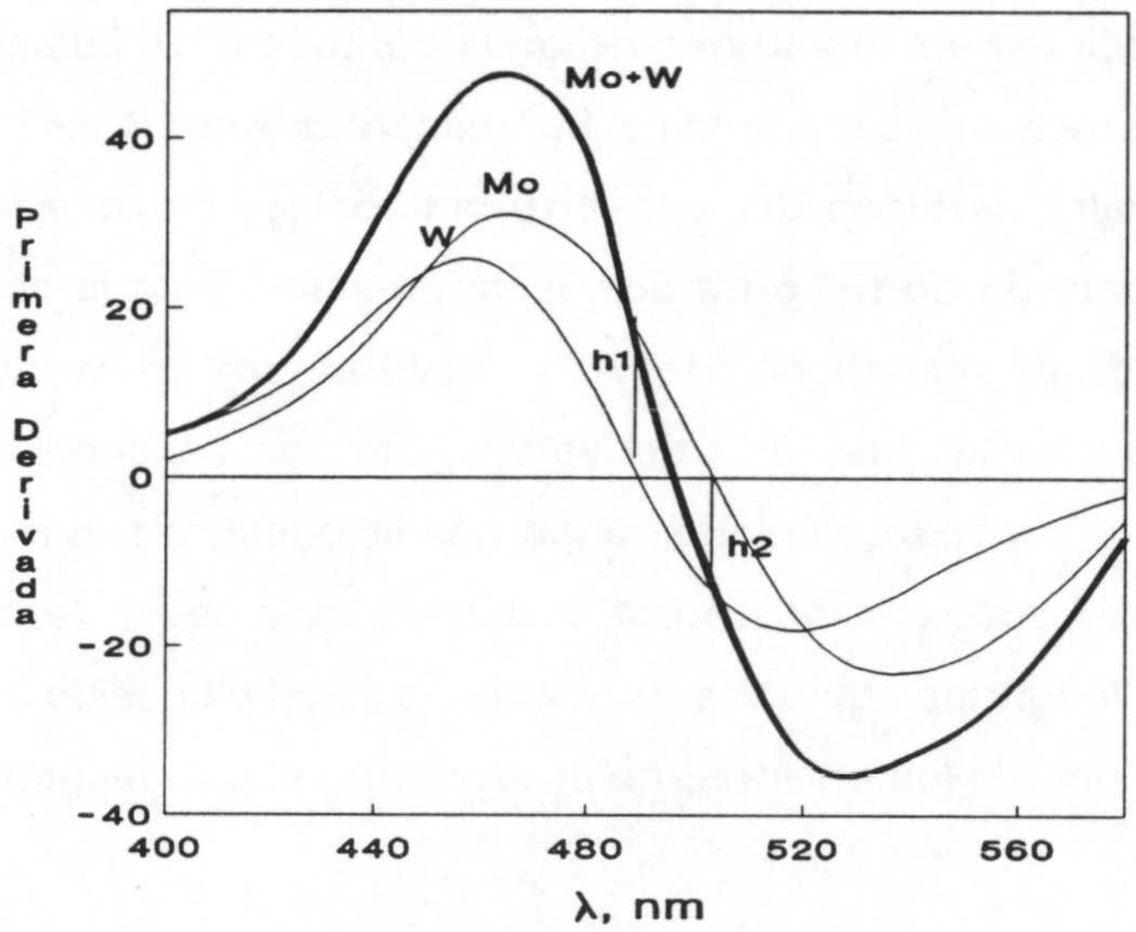


Figura VIII.8. Primera derivada de los espectros sincrónicos de los complejos Mo(VI)-RAS, W(VI)-RAS y de una mezcla de ambos a $\Delta\lambda$ = 110 nm. h1 = Señal analítica de Mo(VI)-RAS a λ = 486/596 nm y h2 = Señal analítica de W(VI)-RAS a λ = 502/612 nm

3. RESUMEN DE LA OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES PARA LA RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA

Los resultados de esta optimización de variables influyentes en el establecimiento de la determinación conjunta de Mo(VI) y W(VI), en presencia del tensioactivo BCTA mediante la 1ª derivada del espectro sincrónico, se relacionan en la Tabla VIII.4.

Tabla VIII.4

Optimización de variables para la determinación conjunta de Mo(VI) y W(VI)

Variable	Valor óptimo
pH	4'3
[Dis. reguladora]	Acético/Acetato 0'02 M, pH 4'3
Tª	25°C
Estabilidad	>5 h.
Orden de adición	No afecta
[BCTA]	1'0 %
v. barrido	480 nm/min
T. Respuesta	0'5 s
F. Filtrado	25
$\Delta\lambda$	110 nm
$\Delta\lambda'$	25 nm
Mo ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	
1ª D	486/596 nm
W ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	
1ª D	502/612 nm

4. ESTABLECIMIENTO DE LA DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA SIMULTÁNEA DE MOLIBDENO(VI) Y ∀OLFRAMIO(VI) EN MEDIO MICELAR

4.1. INTERVALO LINEAL. RECTAS DE CALIBRADO

Con objeto de proponer la determinación conjunta de ambos iones en presencia de micelas de BCTA, se han estudiado los rangos de aplicación en los que la señal analítica de la primera derivada del espectro sincrónico, depende exclusivamente de la presencia de las especies fluorescentes.

Rectas de calibrado de Molibdeno(VI)

Se preparan una serie de matraces de 10 ml en los que se introducen volúmenes crecientes de disolución de Mo(VI) de 10 ppm, comprendidos entre 0 y 5'0 ml y a los que posteriormente se adicionan: 0'5 ml de RAS 10^{-3} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetatode pH 4'3 y 2'0 ml de disolución de BCTA al 5%, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. Se preparó también un blanco en iguales condiciones experimentales.

Se registraron los espectros sincrónicos de cada muestra a 25°C siendo las condiciones instrumentales: $\Delta\lambda$ = 110 nm, rendijas de excitación y de emisión:5,5; velocidad de barrido 480 nm/min; tiempo de respuesta 0'5 s. Factor de filtrado 25 puntos. La primera derivada se obtuvo utilizando un incremento de longitudes de onda de 25 nm y las medidas se realizaron en el punto isodiferencial a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 486/596 nm.

Los datos obtenidos se reflejan en la Tabla VIII.5 y se representan en la Figura VIII.9, donde se observa una ligera curvatura a partir del valor de señal correspondiente a la concentración de 4'5 ppm.

Tabla VIII.5

Comprobación del intervalo lineal

[Mo(VI)], ppm	R
0'5	11'0
1'0	19'2
2'0	35'7
3'0	54'1
4'0	67'5
4'5	76'4
5'0	81'5

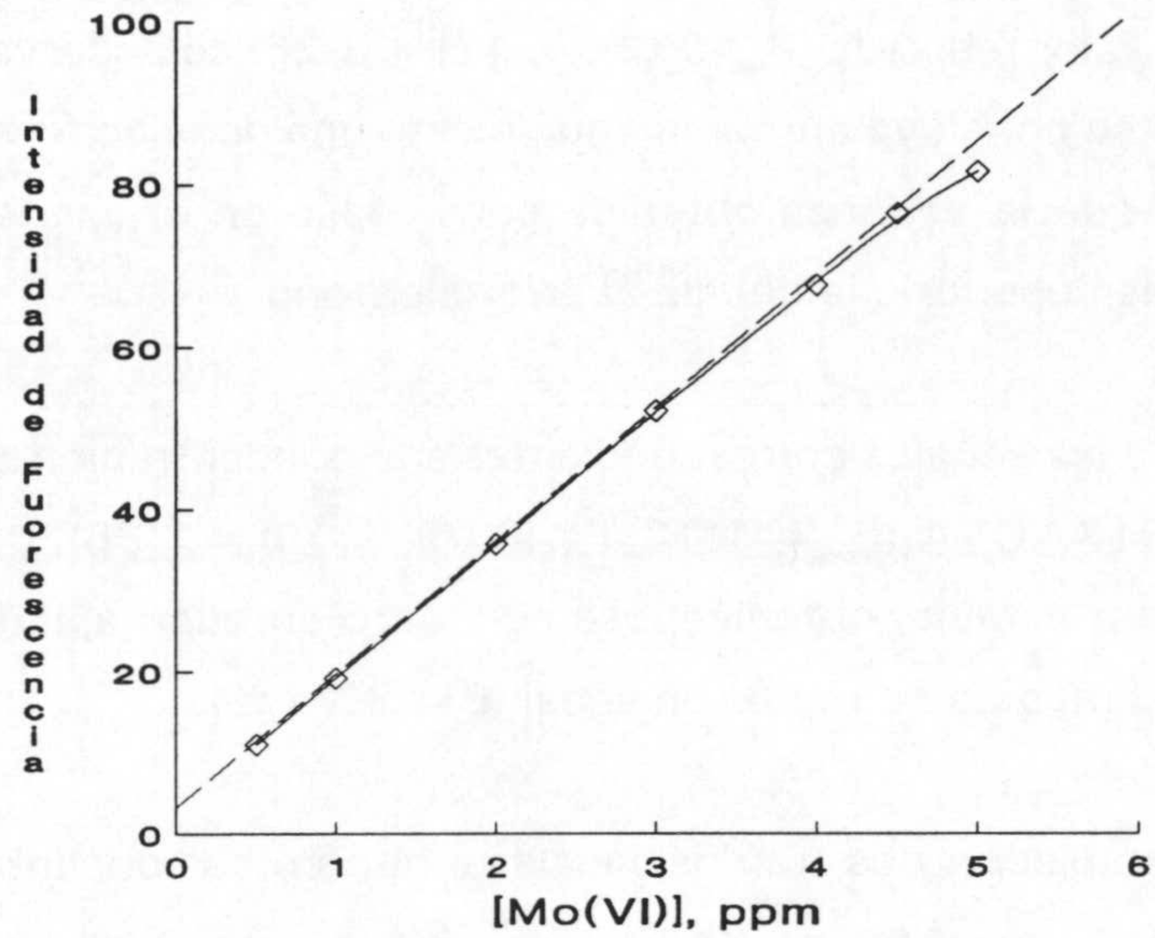


Figura VIII.9. Establecimiento del intervalo lineal. Determinación de Mo(VI) en 1ª derivada

Una vez descartado el último punto experimental, se aplicó el *Test del Fallo de Ajuste* para comprobar la existencia de una posible curvatura al introducir el punto experimental en el que se tiene duda de su pertenencia al tramo lineal. Para ello se realizan tres réplicas para cada valor de concentración que se muestran en la Tabla VIII.6.

Tabla VIII.6

Datos para la evaluación del intervalo lineal mediante el ANOVA

[Mo(VI)], ppm	IF		
0'5	11'0	11'2	11'5
1'0	19'2	18'6	20'0
2'0	35'7	36'2	37'4
3'0	54'1	52'8	52'6
4'0	67'5	68'9	69'6
4'5	74'4	75'1	74'0

El ANOVA aplicado arroja un valor del estadístico de F_{cal} = 6'8. Al comparar con el valor tabulado (F_{tab}(0'05, 4, 12) = 3'26) se observa que $F_{cal} > F_{tab}$ (P = 0'001 %) y se concluye afirmando que existe una desviación significativa de la linealidad, ya que la varianza obtenida por el fallo en el ajuste de los datos experimentales es superior a la debida al error aleatorio.

Eliminando las señales correspondientes a la concentración de 4'5 ppm, se vuelve a repetir el ANOVA (F_{cal} = 1'18, F_{tab}(0'05, 3,10) = 2'96), de modo que la conclusión del test cambia, obteniéndose por tanto un buen ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal (P = 36'5 %).

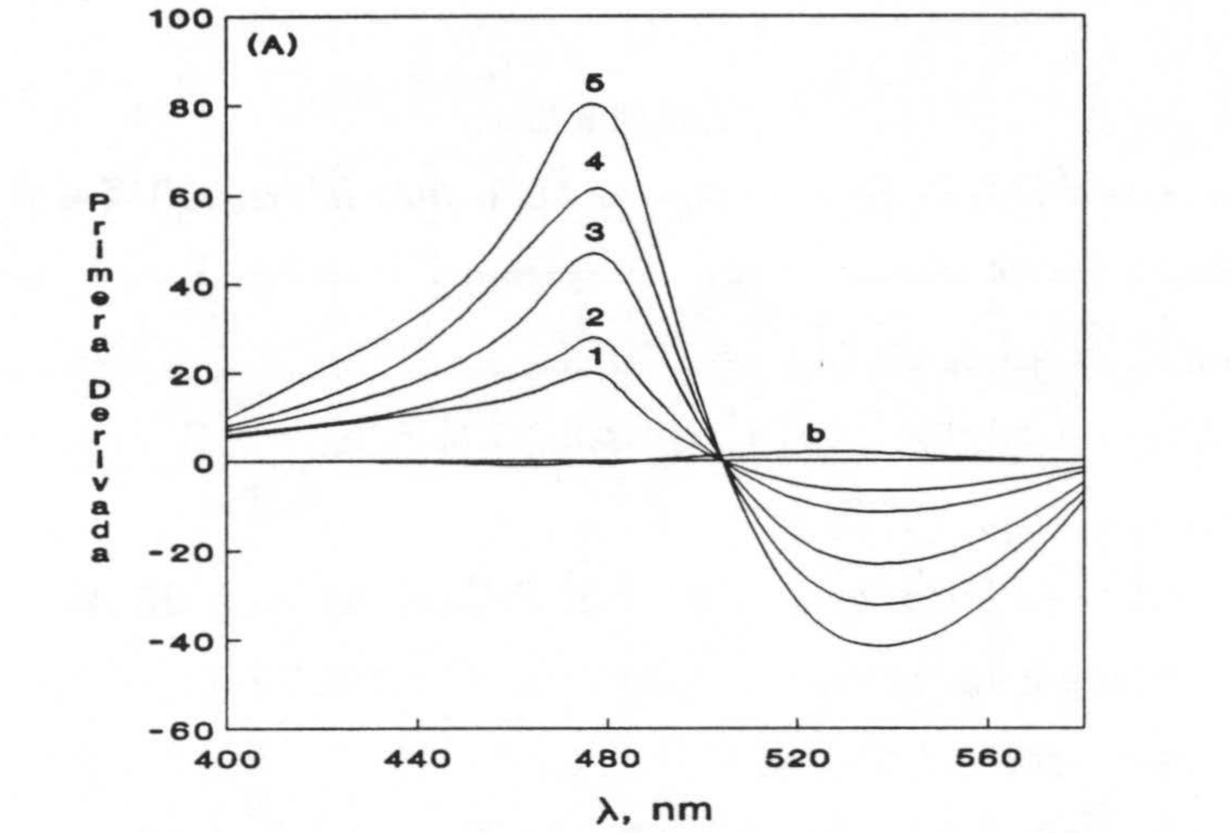
Se han establecido dos tramos lineales a diferentes concentraciones.

A) Rango entre 0'5 y 4'0 ppm

Se prepararon una serie de matraces de 10 ml que contenían: de 0'5 a 4'0 ml de disolución de Mo(VI) de 10 ppm, 0'5 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'3 y 2'0 ml de disolución de BCTA al 5%, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. De igual modo, se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Los espectros sincrónicos se realizaron a 25 °C, utilizando un $\Delta\lambda$ = 110 nm, obteniéndose la primera derivada y registrando la señal para Mo(VI) a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 486/596 nm.

Las señales correspondientes a las tres réplicas para cada valor de concentración se han mostrado en la Tabla VIII.6. Los datos experimentales se han representado en la Figura VIII.10, en la que se muestra la primera derivada de los espectros sincrónicos correspondientes a cada valor de concentración. Como se observa, el blanco no ejerce ninguna contribución a la señal en 1ª derivada.



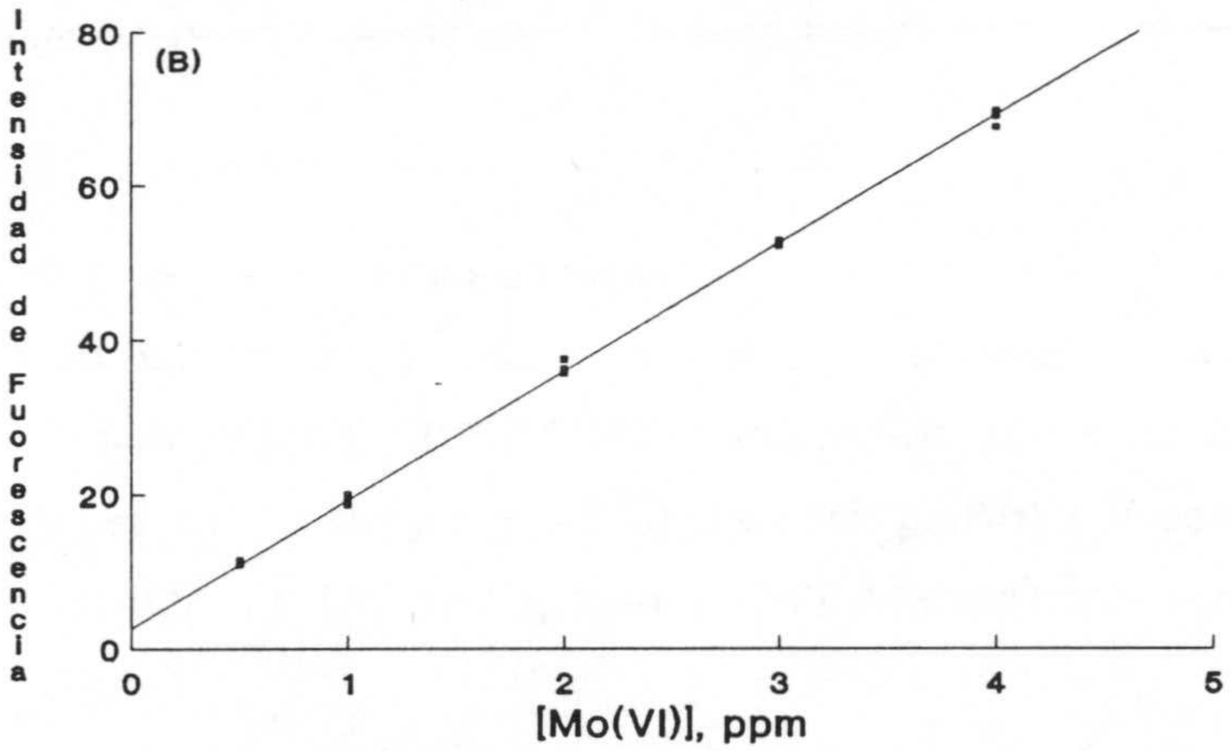


Figura VIII.10. Complejo Mo(VI)-RAS. Rango 0'5-4'0 ppm. (A) Primera derivada de los espectros sincrónicos: (b) Blanco, (1) 0'5, (2) 1'0, (3) 2'0, (4) 3'0, (5) 4'0 ppm . (B) Recta de calibrado

El ajuste de esta recta por mínimos cuadrados proporciona los valores que se reunen en la Tabla VIII.7.

Tabla VIII.7

Datos estadísticos de la recta de calibrado (Rango 0'5-4'0 ppm)

Ordenada en el origen (a) = 3'050
Desviación estándar (s_a) = 0'400 DER (a) = 13'1 %
Pendiente (b) = 16'53
Desviación estándar (s_b) = 0'163 DER (b) = 0'98 %
Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$) = 0'807
Coef. de correlación (r) = 0'9984
Coef. de determinación (r^2) = 99'87 %
g = $4'5.10^{-4}$
Fallo de Ajuste (P= 36'5 %)

Para comprobar que existe independencia entre las señales de ambos analitos en primera derivada, se han establecido tres rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de Mo(VI) en presencia de diferentes concentraciones de W(VI) iguales a 0'5, 1'0 y 3'0 ppm. Las señales obtenidas en el punto isodiferencial para Mo(VI) se recogen en la Tabla VIII.8.

El ajuste de las rectas por mínimos cuadrados nos proporciona los valores de pendiente y ordenada en el origen que se recogen en la Tabla VIII.9, en donde se observa que estos valores están incluidos en el intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen, correspondientes a la recta de calibrado establecida en ausencia de W(VI).

Tabla VIII.8

Rectas de calibrado de Mo(VI) en 1ª Derivada en presencia de W(VI)

[Mo(VI)], ppm	R(1)	R(2)	R(3)
0'5	11'1	11'7	11'9
1'0	19'3	20'0	19'8
2'0	37'9	36'0	38'1
3'0	53'7	51'9	51'6
4'0	69'2	68'5	70'4

R(1) = Señales en presencia de 0'5 ppm de W(VI); R(2) = Señales en presencia de 1'0 ppm de W(VI); R(2) = Señales en presencia de 3'0 ppm de W(VI)

Tabla VIII.9

Ajuste de las rectas de calibrado de Mo(VI) en 1ª derivada en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de W(VI)

Concentraciones		Pendiente	Ord. origen	r^2%
[Mo], ppm	[W],ppm			
0'5-4'0	0'0	16'5 ± 0'4	3'1 ± 0'9	99'9
	0'5	16'7	3'1	99'8
	1'0	16'2	3'7	99'9
	3'0	16'5	3'6	99'8

B) ***Rango entre 50 y 250 ppb***

Se preparó una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron: de 0'5 a 2'5 ml de disolución de Mo(VI) de 1 ppm, 0'3 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'3 y 2'0 ml de BCTA al 5 %, completando hasta el volumen final con agua destilada. Se realizaron tres réplicas para cada valor de concentración, así como del correspondiente blanco.

Los espectros sincrónicos fueron realizados termostatando el compartimento de cubetas a 25°C, a las condiciones instrumentales óptimas, pero utilizando rendijas de excitación y de emisión de 10 nm. Las señales correspondientes a la primera derivada para el complejo Mo(VI)-RAS a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 486/596 nm, se expresan en la Tabla VIII.10 y se representan en la Figura VIII.11.

Tabla VIII.10

Recta de calibrado de Mo(VI) en 1ª Derivada (Rango 50-250 ppb)

[Mo(VI)], ppb	IF		
50	2'1	1'8	2'0
100	6'0	6'2	5'9
150	10'8	10'7	11'0
200	14'9	14'2	15'1
250	19'4	19'2	19'3

El ajuste de la recta por mínimos cuadrados proporciona la información que se recoge en la Tabla VIII.11.

Tabla VIII.11

Datos estadísticos de la recta de calibrado (Rango 50-250 ppb)

Ordenada en el origen (a) = -2'437

Desviación estándar (s_a) = 0'1720 DER (a) = 7'06 %

Pendiente (b) = 0'087

Desviación estándar (s_b) = 0'0010 DER (b) = 1'20 %

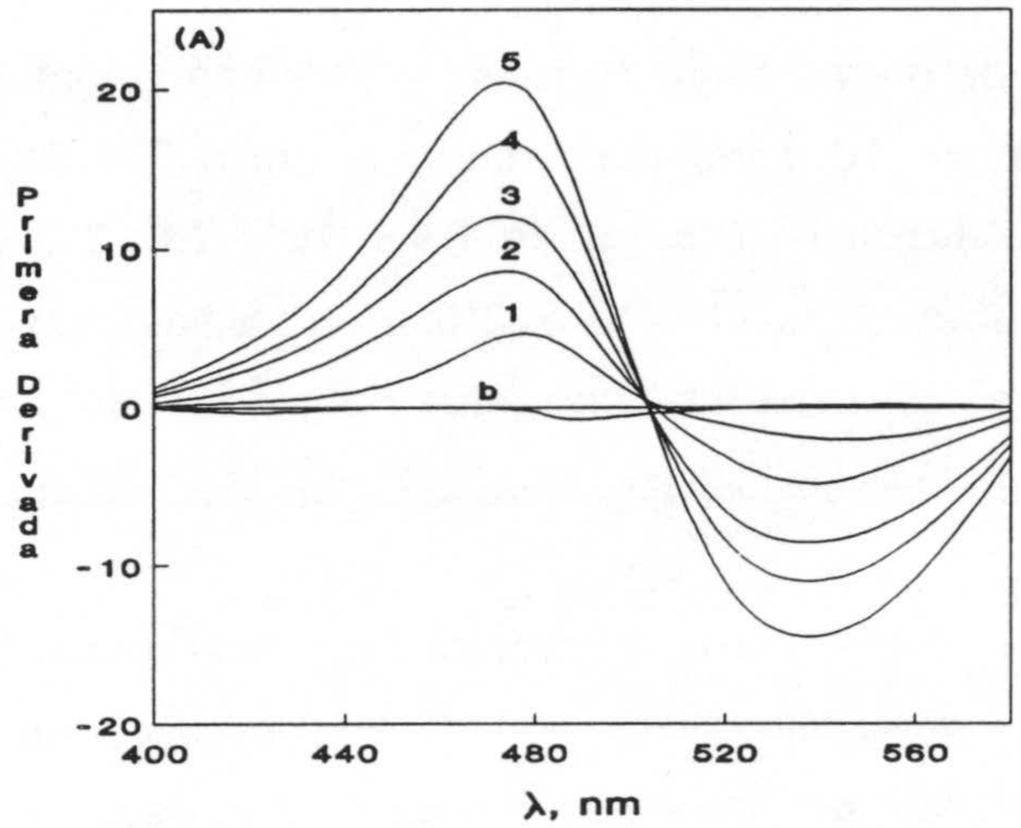
Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$) = 0'284

Coef. de correlación (r) = 0'9991

Coef. de determinación (r^2) = 99'81 %

g = $6'7.10^{-4}$

Fallo de Ajuste (P= 12'6 %)



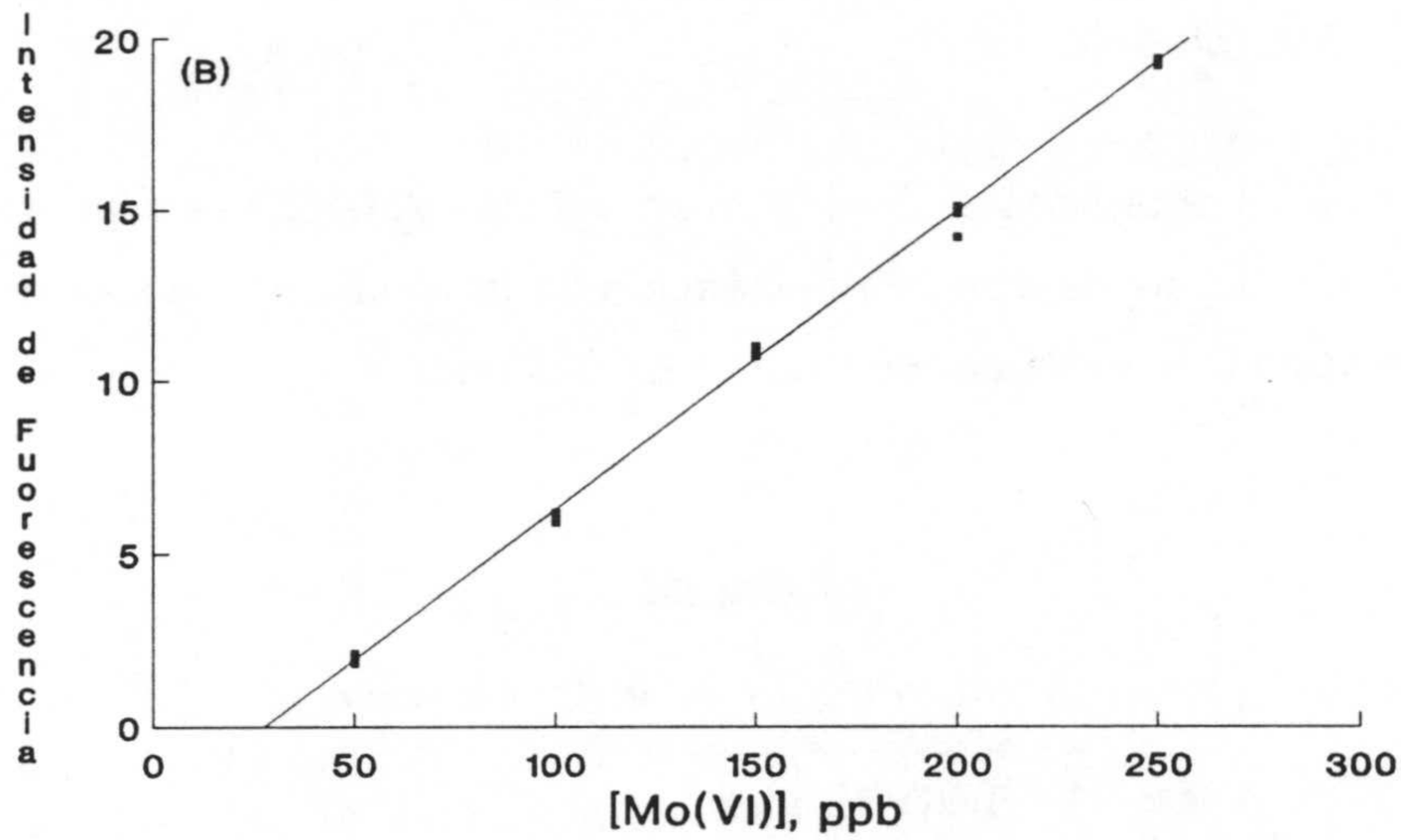


Figura VIII.11. Complejo Mo(VI)-RAS. Rango (50-250 ppb). (A) Primera derivada de los espectros sincrónicos: (b) Blanco, (1) 50, (2) 100, (3) 150, (4) 200, (5) 250 ppb. (B) Recta de calibrado

Rectas de calibrado de Volframio(VI)

En una serie de matraces de 10 ml se introducen volúmenes crecientes de disolución de W(VI) de 10 ppm, comprendidos entre 0 y 3'5 ml y a los que posteriormente se adicionan: 0'5 ml de RAS 10^{-3} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'3 y 2'0 ml de disolución de BCTA al 5%, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. Se preparó también un blanco en iguales condiciones experimentales.

Se registraron los espectros sincrónicos de cada muestra a 25°C, siendo las condiciones instrumentales: $\Delta\lambda$ = 110 nm, rendijas de excitación y de emisión:5,5; velocidad de barrido 480 nm/min; tiempo de rspuesta 0'5 s. Factor de filtrado 25 puntos. La primera derivada se obtuvo utilizando un intervalo de longitudes de onda de 25 nm y las medidas se realizaron en el punto isodiferencial a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 502/612 nm.

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla VIII.12 y se representan en la Figura VIII.12, donde se observa desviación de la linealidad a partir del valor de señal correspondiente a la concentración de 3'5 ppm.

Tabla VIII.12

Comprobación del intervalo lineal

[W(VI)], ppm	R
0'0	2'2
0'5	6'3
1'0	9'6
1'5	13'7
2'0	17'7
2'5	22'0
3'0	24'9
3'5	27'7

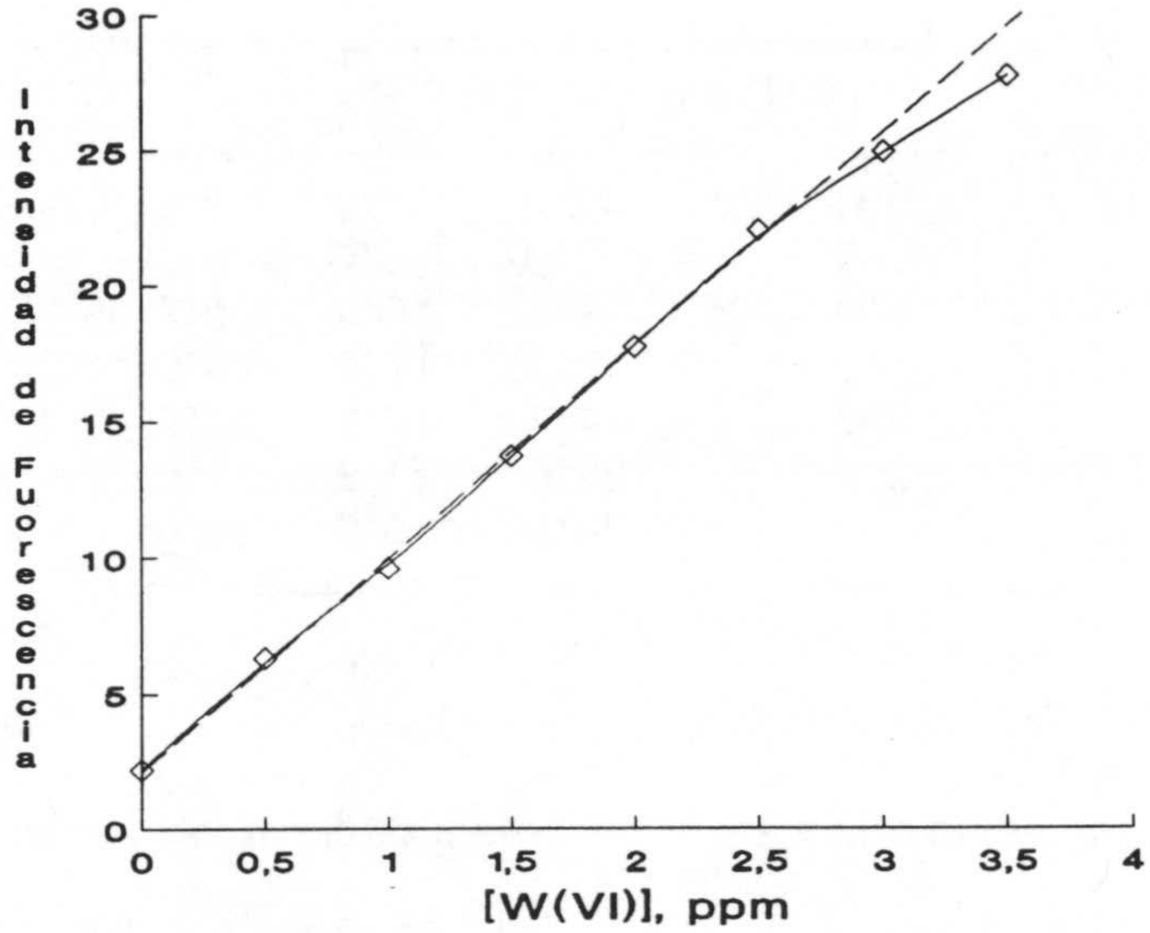


Figura VIII.12. Establecimiento del intervalo lineal. Determinación de W(VI) en 1ª derivada

Aplicando el *Test del Fallo de Ajuste* a las señales correspondientes a tres réplicas para cada valor de concentración, que se muestran en la Tabla VIII.13, se obtiene un valor de $F_{cal} = 34'2$. Al comparar con el valor tabulado ($F_{tab}(0'05, 5, 14) = 2'74$) se observa que $F_{cal} > F_{tab}$ ($P = 0'000$ %) y por lo tanto existe una desviación significativa de la linealidad, debiendo por tanto repetir el ANOVA al descartar el último punto considerado en el cálculo.

Eliminando las señales correspondientes a la concentración de 3'0 ppm se repite el ANOVA de modo que $F_{cal} < F_{tab}$ ($F_{cal} = 0'98$, $F_{tab}(0'05, 4,12) = 3'26$) y la conclusión del test cambia, obteniéndose por tanto un buen ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal ($P = 45'4$ %).

Tabla VIII.13

Datos para la evaluación del intervalo lineal mediante el ANOVA

[W(VI)], ppm	R		
0'0	2'2	1'7	2'5
0'5	6'3	6'0	5'9
1'0	9'6	10'2	9'9
1'5	13'7	13'8	14'0
2'0	17'7	17'1	17'5
2'5	22'0	21'8	21'5
3'0	24'9	25'0	24'6

Se han establecido dos tramos lineales a diferentes concentraciones.

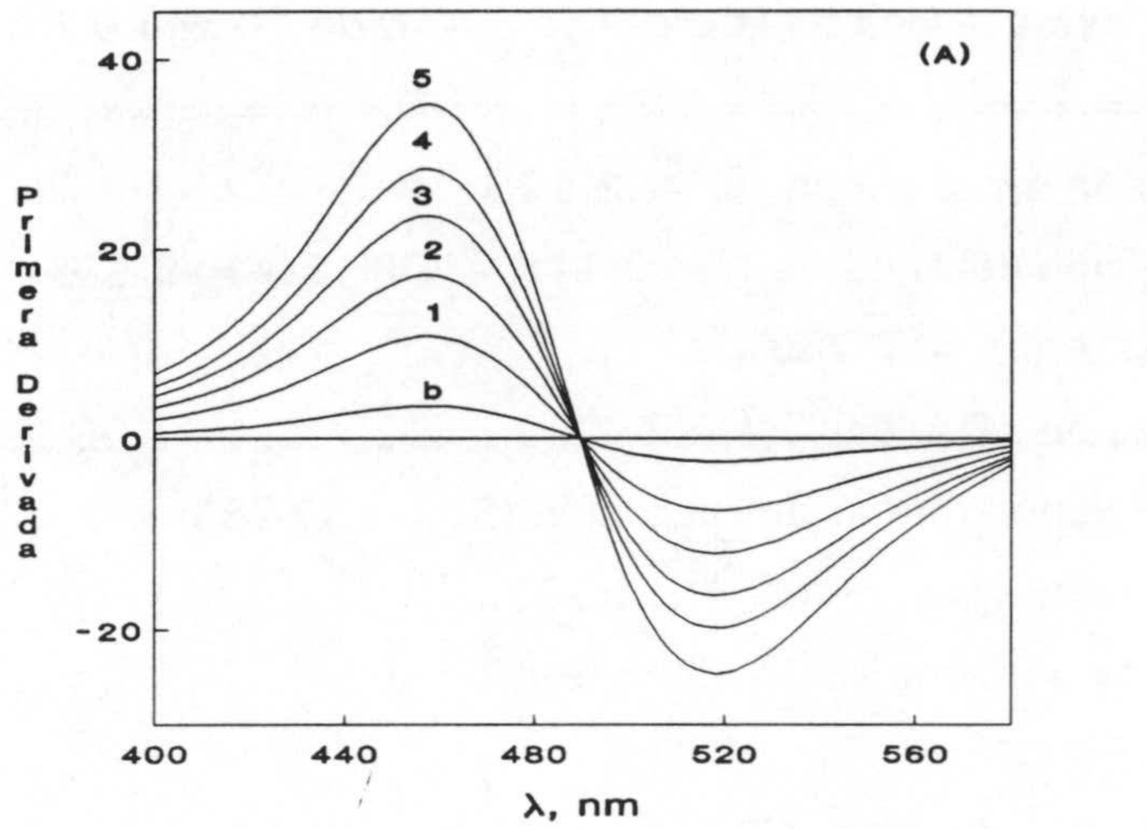
A) Rango entre 0'5 y 2'5 ppm

Se prepararon una serie de matraces de 10 ml que contenían: de 0'5 a 2'5 ml de disolución de W(VI) de 10 ppm, 0'5 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'3 y 2'0 ml de disolución de BCTA al 5%, enrasándose hasta el volumen final con agua destilada. De igual modo se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Los espectros sincrónicos se realizaron a 25°C utilizando un $\Delta\lambda$ = 110 nm, con rendojas ex/em de 5 nm, obteniéndose la primera derivada y registrando la señal para W(VI) a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 502/612 nm.

Las señales correspondientes a las tres réplicas para cada valor de concentración han mostrado en la Tabla VIII.13 y se representan en la Figura VIII.13.

El ajuste de esta recta por mínimos cuadrados proporciona los datos relacionados en la Tabla VIII.14.



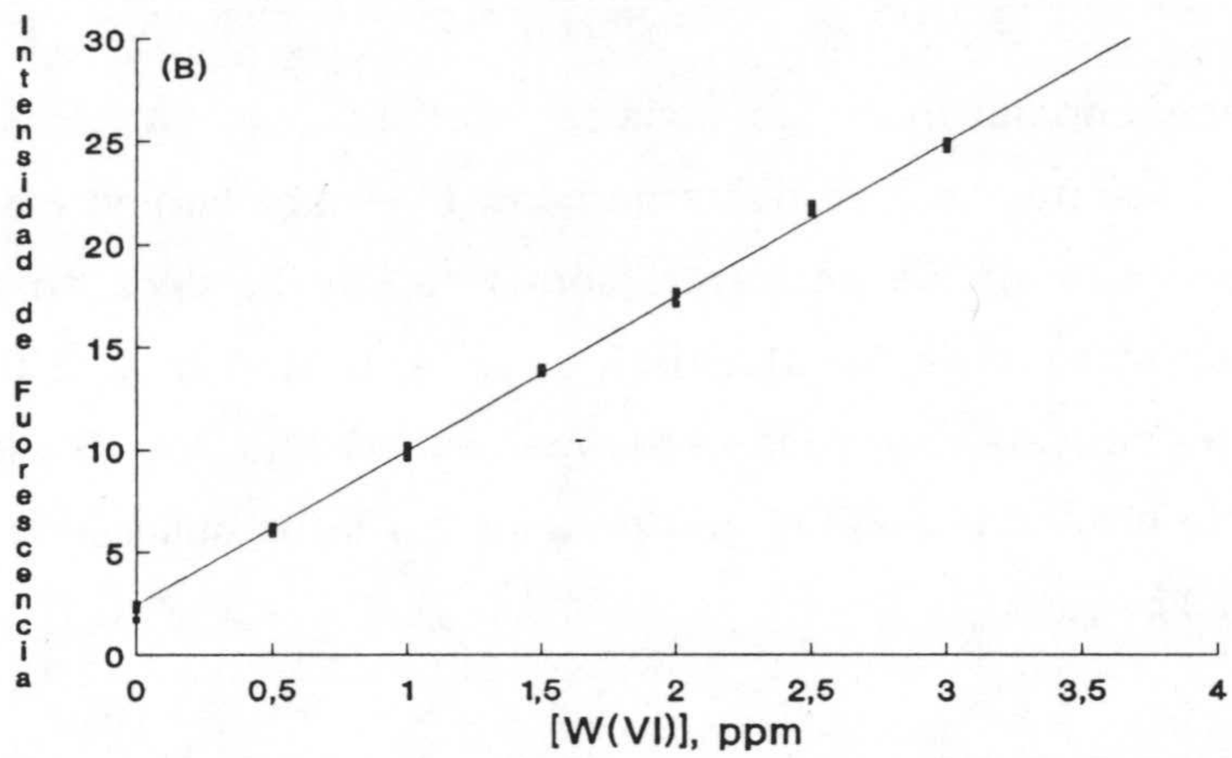


Figura VIII.13. Complejo W(VI)-RAS. Rango 0'5-2'5 ppm. (A) Primera derivada de los espectros sincrónicos: (b) blanco, (1) 0'5, (2) 1'0, (3) 1'5, (4) 2'0, (5) 2'5 ppm. (B) Recta de calibrado

Tabla VIII.14

Datos estadísticos de la recta de calibrado (Rango 0'5-2'5 ppm)

Ordenada en el origen (a) = 2'126

Desviación estándar (s_a) = 0'118 DER (a) = 5'5 %

Pendiente (b) = 7'783

Desviación estándar (s_b) = 0'078 DER (b) = 1'00 %

Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$) = 0'281

Coef. de correlación (r) = 0'9992

Coef. de determinación (r^2) = 99'84 %

g = $4'5.10^{-4}$

Fallo de Ajuste (P= 45'3 %)

La independencia entre las señales analíticas en 1ª derivada para los complejos fluorescentes se manifiestamediante el establecimiento de tres rectas de calibrado en el rango de concentraciones de W(VI), pero en presencia de diferentes concentraciones de Mo(VI) iguales a 0'5, 1'0 y 2'0 ppm. Las correspondientes señales obtenidas se recogen en la Tabla VIII.15 y los valores de la pendiente y la ordenada en el origen para los distintos calibrados se muestran en la Tabla VIII.16.

Se observa que los valores que toman la ordenada en el origen y la pendiente correspondientes a los calibrados para W(VI), obtenidos en 1ª derivada, en presencia de Mo(VI), se incluyen en los intervalos de confianza que presentan estos parámetros para el calibrado correspondiente al complejo W(VI)-RAS aislado, destacando así la independencia entre ambas señales analíticas obtenidas a partir de un mismo espectro sincrónico.

Tabla VIII.15

Rectas de calibrado de W(VI) en 1ª Derivada en presencia de Mo(VI)

[W(VI)], ppm	R(1)	R(2)	R(3)
0'0	2'6	2'2	2'4
0'5	6'2	6'1	6'4
1'0	9'8	10'0	10'2
1'5	13'5	13'7	14'2
2'0	17'6	17'3	18'0
2'5	21'9	21'7	22'2

R(1) = Señales en presencia de 0'5 ppm de Mo(VI); R(2) = Señales en presencia de 1'0 ppm de Mo(VI); R(2) = Señales en presencia de 2'0 ppm de Mo(VI)

Tabla VIII.16

Ajuste de las rectas de calibrado de W(VI) en 1ª derivada en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de Mo(VI)

Concentraciones		Pendiente	Ord. origen	r^2%
[W], ppm	[Mo],ppm			
0'5-2'5	0'0	7'8 ± 0'2	2'1 ± 0'3	99'8
	0'5	7'7	2'3	99'8
	1'0	7'7	2'2	99'9
	2'0	7'9	2'4	99'9

B) ***Rango entre 70 y 300 ppb***

Se preparó una serie de matraces de 10 ml en los que se introdujeron: de 0'7 a 3'0 ml de disolución de W(VI) de 1 ppm, 0'3 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'3 y 2'0 ml de BCTA al 5 %, completando hasta el volumen final con agua destilada. Se realizaron tres réplicas para cada valor de concentración, incluido el blanco, utilizando en este caso las condiciones instrumentales óptimas y rendijas de excitación y de emisión de 10 nm.

Las señales correspondientes a la primera derivada para el complejo W(VI)-RAS $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 502/612 nm se expresan en la Tabla VIII.17 y se representan en la Figura VIII.14.

Tabla VIII.17

Recta de calibrado de W(VI) en 1ª Derivada

[W(VI)], ppb	R		
0	4'8	4'8	4'9
70	8'0	8'2	8'2
100	9'3	9'4	9'7
150	12'5	12'6	11'8
200	14'9	13'9	14'0
250	17'1	16'5	16'3
300	18'7	18'9	18'1

El ajuste de la recta por mínimos cuadrados proporciona la información que se recoge en la Tabla VIII.18.

Tabla VIII.18

Datos estadísticos de la recta de calibrado (Rango 70-300 ppb)

Ordenada en el origen (a) = 4'950

Desviación estándar (s_a) = 0'1517 DER (a) = 3'06 %

Pendiente (b) = 0'046

Desviación estándar (s_b) = 0'0008 DER (b) = 1'81 %

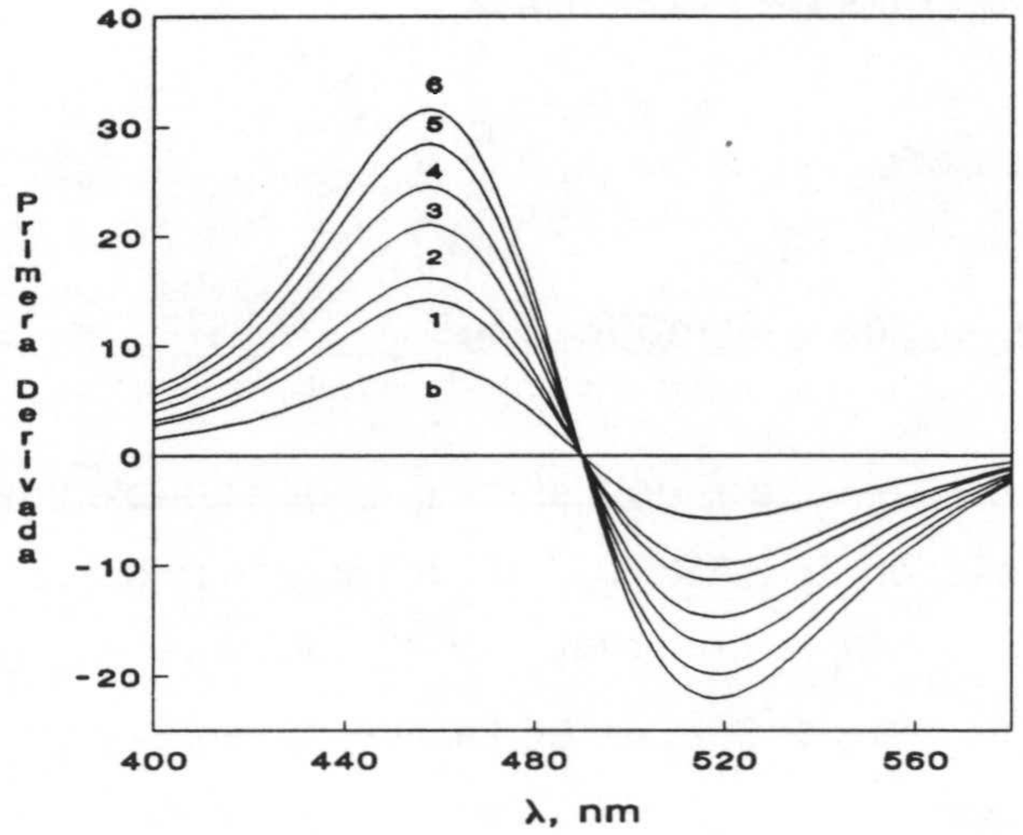
Desviación estándar de regresión ($S_{R,c}$) = 0'373

Coef. de correlación (r) = 0'9969

Coef. de determinación (r^2) = 99'38 %

g = $1'4.10^{-3}$

Fallo de Ajuste (P= 31'0 %)



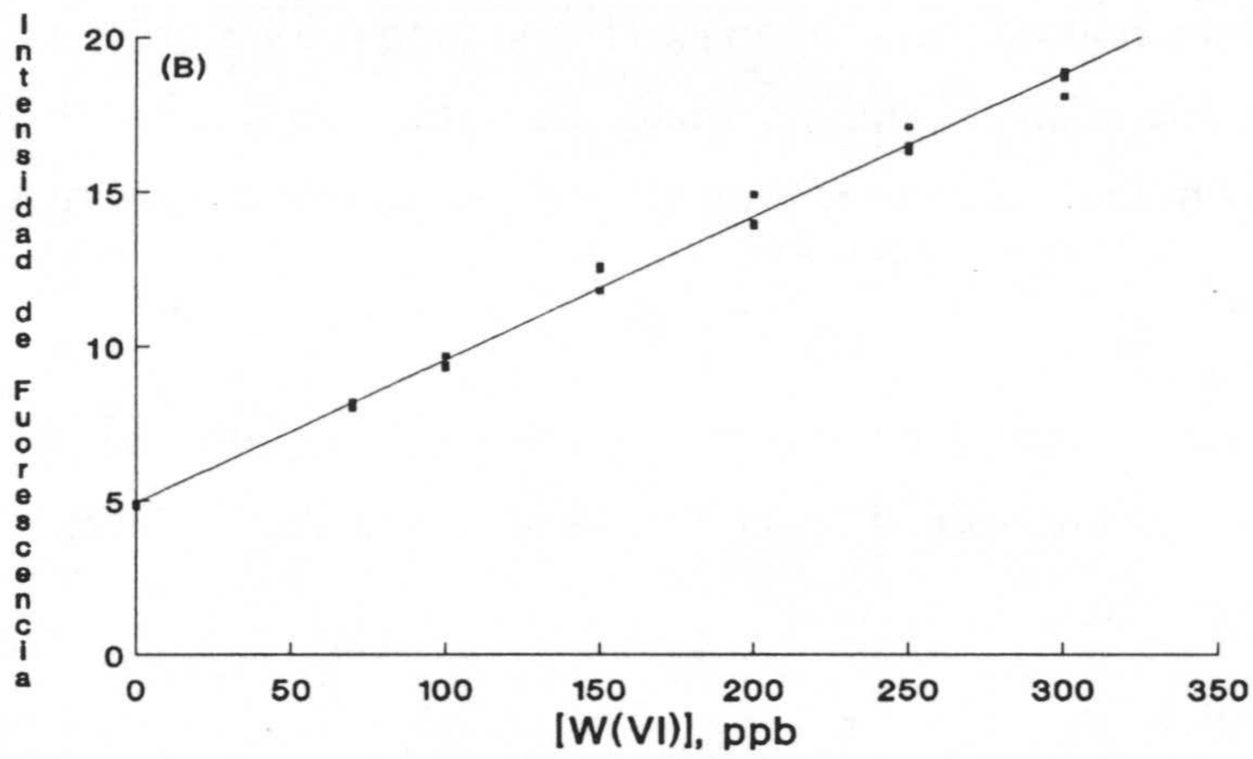


Figura VIII.14. Complejo W(VI)-RAS. Rango (70-300 ppb). (A) Primera derivada de los espectros sincrónicos: (b) blanco, (1) 70, (2) 100, (3) 150, (4) 200, (5) 250, (6) 300 ppb. (B) Recta de calibrado

4.2. PARÁMETROS DE FIABILIDAD

A) *Según la IUPAC*

Límites de detección y cuantificación

Se prepararon 10 muestras de blanco, introduciendo en matraces de 10 ml: 0'3 ó 0'5 ml de disolución de RAS 10^{-3} M, dependiendo del rango lineal y de las condiciones instrumentales utilizadas, 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'3 y 2'0 ml de BCTA al 5 %, enrasando hasta el volumen final con agua destilada.

Se registraron las señales analíticas de la primera derivada de los espectros sincrónicos. En el caso del complejo Mo(VI)-RAS, debido a que el blanco no tiene ninguna contribución en la señal analítica a la longitud de onda seleccionada, se ha llevado a cabo el cálculo de los límites de detección y cuantificación mediante el modo aproximado o bien mediante el modo extrapolado, ambos descritos en el Capítulo I.

Las señales correspondientes a los blancos registrados para el complejo W(VI)-RAS en los dos tramos lineal quedan reflejadas en la Tabla VIII.19.

Tabla VIII.19

Repetitividad del blanco. λ = 502 nm

[RAS] = 3.10⁻⁵ M (ex/em = 10/10) [RAS] = 5.10⁻⁵ M (ex/em = 5/5)

BLANCO	Señal	BLANCO	Señal
1	4'8	1	2'2
2	4'8	2	2'3
3	4'5	3	2'2
4	4'7	4	1'6
5	4'4	5	2'0
6	4'6	6	1'8
7	5'1	7	1'7
8	4'8	8	2'2
9	4'8	9	2'3
10	4'9	10	2'2
$\overline{R}$	4'76	$\overline{R}$	2'05
s	0'227	s	0'259

Precisión

Se llevó a cabo la estimación de la precisión a dos niveles de concentración pertenecientes a cada uno de los calibrados, establecidos a diferentes condiciones de sensibilidad instrumental, dependiendo del intervalo lineal para los complejos Mo(VI)-RAS y W(VI)-RAS.

Las señales correspondientes a la 1ª derivada del espectro sincrónico ($\Delta\lambda$ = 110 nm) de 10 réplicas para cada valor de concentración a las condiciones instrumentales y operatorias ya establecidas, así como los valores de concentración encontrados mediante las correspondientes rectas de calibrado y su tratamiento estadístico, se muestran en las Tablas VIII.20 y VIII.21.

Tabla VIII.20

Datos de repetitividad. [RAS] = 5.10⁻⁵ M

[Mo(VI)] = 1'0 ppm (λ = 486nm)		***[W(VI)] = 1'0 ppm (λ = 592nm)***	
Señal	[Mo],ppm	Señal	[W],ppm
19'2	0'977	9'6	0'960
18'6	0'941	10'2	1'037
20'0	1'026	9'9	0'999
19'8	1'013	10'0	1'012
18'9	0'959	9'8	0'986
20'3	1'043	10'1	1'025
17'9	0'898	9'7	0'973
19'4	0'989	10'0	1'012
20'1	1'032	9'8	0'986
18'7	0'949	10'2	1'037
$[\bar{M}o]$	0'983	$[\bar{W}]$	1'003
s	0'046	s	0'027

Tabla VIII.21

Datos de repetitividad. [RAS] = 3.10⁻⁵ M

[Mo(VI)] = 150 ppb (λ = 486nm)		***[W(VI)] = 150 ppb (λ = 592nm)***	
Señal	[Mo],ppb	Señal	[W],ppb
10'8	152'6	12'5	163'0
10'7	151'5	12'6	165'2
11'0	154'9	11'8	147'9
10'4	148'0	12'0	152'3
10'2	145'7	11'7	145'8
10'6	150'3	11'6	143'6
10'6	150'3	12'1	154'4
11'0	154'9	11'9	150'1
11'2	157'2	12'4	160'9
10'5	149'2	12'0	152'3
$[\bar{M}o]$	151'46	$[\bar{W}]$	153'55
s	3'509	s	6'970

La estimación de los parámetros que caracterizan la calidad de la determinación analítica, siguiendo las recomendaciones de la IUPAC, aparecen en la Tabla VIII.22.

Tabla VIII.22

Rarámetros de Fiabilidad según criterios IUPAC

Analito	Rango	Lin.(r^2%)	Sen.cal.(R/conc)	LD	LQ	DER(%)*
Mo	50-250 ppb	99'8	0'087	-------	-------	2'32
	0'5-4'0 ppm	99'9	16'53			4'68
W	70-300 ppb	99'4	0'046	16'78 ppb	55'93 ppb	4'54
	0'5-2'5 ppm	99'7	7'780	0'09 ppm	0'29 ppm	2'69

* Concentraciones ensayadas:
Rango superior, [Mo] = [W] = 1'0 ppm
Rango inferior, [Mo] = [W] = 150 ppb

B) ***Según el análisis de la regresión***

La sensibilidad analítica y la linealidad son establecidas mediante el uso de los datos derivados de los calibrados, reflejados en las Tablas VIII.7 y VIII.14 para Mo(VI) y W(VI) respectivamente, en el rango superior de concentraciones y en las Tablas VIII.11 y VIII.18 en el rango inferior.

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación, y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar de los valores de concentración (s_c) utilizados para el establecimiento de las rectas de calibrado en 1ª derivada del espectro sincrónico.

Estos valores obtenidos en los dos rangos de concentraciones para los complejos Mo-RAS y W-RAS, se reflejan en las Tablas VIII.23 y VIII.24, respectivamente.

Tabla VIII.23

Desviaciones estándar de cada concentración de los calibrados de Mo(VI)

Rango 0'5-4'0 ppm (λ = 486nm)		*Rango 50-250 ppb (λ = 486nm)*	
[Mo],ppm	$s_c.10^2$	[Mo],ppb	s_c
0'5	3'47	50'0	4'21
1'0	3'28	100'0	3'75
2'0	3'09	150'0	3'62
3'0	3'22	200'0	3'78
4'0	3'59	250'0	4'15

Tabla VIII.24

Desviaciones estándar de cada concentración de los calibrados de W(VI)

Rango 0'5-2'5 ppm (λ = 502 nm)		*Rango 70-300 ppb (λ = 502 nm)*	
[W],ppm	s_c	[W],ppb	s_c
0'0	2'58	0'00	5'94
0'5	2'37	70'0	5'47
1'0	2'27	100'0	5'32
1'5	2'27	150'0	5'21
2'0	2'36	200'0	5'27
2'5	2'59	250'0	5'55
		300'0	5'91

La estimación de todos los parámetros de calidad del método de determinación conjunta de Molibdeno y Volframio, calculados a partir del conjunto de datos de los calibrados aparece en la Tabla VIII.25.

Tabla VIII.25

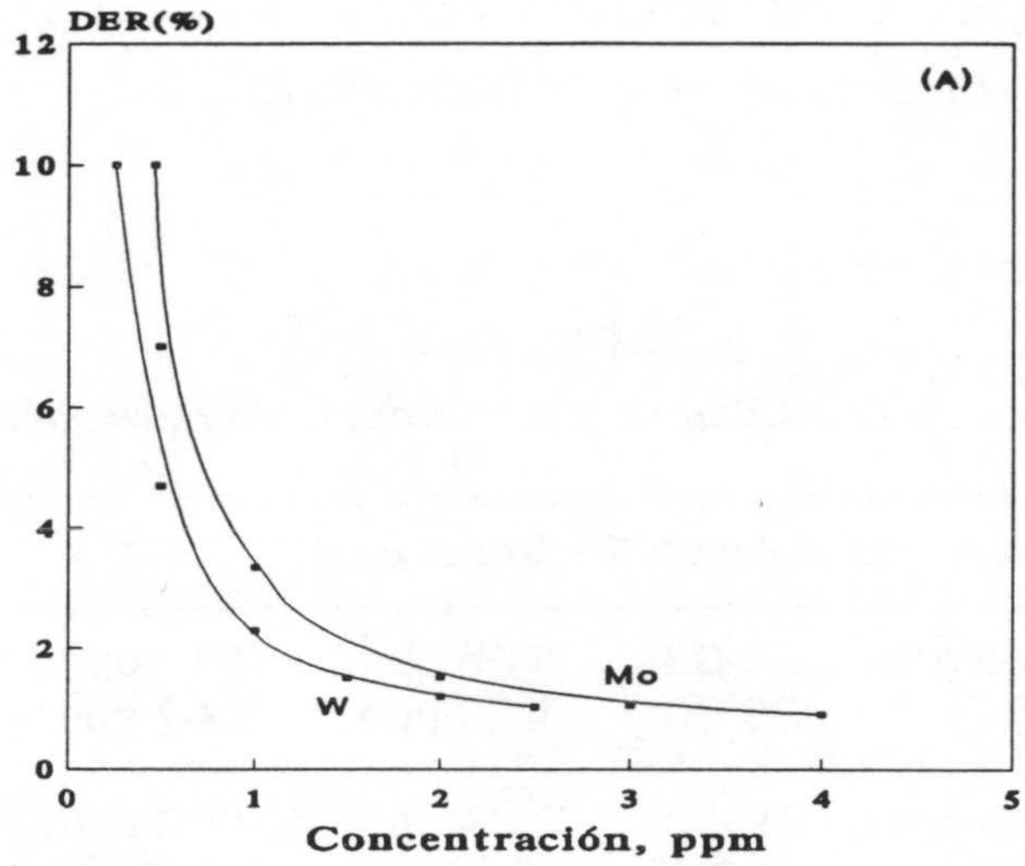
Parámetros de Fiabilidad según el modelo de Regresión lineal

Analito	Rango	Linealidad(%)	Sens. anal.	LD	LQ
Mo	0'5-4'0 ppm	99'02	0'05 ppm	0'14 ppm	0'47 ppm
	50-250 ppb	98'80	3'28 ppb	9'47 ppb	31'56 ppb
W	0'5-2'5 ppm	99'00	0'04 ppm	0'08 ppm	0'26 ppm
	70-300 ppb	98'19	8'07 ppb	17'15 ppb	57'16 ppb

Precisión

Mo				W			
(ppm)	DER(%)	(ppb)	DER(%)	(ppm)	DER(%)	(ppb)	DER(%)
0'5	7'01	50	4'70	0'5	4'69	70	7'57
1'0	3'34	100	2'22	1'0	2'27	100	5'21
2'0	1'53	150	1'35	1'5	1'51	150	3'14
3'0	1'06	200	1'09	2'0	1'20	200	2'51
4'0	0'91	250	0'96	2'5	1'03	250	2'10
						300	1'90

En la Figura VIII.15 se observa la representación de la desviación estándar relativa para cada valor de concentración de Mo(VI) y W(VI) utilizados en el establecimiento de los distintos calibrados en primera derivada del espectro sincrónico, incluyendo en ella los límites de cuantificación.



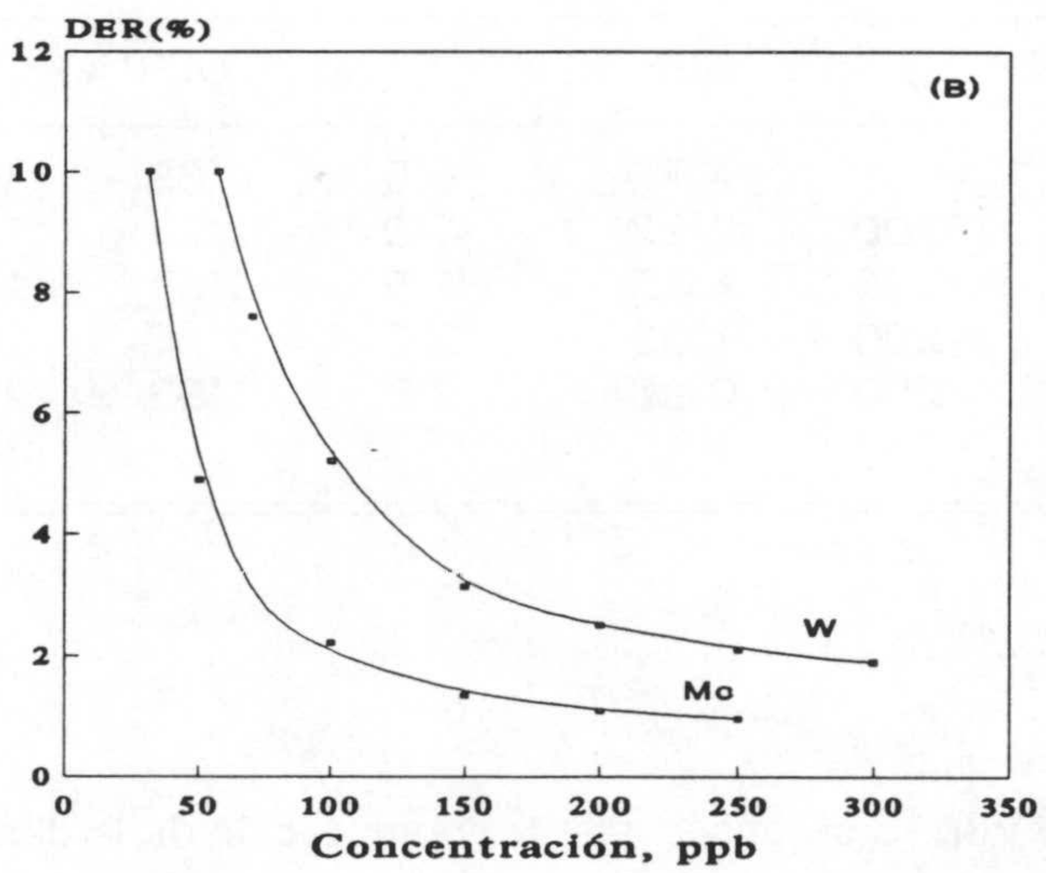


Figura VIII.15. Estimación de la precisión. (A) Rango superior: Mo(VI): 0'47-4'00 ppm; W(VI):0'26-2'50 ppm. (B) Rango inferior: Mo(VI): Rango 32-250 ppb; W(VI):57-300 ppb

SELECTIVIDAD

La tolerancia de sustancias interferentes se ha determinado obteniéndose los correspondientes intervalos de confianza sobre las señales analíticas predichas, $\Delta R = s_R.t(\alpha = 0'10, n\text{-}2\ gl, n =$ nº de puntos del calibrado), pertenecientes a las concentraciones de analito sobre las que se ha ensayado la interferencia, utilizando los datos de los calibrados establecidos.

Para ello, en matraces de 10 ml se introdujeron concentraciones constantes de Mo(VI) y W(VI) iguales a 200 ppb y cantidades decrecientes de cada uno de los iones ensayados como posibles interferentes, comenzando por 200 ppm y disminuyendo esta concentración hasta alcanzar un valor de señal analítica comprendida dentro del intervalo de confianza. Una vez adicionados los demás reactivos a las concentraciones ya optimizadas, se procedió al registro de los espectros sincrónicos a 25°C utilizando un $\Delta\lambda = 110$ nm y rendijas de excitación y de emisión de 10 nm. Posteriormente se ha obtenido la derivada de primer orden, midiéndose las señales analíticas para ambos analitos a las correspondientes longitudes de onda.

Todos los valores que no estén incluidos dentro de los intervalos de confianza de las señales analíticas predichas, deducidos a partir de los datos del calibrado, implican que la sustancia es interferente en todo el rango lineal establecido para la determinación de Mo(VI) y W(VI).

Estas señales predichas y sus correspondientes intervalos de confianza para la concentración seleccionada se muestran en la Tabla VIII.26.

Tabla VIII.26

Intervalos de confianza sobre las señales para Mo(VI) y W(VI) en primera derivada

Analito	ppb	Señal (R)	s_R	$\Delta R(\pm)$	ICR
Mo	200	14'76	0'297	0'53	14'2-15'3
W	200	14'21	0'384	0'66	13'6-14'9

s_R = Desviación estándar de la señal

Intervalo de confianza sobre la señal: $\Delta R = \pm t_{2\alpha,n-2\ gl} \cdot s_R$

En las Tablas VIII.27 y VIII.28 se muestran las señales analíticas correspondientes a la primera derivada de los espectros sincrónicos de Mo(VI) y W(VI), en presencia de los diferentes iones ensayados en la determinación conjunta.

A partir de estos valores y utilizando el método de interpolación de Lagrange mediante el submenu del programa desarrollado, se estiman las concentraciones permitidas de interferentes en la determinación simultánea de ambos iones.

Los resultados aparecen en la Tabla VIII.29.

Tabla VIII.27. Estudio de Interferencias en la determinación de Mo(VI)

Ión extraño	Cx/C_{Mo}	Cx(ppm)	Log Cx	R(1D)
Mg(II)	1000	200	2'30	12'0
	500	100	2'00	13'8
	100	20	1'30	14'7
Ca(II)	1000	200	2'30	10'1
	500	100	2'00	14'8
Ba(II)	1000	200	2'30	9'9
	100	20	1'30	14'9
Ti(IV)	50	10	1'00	25'3
	10	2	0'30	10'9
	5	1	0'00	14'0
	1	0'2	- 0'70	15'0
Zr(IV)	1000	200	2'30	0'7
	100	20	1'30	6'8
	5	1	0'00	12'7
	3	0'6	- 0'22	15'0
V(V)	10	2	0'30	22'2
	5	1	0'00	17'6
	1	0'2	- 0'70	14'4
Cr(III)	1000	200	2'30	10'0
	100	20	1'30	14'6
Mn(II)	1000	200	2'30	14'9
Fe(III)	10	2	0'30	4'3
	5	1	0'00	7'6
	2	0'5	- 0'30	9'5
	1	0'2	- 0'70	14'5
Co(II)	1000	200	2'30	8'8
	500	100	2'00	11'7
	100	20	1'30	15'1
Ni(II)	1000	200	2'30	10'0
	500	100	2'00	14'9
Cu(II)	100	20	1'30	8'3
	50	10	1'00	10'8
	25	5	0'70	15'0
Zn(II)	1000	200	2'30	20'3
	100	20	1'30	15'0
B(III)	100	20	1'30	10'2
	50	10	1'00	7'2
	10	2	0'30	14'6

Tabla VIII.27. (continuación)

Ión extraño	Cx/C_{Mo}	Cx(ppm)	Log Cx	R(1D)
Al(III)	100	20	1'30	31'2
	10	2	0'30	16'4
	1	1	0'00	15'0
Sn(II)	100	20	1'30	25'7
	10	2	0'30	18'3
	1	0'2	- 0'70	14'8
Pb(II)	100	20	1'30	2'0
	25	5	0'70	4'9
	10	2	0'30	9'3
	1	0'2	- 0'70	14'9
As(III)	10	2	0'30	42'0
	5	1	0'00	24'8
	3	0'6	- 0'22	14'6
Sb(III)	10	2	0'30	8'7
	5	1	0'00	10'4
	1	0'6	- 0'22	14'8
$C_2O_4^{2-}$	1000	200	2'30	7'0
	500	100	2'00	10'7
	50	10	1'00	12'2
	25	5	0'70	15'0
SiO_3^{2-}	1000	200	2'30	15'0
NO_3^-	1000	200	2'30	14'4
PO_4^{3-}	1000	200	2'30	11'1
	500	100	2'00	14'5
SO_4^{2-}	1000	200	2'30	14'8
SCN^-	1000	200	2'30	14'7
F^-	1000	200	2'30	38'7
	100	20	1'30	20'1
	10	2	0'30	14'2
Br^-	1000	200	2'30	15'1
I^-	1000	200	2'30	14'6
Citrato	50	10	1'00	5'6
	10	2	0'30	11'1
	1	0'2	- 0'70	13'4
	0'5	0'1	- 1'00	15'0

Cx = Concentración de interferente
C_{Mo} = Concentración de Molibdeno ensayada

Tabla VIII.28. Estudio de Interferencias en la determinación de W(VI)

Ión extraño	Cx/C_w	Cx(ppm)	Log Cx	R(1D)
Mg(II)	1000	200	2'30	18'7
	500	100	2'00	18'5
	100	20	1'30	13'7
Ca(II)	1000	200	2'30	18'8
	500	100	2'00	14'9
Ba(II)	1000	200	2'30	10'4
	100	20	1'30	14'0
Ti(IV)	50	10	1'00	32'4
	10	2	0'30	3'2
	5	1	0'00	8'5
	1	0'2	- 0'70	13'9
Zr(IV)	1000	200	2'30	0'9
	100	20	1'30	4'3
	5	1	0'00	11'7
	3	0'6	- 0'22	14'2
V(V)	10	2	0'30	12'0
	5	1	0'00	18'1
	1	0'2	- 0'70	16'4
	0'5	0'1	- 1'00	13'6
Cr(III)	1000	200	2'30	8'6
	500	100	2'00	10'4
	100	20	1'30	13'6
Mn(II)	1000	200	2'30	14'3
Fe(III)	10	2	0'30	2'3
	5	1	0'00	6'8
	2	0'5	- 0'30	8'8
	1	0'2	- 0'70	13'9
Co(II)	1000	200	2'30	6'3
	500	100	2'00	9'5
	100	20	1'30	14'1
Ni(II)	1000	200	2'30	19'1
	500	100	2'00	14'7
Cu(II)	100	20	1'30	7'7
	50	10	1'00	11'7
	25	5	0'70	14'1
Zn(II)	1000	200	2'30	27'4
	500	100	2'00	18'0
	100	20	1'30	14'6

Tabla VIII.28. (continuación)

Ión extraño	Cx/C_w	Cx(ppm)	Log Cx	R(1D)
B(III)	100	20	1'30	35'4
	50	10	1'00	24'0
	10	2	0'30	14'9
Al(III)	100	20	1'30	28'0
	10	2	0'30	19'4
	3	0'6	- 0'22	13'9
Sn(II)	100	20	1'30	10'7
	10	2	0'30	11'3
	1	0'2	- 0'70	13'8
Pb(II)	100	20	1'30	6'1
	25	5	0'70	12'9
	5	1	0'00	13'8
As(III)	10	2	0'30	7'0
	5	1	0'00	13'2
	3	0'6	- 0'22	14'5
Sb(III)	100	20	1'30	37'6
	10	2	0'30	13'9
$C_2O_4^{2-}$	1000	200	2'30	21'5
	500	100	2'00	18'8
	100	20	1'30	14'3
SiO_3^{2-}	1000	200	2'30	10'0
	500	100	2'00	13'8
NO_3^-	1000	200	2'30	14'1
PO_4^{3-}	1000	200	2'30	10'9
	500	100	2'00	14'3
SO_4^{2-}	1000	200	2'30	13'9
SCN^-	1000	200	2'30	14'4
F^-	1000	200	2'30	42'5
	100	20	1'30	16'1
	10	2	0'30	14'4
Br^-	1000	200	2'30	12'1
	500	100	2'00	14'9
I^-	1000	200	2'30	13'8
Citrato	50	10	1'00	6'5
	10	2	0'30	6'8
	1	0'2	- 0'70	9'2
	0'5	0'1	- 1'00	14'0

Cx = Concentración de interferente
C_w = Concentración de Volframio ensayada

Tabla VIII.29. Niveles de tolerancia para Mo(VI) y W(VI)

Ión extraño	Mo		W	
	C_x/C_{Mo}	c_t (ppb)	C_x/C_W	c_t (ppb)
Mg(II)	400	79980	130	26000
Ca(II)	546	109140	500	100000
Ba(II)	138	27540	129	25763
Ti(IV)	6	1119	3	594
Zr(IV)	4	710	3	675
V(V)	3	573	0'5	100
Cr(III)	122	24380	100	20
Mn(II)	1000	200000	1000	200000
Fe(III)	1	207	1	205
Co(II)	201	40272	131	26242
Ni(II)	552	110408	516	103280
Cu(II)	28	5611	29	5781
Zn(II)	113	22751	344	68710
B(III)	271	54200	10	2000
Al(III)	6	1250	4	741
Sn(II)	2	352	1	229
Pb(II)	3	630	19	3784
As(III)	3	627	5	920
Sb(III)	3	637	11	2200
$C_2O_4^{2-}$	29	5741	132	26363
SiO_3^{2-}	1000	200000	519	103750
NO_3^-	1000	200000	1000	200000
PO_4^{3-}	536	107150	577	115350
SO_4^{2-}	1000	200000	1000	200000
SCN^-	1000	200000	1000	200000
F^-	27	5313	81	16106
Br^-	1000	200000	689	137720
I^-	1000	200000	1000	200000
Citrato	0'7	134	0'5	104

c_t = concentración tolerada de interferente

En el estudio de selectividad realizado para la determinación fluorimétrica conjunta de Mo(VI) y W(VI) con RAS, se encuentran como principales interferencias, las producidas por Ti, Zr, V, Fe, Al, Sn, Pb, As, Sb y citrato, los cuales son tolerados en relaciones inferiores a 10:1 con respecto a las concentraciones presentes de ambos analitos. Los restantes iones ensayados son tolerados en un considerable exceso con respecto al contenido en ambos analitos.

4.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Se establecen dos procedimientos para la determinación conjunta de Mo(VI) y W(VI) con Rojo de Alizarina S mediante la primera derivada del espectro sincrónico, a diferentes condiciones de sensibilidad instrumental:

A) En matraces de 10 ml se introduce la disolución problema cuyo contenido final debe estar comprendido entre 0'5-4'0 ppm de Mo(VI) y 0'3-2'5 ppm de W(VI). Se adicionan 2'0 ml de disolución reguladora acético/acetato de pH 4'3, 2'0 ml de disolución de BCTA al 5% y 0'5 ml de disolución de RAS 10^{-3}M, enrasando hasta el volumen final con agua destilada.

Se registran los espectros sincrónicos a 25°C, utilizando un $\Delta\lambda = 110$ *nm, con las siguientes condiciones instrumentales: Rendijas de excitación y emisión: 5,5; velocidad de barrido 480 nm/min; tiempo de respuesta 0'5 s.*

Se obtiene la primera derivada de éstos midiendo la distancia vertical desde el espectro hasta la linea base a las siguientes longitudes de onda:

Mo-RAS(h1): $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 486/596$ *nm*

W-RAS (h2): $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 502/612$ *nm*

Para la obtención de ambas derivadas se utilizó un intervalo de 25 nm.

B) *En este caso los contenidos en matraz para ambos analitos deben estar comprendidos entre 32-250 ppb para Mo(VI) y 57-300 ppb para W(VI), utilizándose una concentración del reactivo RAS de 3.10^{-5} M y los mismos valores para los demás reactivos añadidos. El registro de los espectros sincrónicos se realiza con rendijas de ex/em de 10 nm permaneciendo idénticas las demás condiciones instrumentales.*

El contenido en Mo(VI) y W(VI) se determina a partir de las correspondientes rectas de calibrado.

5. APLICACIONES ANALÍTICAS

La aplicación de la determinación fluorimétrica propuesta se ha llevado a cabo en muestras sintéticas y en una muestra real de un acero certificado.

5.1. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MOLIBDENO Y VOLFRAMIO EN MEZCLAS SINTÉTICAS

Para comprobar el método se han analizado una serie de muestras que contienen diferentes proporciones de ambos analitos, variándo progresivamente la relación de cada uno de ellos entre los límites 20:1 a 1:10. Se registraron las señales analíticas a las correspondientes longitudes de onda de la 1ª derivada de los espectros sincrónicos para los complejos Mo-RAS y W-RAS.

Las concentraciones ensayadas y los resultados obtenidos como promedio de tres determinaciones, en cada caso se reunen en la Tabla VIII.30.

Tabla VIII.30

Resolución de mezclas sintéticas de Mo-RAS y W-RAS. 1ª derivada del espectro sincrónico

1ª Derivada

Relación	Mo(VI), ppm			W(VI), ppm		
Mo:W	Puesto	Hallado*	Er(%)	Puesto	Hallado*	Er(%)
20:1	4'0	4'260	6'1	0'2	0'169	15'5
10:1	2'0	2'200	10'0	0'2	0'215	7'5
7:1	1'4	1'279	8'6	0'2	0'194	3'0
5:1	1'0	0'917	8'3	0'2	0'198	1'0
3:1	0'6	0'578	3'7	0'2	0'205	2'5
2:1	0'4	0'359	10'3	0'2	0'203	1'5
1:1	0'2	0'186	7'0	0'2	0'204	2'0
1:2	0'2	0'189	5'5	0'4	0'381	4'8
1:3	0'2	0'197	1'5	0'6	0'568	5'3
1:5	0'2	0'211	5'5	1'0	0'890	11'0
1:10	0'2	0'179	10'5	2'0	1'789	10'5

* Media de tres determinaciones

Se observa que el intervalo de relaciones entre las concentraciones de anlitos, óptimo para llevar a cabo la aplicación de la determinación conjunta se encuentra comprendido entre 10:1 y 1:3 (Mo:W).

5.2. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MOLIBDENO Y VOLFRAMIO EN UN ACERO DE REFERENCIA

Considerando el tipo de muestras en las que Mo(VI) y W(VI) se encuentran presentes, se ha seleccionado, para demostrar la aplicabilidad del método fluorimétrico propuesto, un material de referencia, el acero BCS (British Chemical Standard) Nº 451/1 cuya composición certificada en los restantes elementos es la siguiente: C (0'054%), Si (0'116%), Mn (0'62%), P (0'009%), S (0'014%), Cr (0'104%), Ni (0'016%), As (0'041%), Cu(0'47%), Sn(0'002%) y Ti (0'105%).

Tratamiento de la muestra

Se disuelven aproximadamente, 0'5 g de limaduras del acero en 25 ml de HCl concentrado, calentando suavemente hasta que cese la ebullición. Posteriormente, se añaden 10 ml de HNO_3 concentrado, y se calienta hasta total expulsión de óxidos de nitrogeno, diluyendo hasta 50 ml con agua destilada. La disolución resultante se deja enfriar y se filtra, lavando el filtrado con HCl 2 M en caliente y finalmente con agua caliente. El filtrado se transvasa a un matraz aforado de 100 ml enrasando hasta el volumen final con agua destilada (**1**).

Eliminación de Interferentes

Con objeto de eliminar los principales interferentes como Fe(III) y Ti(IV), se procede a su precipitación como hidróxidos, adicionando NaOH 2 M a 10 ml de la disolución de la muestra. La disolución resultante se calienta hasta ebullición y se filtra. El filtrado se redisuelve con HCl 1:1 y se vuelve a precipitar de nuevo mediante la adición de la disolución alcalina. Se reunen ambos filtrados y se neutralizan con disolución de HCl 2 M, completándose hasta un volumen final de 100 ml con agua destilada (**2,3**).

Procedimiento

El contenido en Molibdeno y Volframio se determina introduciendo en matraces de 10 ml, alícuotas de la disolución de la muestra inferiores a 4'0 ml y siguiendo el *Procedimiento Operatorio **B***, registrando los espectros sincrónicos a 25°C y midiendo el contenido de ambos iones en 1ª Derivada a las longitudes de onda ya seleccionadas.

Deteminación del contenido en molibdeno y volframio en el acero BCS Nº 451/1

Para comprobar la validez del método propuesto en este tipo de matriz, se ha aplicado éste a un material de referencia, de modo que la comprobación de la exactitud es posible realizarla mediante un Test de la t para la comparación de dos medias, conociendo el contenido medio de Mo(VI) y W(VI) en el material de referencia certificado, así como la desviación estándar, s, que se muestran en la Tabla VIII.31.

Tabla VIII.31

Datos del certificado de análisis de Mo y W en el acero de referencia

Analito	mg/g	Réplicas	s
Mo(VI)	0'387	6	0'016
W(VI)	0'994	5	0'059

Los resultados obtenidos al aplicar el método propuesto a tres muestras independientes, se recogen en la Tabla VIII.32.

Previamente a la comparación de los valores medios, se ha realizado un test de la F de Snedecor con objeto de comprobar si las varianzas de ambos conjuntos de datos difieren o no significativamente, ya que en función de ésto, el estadístico a calcular y los grados de libertad vendrán expresados de diferente forma.

Los resultados de la comparación de los contenidos encontrados con los valores certificados aparecen en las Tablas VIII.33 y VIII.34.

Tabla VIII.32

Determinación de molibdeno y volframio en el acero BCS 451/1

Determinación	[Mo]($\mu g.g^{-1}$)	[W] ($\mu g.g^{-1}$)
1	0'405	0'939
2	0'392	0'927
3	0'401	0'987
Cm	0'399	0'951
s	0'007	0'032
DER	1'8 %	3'4 %

Cm = Media de tres determinaciones

Tabla VIII.33

Comparación de resultados del contenido en molibdeno en acero

	Met. propuesto	Valor certificado
[Mo(VI)],$\mu g/g$	0'399	0'387
n	3	6
s^2	$5'2.10^{-5}$	$2'7.10^{-4}$
F	5'13 (P= 10'4 %)	
s_p^2	2'1.10-4	
g.l	7	
t(c)	1'22 (P= 26'3%)	

s^2, Varianza; s_p^2, Varianza promedio; n, número de determinaciones; F, estadístico para la comparación de varianzas; t(c), estadístico para la comparación de contenidos. Valores críticos: F(0'05; 5,2 gl) = 19'3; t(0'05; 7 gl) = 2'37

Tabla VIII.34

Comparación de resultados del contenido en volframio en acero

	Met. propuesto	Valor certificado
[W(VI)], μg/g	0'951	0'994
n	3	5
s^2	$3'5.10^{-3}$	$2.7.10^{-3}$
F	3'50 (P = 13'2 %)	
s_p^2	$2'7.10^{-3}$	
g.l	6	
t(c)	1'14 (P = 30'0%)	

s^2, Varianza; s_p^2, Varianza promedio; n, número de determinaciones; F, estadístico para la comparación de varianzas; t(c), estadístico para la comparación de contenidos. Valores críticos: F(0'05; 4,2 gl) = 6'94; t(0'05; 6 gl) = 2'45

En ambos casos se pone de manifiesto que las varianzas que muestran los conjuntos de datos obtenidos mediante la aplicación del método propuesto y los suministrados por el BCS, no difieren significativamente ($F_{cal} < F_{tab}$, $P > 5\%$). De este modo, para el cálculo del estadístico t se ha usado una varianza promedio de ambas, s_p^2, siendo los grados de libertad la suma de los correspondientes a ambos conjuntos de datos. El test de comparación de los valores medios concluye obteniendo un valor del estadístico t inferior al tabulado ($t_{cal} < t_{tab}$, $P > 5\%$), indicándose así la concordancia de nuestro resultado con los valores certificados por el BCS y poniéndose de manifiesto la validez de la determinación conjunta de ambos analitos con RAS mediante la obtención de la primera derivada del espectro sincrónico.

Los resultados de este trabajo se encuentran aceptados para su publicación en la Revista *Talanta*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

VIII.1. R.S. Bottei y B.A. Trusk, "Ion-exchange separation and Fluorimetric determination of Tungsten in Steels", *Anal. Chim. Acta*, **37**, 409, (1967).

VIII.2. H. Hildebrand y M. Dundell, "Applied Inorganic Analysis", Wiley, New York, pp.248 y 455 (1929).

VIII.3. F. Salinas, M. Jiménez Arrabal e I. Durán Merás, "Extractive Separation of Microamounts of Molybdenum (VI)", Ann. di Chim., **77**, 705, (1987).

CONCLUSIONES

APLICACIÓN DEL MODELO DE REGRESIÓN LINEAL AL ESTABLECIMIENTO DE LA CALIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO

1. Con objeto de extraer una mayor información y de mejor calidad acerca de nuestros datos analíticos, con ayuda de técnicas quimiométricas y haciendo uso del modelo de Regresión Lineal, hemos propuesto una alternativa para el establecimiento de los Parámetros de Fiabilidad de un método analítico, tales como, Límites de Detección y Cuantificación, Sensibilidad Analítica y Precisión. Su determinación, está basada en la utilización de expresiones derivadas de la aplicación del modelo estadístico de regresión lineal por mínimos cuadrados, a los datos obtenidos al establecer el calibrado. Se deben efectuar réplicas para cada uno de los valores de concentración, distribuidos homogeneamente en todo el intervalo lineal. De este modo, se tiene en cuenta la variabilidad experimental a lo largo de la recta de calibrado y se considera el error asociado a la pendiente y ordenada en el origen, en contra de la alternativa de la IUPAC, que considera estos valores totalmente precisos y basa la estimación de estos parámetros en experiencias de repetitividad. Previamente a la aplicación de este modelo se han de cumplir los requisitos necesarios.

2. Así mismo, y con objeto de estimar la Selectividad de un método analítico, hemos utilizado el modelo de regresión lineal para establecer el intervalo de confianza sobre la señal, predicha mediante la ecuación de calibrado, correspondiente a la concentración de analito sobre la que se realiza el estudio de posibles interferentes. De este modo, proponemos no utilizar un criterio arbitrario para decidir si una sustancia presenta o no interferencia, sino que consideraremos como concentración interferente aquella que provoque sobre la señal un error superior al propio error accidental del método.

3. La ventaja del establecimiento de los Parámetros de Fiabilidad de los métodos mediante el modelo propuesto, reside en que estos pueden ser utilizados como criterios de comparación entre dos métodos, independientemente del

instrumento de medida o de la técnica utilizada ya que su cálculo está basado en la calidad del calibrado realizado. Esta afirmación es de gran importancia en Espectrofluorimétria debido al carácter relativo de la señal instrumental.

4. En aquellos casos en los que no se dispone de un valor de referencia, aportado por el certificado de una muestra de referencia, o bien de los datos procedentes de un ejercicio de intercomparación entre laboratorios o por la aplicación, a la misma muestra, de un método estándar de referencia, hemos utilizado el Método de Adición de Patrón para efectuar la validación. Se ha propuesto un protocolo estadístico para llevar a cabo tal metodología, que implica el establecimiento de tres calibrados distintos: con diferentes concentraciones de patrón (CP), con adición de patrón a un volumen constante de disolución de muestra (CA) y con diferentes porciones de muestra o Calibrado de Youden (CY). Una vez comprobado el requisito fundamental para su aplicación (las pendientes de los calibrados CP y CA, no deben diferir significativamente), es posible estimar la contribución de la matriz a la señal analítica (Blanco de la matriz o " Blanco de Youden"), eliminar este valor de todas las medidas y calcular los contenidos de analito en la disolución, utilizando los calibrados CP y CA. De la comparación de estos resultados se deduce la exactitud de los métodos estudiados de modo que, si no presentan diferencias significativas, es posible el uso directo del calibrado con patrones para el análisis del tipo de muestras estudiadas.

5. Se ha desarrollado un Programa informático en lenguaje PASCAL, que mediante diversas opciones del menu principal, y una vez adquiridos los datos de los calibrados, o bien desde teclado o bien mediante un fichero en formato ASCII, permite calcular los Parámetros de Fiabilidad, estima el polinómio que mejor se ajusta a las señales analíticas obtenidas en el estudio de cada interferente, con objeto de establecer la concentración de interferente tolerada, y lleva a cabo la validación de los métodos propuestos, realizando los test estadísticos necesarios para informarnos sobre la posibilidad de aplicar esta metodología y la exactitud de la determinación. Si el método es exacto, nos permite conocer el contenido de analito en muestra, al introducir el correspondiente factor de dilución (obtenido en

función del tratamiento de ésta).

ROJO DE ALIZARINA S COMO REACTIVO FLUORIMÉTRICO. USO DE MEDIOS MICELARES

6. La presencia del grupo sulfónico en el reactivo Rojo de Alizarina S no solo confiere solubilidad a la molécula sino que aumenta notablemente su reaccionabilidad. Su escasa aplicación como reactivo fluorimétrico nos ha llevado a establecer diversos métodos para la determinación de iones metálicos que forman complejos fluorescentes con el reactivo, tales como Boro, Volframio, Molibdeno, Vanadio y Circonio, en medio homogéneo y micelar.

7. Se ha ensayado la acción de diferentes agentes tensioactivos en los sistemas fluorimétricos estudiados. En el caso del sistema B(III)-RAS, la adición de tensioactivos aniónicos y no iónicos no parece alterar la fluorescencia del complejo, y en el caso del aniónico sólo provoca un ligero aumento en la señal del blanco. Sin embargo, en presencia de micelas catiónicas se produce una considerable disminución de la señal del complejo, que interpretamos como un posible efecto competitivo entre los iones borato y las micelas catiónicas por el reactivo. La interacción entre estas micelas y el reactivo se refleja en el aumento de señal que experimenta el blanco.

8. Se ha establecido un nuevo método espectrofluorimétrico para la determinación de B(III) en medio acuoso homogéneo a pH 7'4. La formación del complejo, de estequiometría 1:1 (B:RAS), es instantánea, permaneciendo estable durante, al menos, 4 horas. El rango de aplicación se extiende desde 9-1000 ppb, dividido en dos intervalos lineales, con sensibilidades analíticas de 4 y 8 ppb para los tramos inferior y superior, respectivamente y precisión de 1'1% (0'6 ppm) y 2'5 % (100 ppb).

El método, que presenta la ventaja de operar en medio acuoso (no en medio H_2SO_4 como otros métodos clásicos de determinación de Boro), y que es muy

selectivo en presencia de EDTA como agente enmascarante, se ha aplicado a la determinación de B(III) en hojas de plantas, aguas naturales y tres tipos de suelos.

9. Conocida la acción sensibilizadora o de realce de la fluorescencia, que presentan ciertos agentes tensioactivos sobre complejos metálicos fluorescentes, decidimos ensayar medios micelares de diversa naturaleza (aniónicos, catiónicos y no iónicos), sobre los restantes complejos estudiados. En todos los casos se observó un notable aumento de la señal fluorescente en presencia de tensioactivos catiónicos. La interpretación de este aumento, de acuerdo con la bibliografía, sería la atracción del complejo aniónico por la micela, situándolo en el microambiente micelar, donde el complejo encuentra una menor polaridad y mayor viscosidad. La combinación de estas interacciones electrostáticas e hidrofóbicas provocan una mayor rigidez en la estructura del complejo que justificaría el aumento de la señal fluorescente.

10. En el caso de micelas aniónicas como DSS, las interacciones serán repulsivas respecto al reactivo o a los complejos con cargas negativas, como es nuestro caso, de modo que la fracción de reactivo RAS incorporada a las micelas de DSS será muy pequeña, siendo la única interacción posible la hidrófoba tensioactivo-RAS. En el caso de tensioactivos no iónicos como TX-100 o Brij-35, solo se consideran las interacciones hidrófobas, no existiendo fuerzas electrostáticas, por lo que el resultado de su interacción es del mismo orden para el reactivo que para los complejos estudiados, no observándose mejora en la señal fluorescente neta.

11. La sensibilización de la fluorescencia de todos los complejos estudiados en presencia de tensioactivo catiónico se debe a un fenómeno micelar, ya que el aumento de la señal se manifiesta después de que la concentración de tensioactivo es superior a su concentración crítica micelar (c.m.c). Es también un hecho común el que, en aquellos casos en los que el complejo ya es fluorescente en ausencia de tensioactivo, se observa un desplazamiento del intervalo óptimo de pH hacía valores más ácidos. Esto se deber al aumento de la disociación de los

grupos -OH del reactivo por la presencia del tensioactivo. Para su comprobación, hemos determinado espectrofotométrica y fluorimetricamente los valores de los pK_1 y pK_2 del Rojo de Alizarina S en presencia de micelas de BCTA, observándose una disminución para el primero de ellos con respecto a su valor en ausencia de tensioactivo.

12. Se establecen los parámetros experimentales que afectan al estudio del complejo fluorescente W(VI)-RAS, de estequiometría 1:1, estableciendo un método para la determinación del elemento en medio catiónico micelar con BCTA, a pH 4'0. El complejo se forma instantáneamente permaneciendo su señal estable, al menos 5 horas. El rango de aplicación se extiende entre 4 y 1000 ppb, dividido en dos intervalos lineales, con sensibilidad analítica de 2 y 9 ppb para los tramos superior e inferior, respectivamente. La precisión es de 1'4 % (0'4 ppm) y 2'1% (60 ppb).

13. Se ha realizado el estudio del sistema Mo(VI)-RAS, que presenta fluorescencia en ausencia y en presencia del tensioactivo BCTA. Al estudiar el efecto de la fuerza iónica sobre la señal fluorescente del complejo en ausencia del tensioactivo, se observó que una alta concentración de sales, y sobre todo, de aquellas que poseían iones K^+, provocaba un considerable aumento de la fluorescencia del sistema, mejorando por tanto la sensibilidad de la determinación fluorimétrica. Esto podría interpretarse mediante la formación de asociaciados iónicos entre el complejo aniónico y los iones positivos. El aumento de sensibilidad que proporciona a la determinación, una concentración de KCl óptima de 1'5 M, a pH de 5'5, ha sido comparado con el aumento producido por la presencia de micelas de BCTA, obteniéndose mejores resultados en este último caso. De este modo se ha establecido el método de determinación de Mo(VI) en presencia de una concentración de BCTA del 0'6 %, a pH 4'7 . Aunque en ausencia y en presencia de KCl la relación estequiometría encontrada es 1:2 (Mo:RAS), al realizar el estudio en medio micelar, se observa que la especie favorecida es la de menor relación reactivo:analito, la 1:1 (Mo:RAS). El rango de aplicación del método comprende desde 2-1000 ppb, dividido en dos tramos

lineales, con una sensibilidad analítica de 1 y 6 ppb, respectivamente, y precisión de 1'0 % (0'4 ppm) y 0'9 % (60 ppb). Es por tanto, uno de los métodos más sensibles, de los establecidos hasta ahora, para la determinación de Mo(VI).

Utilizando los tratamientos adecuados para la eliminación de los principales interferentes, se ha aplicado a distintas muestras vegetales y a un preparado farmaceútico, Dayamineral, demostrándose la validez del método propuesto en este tipo de matrices.

14. Se propone una determinación de V(V) mediante la formación del complejo binario V(V)-RAS que presenta fluorescencia en medio micelar con BCTA, a pH 7'7. La formación del complejo es instantánea permaneciendo estable durante, al menos 5 horas. El complejo fluorescente es de estequiometría 1: 1 (V:RAS) y la sensibilidad analítica de la determinación es de 2 y 9 ppb para cada uno de los tramos lineales establecidos. El rango de aplicación se extiende entre 4-1000 ppb y la precisión es de 1'5 % (0'4 ppm) y 2'1 % (60 ppb).

La principal característica del método es el ser uno de los pocos métodos directos fluorimétricos sensibles que existen para la determinación de V(V). La determinación se ha aplicado al análisis de muestras de interés medioambiental (agua de mar y concha fina), donde la cantidad presente de V(V) puede ser indicativo del grado de contaminación.

15. Se ha estudiado en ausencia de surfactante, el complejo fluorescente que forma Zr(IV) con RAS en presencia de EDTA, encontrándose, para el complejo ternario que se forma , estequiometría 1:1:1 (Zr(IV):EDTA:RAS). El complejo, que se origina a pH 5'5, requiere para el desarrollo de la fluorescencia esperar 15 min. y el orden óptimo de adición es aquel en el que se forme previamente el binario Zr(IV)-EDTA, pues si se formarse el binario Zr(IV)-RAS, antes de la adición de EDTA, la formación del ternario fluorescente se consigue transcurridas, al menos 2 horas desde la mezcla de reactivos.

La adición de una concentración del tensioactivo BCTA por encima de su c.m.c., provoca un notable aumento de la señal fluorescente, por lo que hemos establecido el método fluorimétrico en presencia del mencionado tensioactivo,

siendo el pH óptimo de trabajo 4'7, el tiempo de formación del complejo de 20 min. y el orden de adición: Zr(IV) + EDTA + Tampón + BCTA + RAS. La fluorescencia del sistema es estable durante, al menos, 5 horas y la estequiometría del complejo no varía.

El intervalo de aplicación del método abarca desde 1-1000 ppb, dividido en dos tramos lineales con sensibilidades analíticas de 0'6 y 14 ppb, respectivamente y precisión de 2'2 % (0'4 ppm) y 1'2 % (30 ppb). Este método, además de ser uno de los más sensibles de los propuestos hasta ahora para la determinación de Zr(IV), presenta como principal ventaja su elevada selectividad, ya que el hecho de poder trabajar con un considerable exceso de EDTA hace que éste no solo actúe como ligando en la fomación del complejo ternario, sino que además ejerza una acción enmascarante sobre numerosos iones metálicos, proporcionando una determinación muy selectiva.

16. En el estudio de la concentración óptima de EDTA, necesaria para la completa formación del complejo ternario Zr(IV)-EDTA-RAS, se observó la existencia de un tramo lineal en el que la señal fluorescente era proporcional a la concentración de este ligando, alcanzándose un valor máximo y constante que se mantenía para un elevado exceso de EDTA. Este hecho nos llevó a establecer un método fluorimétrico para la determinación de EDTA, basado en la formación del ternario fluorescente en presencia de micelas de BCTA. Se llevó a cabo la optimización de aquellos parámetros experimentales, que diferían con respecto al establecimiento del método para la determinación de Zr(IV), tales como: concentración óptima de Zr(IV) y de RAS, influencia del orden de adición y estabilidad del complejo.

En este caso, debido a que el analito es el EDTA y se pretende su determinación a niveles de trazas, la formación del ternario es más lenta. La fluorescencia máxima se desarrolla transcurrido un tiempo de espera de 1 hora, a partir del cual la señal permanece constante, al menos durante 5 horas. El intervalo de aplicación del método comprende desde 3-1000 ppb, igualmente dividido en dos tramos lineales de sensibilidad analítica de 2 y 9 ppb, respectivamente. La precisión es de 1'4 % (0'4 ppm) y 1'5 % (60 ppb).

De este modo, proponemos el primer método fluorimétrico muy sensible, para la determinación de EDTA a niveles de trazas. Debido al interés de su determinación, al ser utilizado como aditivo en alimentos envasados, se ha realizado un estudio de los posibles interferentes encontrados en este tipo de matrices, así como un estudio de la capacidad de formación del ternario Zr(IV)-EDTA-RAS, a partir de disoluciones en las que previamente se encuentran formados los correspondientes quelatos con diferentes iones metálicos y EDTA. Son principales interferentes Fe(III), Sn(II) y Al, el primero de los cuales es enmascarado mediante la adición de ácido L-ascórbico, y los dos restantes con fluoruros. El método es aplicable a la derterminación de EDTA en alimentos envasados: mahonesa y conservas de lentejas y garbanzos.

17. Se ha utilizado la técnica de Fluorescencia Sincrónica combinada con la metodología de derivadas, para determinar B(III) y Mo(VI) simultáneamente. La determinación se ha llevado a cabo a pH 6'3, en presencia de una concentración de KCl 1'0 M. Se ha comprobado que, a esta concentración, la señal para el complejo B-RAS no se ve alterada, produciéndose sin embargo, un aumento en la fluorescencia del complejo Mo-RAS. Esto conlleva un aumento en la sensibilidad de la determinación de Mo(VI), lo cual es favorable para su determinación en matrices vegetales, donde su contenido suele ser bastante inferior al del B(III).

El espectro sincrónico se ha registrado utilizando un $\Delta\lambda = 150$ nm, y las medidas para ambos elementos se han realizado en los puntos isodiferenciales en 1ª y 2ª derivada, en los que la contribución a la señal analítica es solo debida a uno de los iones analizados.

Debido a la mejor sensibilidad que presenta la 1ª derivada del espectro sincrónico, se ha procedido a su aplicación para la determinación simultánea de Mo(VI) y B(III) en hojas de plantas de melón y de tomate, eliminando las posibles interferencias mediante el paso de la muestra a través de una resina de cambio iónico en ciclo ácido. El rango de aplicación utilizando esta metodología es de 0'04-0'90 ppm para Mo(VI) y 0'12-3'00 ppm para B(III). La sensibilidad analítica para ambas determinaciones es de 0'02 y 0'06 ppm, para Mo(VI) y B(III), respectivamente y la precisión es de 2'3 % (0'5 ppm) para Mo(VI) y de 3'2 %

(1'1 ppm) para B(III).

18. Igualmente, y con objeto de establecer una determinación conjunta de Mo(VI) y W(VI), aprovechando las similares características operatorias a las que se forman los correspondientes complejos binarios con RAS, se ha utilizado la fluorescencia sincrónica-derivada. Considerando el elevado aumento de señal que experimentan ambos complejos fluorescentes, en presencia de una concentración de tensioactivo catiónico superior a su c.m.c., esta determinación conjunta se ha realizado en un medio al 1'0 % en BCTA y a un pH óptimo de 4'3. El espectro sincrónico se ha registrado utilizando un $\Delta\lambda =$ 110 nm. El método se ha establecido midiendo las señales analíticas en los puntos isodiferenciales correspondientes a cada uno de los complejos binarios. Los rangos de aplicación son de 32-4000 ppb y 57-2500 ppb para Mo(VI) y W(VI), respectivamente, dividiéndose en dos tramos lineales cuyas sensibilidades analíticas son de 9 y 17 ppb para Mo(VI) y W(VI), respectivamente. La precisión, para 150 ppb de Mo(VI) y de W(VI) es de 1'4% y 3'1 %, respectivamente.

El método ha sido satisfactoriamente aplicado a la determinación de ambos elementos en un acero de referencia, obteniéndose una adecuada concordancia entre nuestros resultados y los aportados por el certificado de análisis.

19. En todos los métodos propuestos, se han establecido los Parámetros de Fiabilidad mediante los criterios recomendados por la IUPAC y por el modelo estadístico propuesto, el cual ofrece resultados más representativos en función de la variabilidad de nuestros resultados experimentales. En los casos en los que no disponíamos de un contenido de referencia en las muestras analizadas, hemos comprobado la validez del método propuesto aplicando la metodología estadística desarrollada, al utilizar el método de adición de patrón. Es posible afirmar que los métodos fluorimétricos establecidos son aplicables con exactitud al análisis del tipo de matrices seleccionadas.